



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Nuevos Aspectos en las Actividades Catalíticas de
Tirosinasa

Dña. María del Mar García Molina
2015



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A
UNIVERSIDAD DE MURCIA

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

1. Nuevas polifenoloxidasas con aplicaciones bioanalíticas de alto rendimiento (Fundación Séneca, 08856/PI/08, CARM, Murcia, España). Investigador Principal: Dr. José Tudela Serrano. 2009-2012.
2. Polifenoloxidasas y mediadores para el análisis enzimático de sustancias con interés biotecnológico (Ministerio de Educación y Ciencia, Programa Nacional de Biotecnología, Proyecto BIO2009-12956). Investigador Principal: Dr. José Tudela Serrano. 2010-2012.
3. Control del Movimiento Submolecular en Máquinas Moleculares Sintéticas (Ministerio de Ciencia e Innovación, Proyecto RYC-2008-02647). Investigador Principal: Dr. José Berná Cánovas. 2008-2013.

En Murcia, a 11 de Junio de 2015

Fdo.: **Dr. José Berná Cánovas**
Profesor Titular de Universidad
en el área de Química Orgánica
de la Universidad de Murcia.

Fdo.: **Dr. Francisco García Molina**
Doctor en Bioquímica. Médico Residente del
Servicio de Anatomía Patológica del Hospital
General Universitario de Elche

Fdo.: **Dr. José Luis Muñoz-Muñoz**
Doctor en Bioquímica. Investigador Contratado
Doctor, ICAMB, Institute of Cell and Molecular
Bioscience, Newcastle University.

Fdo.: **María del Mar García Molina**
Alumna de doctorado del Departamento
de Bioquímica y Biología Molecular-A.

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

A los doctores: **José Berná Cánovas, Francisco García Molina, y José Luis Muñoz Muñoz**, todos ellos directores de esta Tesis Doctoral, por enseñarme desde mis inicios, por su disponibilidad, y por todo el apoyo que me han prestado.

Al **Dr. Francisco García Cánovas**, por ser el pilar para que esto se haya hecho realidad, a él le debo todo.

A los **Drs. José Tudela y José Neptuno**, por ayudarme en todo lo que he necesitado durante este tiempo.

Al **Dr. Ramón Varón Castellanos**, por su alta participación y amabilidad con nuestro grupo.

Al **Dr. Pedro Antonio García Ruiz** del Departamento de Química Orgánica, por su atenta y continua colaboración en esta Memoria.

Al **Dr. Francisco Martínez Ortíz** del Departamento de Química Física de la Universidad de Murcia, por sus amplias enseñanzas en el campo de la electroquímica.

A mis compañeros de laboratorio: **Vanesa, Miguel Ángel y Manuel**, a los que quedamos en la primitiva: **Magda, Ana y Alejandro**, a los compañeros de al lado (**María, Marisa, Antonio, Fernanda y Sole**) y a aquellos que ya no están (**Jesús, Rafa, Ana, Wun, Ewa, Xavi, Mar y Juan Diego**).

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia, en especial a **Encarna, Mercedes, Juana, Pepa y Marisen** por su amabilidad.

A mis **hermanos** y **amigos** por soportarme durante estos años en esos momentos menos alegres y por apoyarme a lo largo de mi vida.

Y una especial mención a mi madre **María Victoria**, por su gran ayuda y continuo apoyo siempre y, aún más, en este periodo.

Contenido

CONTENIDO

Publicaciones	X
Índice	
1. Introducción	1
2. Objetivos	213
3. Materiales y Métodos	217
4. Resultados y Discusión	233
5. Conclusiones	251
6. Bibliografía	257

Publicaciones

*PUBLICACIONES.

El contenido de esta Tesis Doctoral ha originado la publicación de los siguientes artículos de investigación y comunicaciones en congresos científicos:

Artículos de investigación

1. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A. y García-Cánovas, F. (2012) Action of tyrosinase on ortho-substituted phenols: possible influence on browning and melanogenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 6447-6453, FI (Factor de Impacto): 3.107 C (Categoría): Agriculture, Multidisciplinary P (posición): 2 de 56 (Q1).
2. Muñoz-Muñoz, J.L., Berna, J., **García-Molina, M.M.**, García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2012) Hydroxylation of p-substituted phenols by tyrosinase. Further insight into the mechanism of tyrosinase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **424**, 228-233, FI: 2.281 C: Biophysics P: 46 de 74 (Q3).
3. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2013) Study of umbelliferone hydroxylation to esculetin catalyzed by polyphenol oxidase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **36**, 1140-1145, FI: 1.778 C: Pharmacology and Pharmacy P: 161 de 261 (Q3).
4. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Berna, J., Rodríguez-López, J.N., Varón, R. y García-Cánovas, F. (2013) Hydrogen peroxide helps in the identification of monophenols as possible substrates of tyrosinase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **77**, 2383-2388, FI: 1.206 C: Food Science and Technology P: 62 de 123 (Q2).
5. Muñoz-Muñoz, J.L., **García-Molina, M.M.**, García-Molina, F., Varón, R., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2014) Indirect inactivation of tyrosinase in its action on 4-tert-butylphenol. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **29**, 344-352, FI: 2.383 C: Biochemistry and Molecular Biology P: 178 de 291 (Q3).
6. Muñoz-Muñoz, J.L., **García-Molina, M.M.**, García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., García-Sevilla, F., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2013) Deuterium isotope effect of the suicide inactivation of tyrosinase in its action on o-diphenols. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **65**, 793-799, FI: 2.755 C: Biochemistry and Molecular Biology P: 154 de 291 (Q3).
7. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Berna, J., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2014) Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on hydroxyhydroquinone. *International Union of Biochemistry and Molecular Life* **66**, 122-127. FI: 2.755 C: Biochemistry and Molecular Biology P: 154 de 291 (Q3).
8. Muñoz-Muñoz, J.L., **García-Molina, M.M.**, García-Molina, F., Berna, J., García-Ruiz, P.A., Varón, R., García-Moreno, M., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2013) Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on o-

diphenols, o-aminophenols and o-phenyldiamines. Potential use in industrial applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **91**, 17-24, FI: 2.745 C: Chemistry, Physical P: 51 de 136 (Q2).

9. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Martínez-Ortíz, F., Rodríguez-Martínez, J., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2014) Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of hydroquinone, a depigmenting agent, to hydroxyhydroquinone: a kinetic study. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **22**, 3360-3369, FI: 2.951 C: Biochemistry and Molecular Biology P: 135 de 291 (Q2).
10. **García-Molina, M.M.**, Berna, J., Muñoz-Muñoz, J.L., García-Ruiz, P.A., García-Moreno, M., Rodríguez-Martínez, J. y García-Cánovas, F. (2014) Action of tyrosinase on hydroquinone in the presence of amounts of o-diphenol. A kinetic study. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, **112**, 305-320, FI: 0.983 C: Chemistry, Physical P: 108 de 136 (Q4).

*Presentación del proyecto de Tesis en 2012.

Otros artículos de investigación relacionados con esta Tesis Doctoral:

11. García-Sevilla, F., García-Moreno, M., Masia, M.D., de Guevara, R.G.L., **García-Molina, M.M.**, Arribas, E., Molina-Alarcón, M., Amo, M.L. y Varón, R. (2014) Linear compartmental systems. III. Application to enzymatic reactions. *Journal of Mathematical Chemistry* **52**, 1647-1674, FI: 1.270 C: Mathematics, Interdisciplinary Applications P: 34 de 95 (Q2).
12. García-Sevilla, F., García-Moreno, M., Masia, M.D., de Guevara, R.G.L., **García-Molina, M.M.**, Arribas, E., Molina-Alarcón, M., Amo, M.L. y Varón, R. (2014) Linear compartmental systems. IV. A software, under MS-Windows, for obtaining the instantaneous species concentrations in enzyme systems. *Journal of Mathematical Chemistry* **52**, 1675-1689, FI: 1.270 C: Mathematics, Interdisciplinary Applications P: 34 de 95 (Q2).
13. Ortiz-Ruiz, C.V., **García-Molina, M.M.**, Tudela, J., Tomás-Martínez, V. y García-Cánovas F. (2015) Discrimination between Alternative Substrates and Inhibitors of Tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 2162-2171. FI: 3.107 C: Agriculture, Multidisciplinary P: 2 de 56 (Q1).
14. Ortiz-Ruiz, C.V., Berna, J., **García-Molina, M.M.**, Tudela, J., Tomás-Martínez, V. y García-Cánovas F. (2015) Identification of p-hydroxybenzyl alcohol, tyrosol, phloretin and its derivate phloridzin as tyrosinase substrates. *Bioorganic Medicinal Chemistry* DOI: 10.1016/2015.04.016. FI: 2.951 C: Biochemistry and Molecular Biology P: 135 de 291 (Q2).

Comunicaciones en Congresos Internacionales

1. Muñoz-Muñoz, J.L., **García-Molina, M.M.**, García-Molina, F., García-Molina, M., Varon, R., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. *Indirect inactivation of tyrosinase in its action on 4-tert-butylphenol*. 22th IUBMB Congress / 37th FEBS Congress. 4-9 September 2012. Sevilla (Spain).
2. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Molina, M., Varon, R., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. *Hydroxylation of p-substituted phenols by tyrosinase. Further insight into the mechanism of tyrosinase activity*. 22th IUBMB Congress / 37th FEBS Congress. 4-9 September 2012. Sevilla (Spain).
3. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Molina, M., Varon, R., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. *Action of tyrosinase on ortho-substituted phenols: possible influence on browning and melanogénesis*. 22th IUBMB Congress / 37th FEBS Congress. 4-9 September 2012. Sevilla (Spain).
4. **García-Molina, M.M.**, Berna, J., Muñoz-Muñoz, J.L., María-Solano, M.A. y García-Cánovas, F. *Action of tyrosinase on hydroquinone in the presence of amounts of o-diphenol. A kinetic study*. ANQUE ICCE BIOTEC. 1-4 July. Madrid (Spain).
5. **García-Molina, M.M.**, María-Solano, M.A., Berna, J. y García-Cánovas, F. *Kinetic study on the inhibition of enzymatic browning by pH control*. ANQUE ICCE BIOTEC. 1-4 July. Madrid (Spain).
6. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., María-Solano, M.A., Berna, J., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. *Action of tyrosinase on hydroquinone*. International Conference on Food and Biotechnology (ICFB2014). 11-12 September 2014. Tiflis (Georgia).
7. **García-Molina, M.M.**, María-Solano, M.A., Berna, J., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. *Kinetic study of the pH as inhibitor of tyrosinase in order to control enzymatic browning*. International Conference on Food and Biotechnology (ICFB2014). 11-12 September 2014. Tiflis (Georgia).

Comunicaciones en Congresos Nacionales

1. **García-Molina, M.M.**, Medina Florido, E.M. y Slowing Barillas, K. *Olea europea L*. VI Jornadas Complutenses, V Congreso Nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y X Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas. 7-8 Abril 2011. Madrid (España).
2. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Rodríguez-López, J.N., Varon, R. y García-Cánovas, F. *Identification of monophenols as posible substrates of tyrosinase*. XXXVI Congreso SEBBM. 4-6 Septiembre 2013. Madrid (España).
3. Molina-Alarcón, M., García-Moreno, M., Gómez-Ladrón de Guevara, R., **García-Molina, M.M.**, Arribas, E., Amo Saus, M.L.I., García-Sevilla, F. y Varon Castellanos, R. *Application to enzyme reactions of the linear compartmental systems*. XXXVI Congreso SEBBM. 4-6 Septiembre 2013. Madrid (España).

4. Amo Saus, M.L.I., García-Moreno, M., Gómez-Ladrón de Guevara, R., **García-Molina, M.M.**, Arribas, E., Molina-Alarcón, M., Varon, R. y Garcia-Sevilla, F. *SKEE-W2013: software under MS-Windows, for obtaining the symbolic kinetic equations of instantaneous species concentrations in enzyme systems*. XXXVI Congreso SEBBM. 4-6 Septiembre 2013. Madrid (España).
5. **García-Molina, M.M.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Maria-Solano, M.A., Berna, J. y García-Cánovas, F. *Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of hydroquinone, a depigmenting agent, to hydroxyhydroquinone: a kinetic study*. XXXVII Congreso SEBBM. 9-12 Septiembre 2014. Granada (España).

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1.
1.1. Tirosinasa	1.
1.1.1. Tirosinasa de bacterias.	
1.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas.	
1.1.3. Tirosinasa de artrópodos.	
1.1.4. Tirosinasa de mamíferos.	
1.2. Tirosinasa: funciones fisiológicas	20.
1.2.1. Tirosinasa de bacterias.	
1.2.2. Tirosinasa de plantas y hongos.	
1.2.3. Tirosinasa de artrópodos.	
1.2.4. Tirosinasa de mamíferos.	
1.2.4.1. Melanocitos e histología de la melanogénesis.	
1.2.4.2. Tipos de melaninas.	
1.2.4.3. Feomelaninas y su papel en el cáncer de piel inducido por la radiación UV.	
1.2.4.4. El papel clave de tirosinasa en la melanogénesis.	
1.2.4.5. Regulación de la melanogénesis.	
1.3. Tirosinasa: estructura	63.
1.3.1. Estructura primaria y peso molecular de PPOs.	
1.3.2. Dominio central, dominio C-terminal y el sitio de ruptura proteolítica.	
1.3.2.1. Motivos de aminoácidos conservados en el dominio central.	
1.3.2.2. Motivos de aminoácidos conservados en el dominio C-terminal.	
1.3.2.3. Péptido de tránsito y localización de las PPOs.	
1.3.2.4. Homología de secuencias entre PPOs.	
1.3.2.5. Activación <i>in vitro</i> de PPOs.	
1.3.2.6. Activación <i>in vivo</i> de PPO.	
1.3.2.7. Mutantes de PPO.	
1.3.3. Complejos oxo.	
1.3.3.1. Técnicas utilizadas para investigar los complejos oxo.	
1.3.3.2. Complejo oxo de catecol oxidasa.	
1.3.3.3. Complejos oxo de tirosinasa.	
1.3.4. Datos estructurales de cristalografía de rayos X de PPOs.	
1.3.4.1. Estructuras publicadas en el banco de datos de proteínas de catecol oxidasas.	
1.3.4.2. Estructuras de tirosinasas publicadas en el banco de datos de proteínas.	
1.3.4.3. Diferencias estructurales entre tirosinasas y catecol oxidasas.	
1.4. Tirosinasa: actividades catalíticas	91.
1.4.1. Actividad difenolasa.	
1.4.2. Actividad monofenolasa.	
1.4.3. Estereoespecificidad de las actividades monofenolasa y difenolasa.	
1.4.4. Actividad ascorbato oxidasa.	
1.4.5. Actividad catalasa.	
1.4.6. Actividad tetrahidropterina oxidasa.	
1.4.7. Actividad NADH oxidasa.	
1.4.8. Actividad tetrahidrofólico oxidasa.	
1.4.9. Oxidación de <i>o</i> -aminofenoles y <i>o</i> -aminas aromáticas	
1.4.10. Actividad monofenolasa de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrógeno.	

1.4.11. Aplicación de la actividad hidroxilasa de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrógeno para investigar a distintos monofenoles como sustratos de tirosinasa.

1.4.12. Acción de tirosinasa sobre hidroquinona.

1.5. Tirosinasa: regulación enzimática.....118.

1.5.1. Inhibidores.

1.5.1.1. Diseño de inhibidores a partir de productos naturales.

1.5.1.1.1. Derivados del resveratrol.

1.5.1.1.2. Derivados del ácido cinámico.

1.5.1.1.3. Derivados polifenólicos.

1.5.1.1.4. Chalconas.

1.5.1.1.5. Derivados del bifenilo.

1.5.1.1.6. Derivados del ácido kójico.

1.5.1.2. Diseño de inhibidores sintéticos.

1.5.1.2.1. Derivados de feniltioureas.

1.5.1.2.2. Derivados de tipo tiosemicarbazonas.

1.5.1.2.3. Derivados pirazólicos.

1.5.1.2.4. Tiadiazoles, triazoles y oxadiazoles.

1.5.1.2.5. Captopril.

1.5.1.2.6. Péptidos con actividad inhibidora de tirosinasa.

1.5.2. Aplicaciones terapéuticas.

1.5.3. Diseño de inhibidores de tirosinasa.

1.5.4. Aplicaciones de los inhibidores.

1.5.5. Activadores.

1.5.6. Inactivación suicida.

1.5.7. Inactivación térmica.

1.6. Tirosinasa: alteraciones de la pigmentación y diseño de fármacos.....159.

1.6.1. Melanoma.

1.6.1.1. Concepto y epidemiología.

1.6.1.2. Factores de riesgo de desarrollo de melanoma.

1.6.1.3. Diagnóstico.

1.6.1.4. Patogenia.

1.6.1.5. Clasificación.

1.6.1.6. Factores pronósticos del melanoma cutáneo.

1.6.1.7. Tratamiento del melanoma.

1.6.2. Alteraciones de la pigmentación.

1.6.2.1. Hipopigmentación.

1.6.2.2. Hiperpigmentación.

1.7. Tirosinasa: aplicaciones biotecnológicas.....195.

1.7.1. Industria alimentaria y cosmética.

1.7.2. Tirosinasa inmovilizada.

1.7.2.1. Obtención de *o*-difenoles.

1.7.2.1.1. Producción biotecnológica de L-dopa.

1.7.2.2. Biosensores enzimáticos.

1.7.2.3. Descontaminación de aguas.

2. OBJETIVOS.....	213.
2.1. Objetivo general	
2.2. Objetivos específicos	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	217.
3.1. Reactivos y materiales.....	219.
3.1.1. Reactivos.	
3.1.2. Enzimas.	
3.1.2.1. Tirosinasa.	
3.1.2.2. Superóxido dismutasa	
3.1.2.3. Lacasa	
3.2. Equipos y métodos.....	222.
3.2.1. Ensayos oximétricos.	
3.2.2. Ensayos espectrofotométricos.	
3.2.3. Ensayos de RMN.	
3.2.4. Ensayos electroquímicos.	
3.2.5. Cromatografía.	
3.2.5.1. Ensayos con HPLC.	
3.2.5.2. Ensayos con HPLC-MS.	
3.2.6. Efecto isotópico del disolvente.	
3.2.7. Análisis de regresión.	
3.2.7.1. Regresión no lineal.	
3.2.7.2. Regresión lineal.	
3.2.8. Simulación numérica.	
3.2.8.1. Integración numérica de ecuaciones diferenciales.	
3.2.8.2. Métodos de paso variable.	
3.2.8.3. Implementación.	
3.2.8.4. Condiciones de simulación.	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	233.
4.1. ESTUDIO DE LA HIDROXILACIÓN DE UMBELIFERONA A ESCULETINA CATALIZADA POR POLIFENOL OXIDASA.	
4.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AYUDA A LA IDENTIFICACIÓN DE MONOFENOLES COMO SUSTRATOS DE TIROSINASA.	
4.3. INACTIVACIÓN INDIRECTA DE TIROSINASA EN SU ACCIÓN SOBRE 4-TERT-BUTILFENOL.	
4.4. EFECTO ISOTÓPICO DE DEUTERIO EN LA INACTIVACIÓN SUICIDA DE TIROSINASA EN SU ACCIÓN SOBRE O-DIFENOLES.	
4.5. CATÁLISIS E INACTIVACIÓN DE TIROSINASA EN SU ACCIÓN SOBRE HIDROXIHIDROQUINONA.	
4.6. CATÁLISIS E INACTIVACIÓN DE TIROSINASA EN SU ACCIÓN SOBRE O-DIFENOLES, O-AMINOFENOLES Y O-FENILENDIAMINAS: POTENCIAL USO EN APLICACIONES INDUSTRIALES.	
4.7. TIROSINASA CATALIZA LA HIDROXILACIÓN DE HIDROQUINONA, UN AGENTE DESPIGMENTANTE, A HIDROXIHIDROQUINONA: UN ESTUDIO CINÉTICO.	
4.8. ACCIÓN DE TIROSINASA SOBRE HIDROQUINONA EN PRESENCIA DE CANTIDADES CATALÍTICAS DE O-DIFENOL. UN ESTUDIO CINÉTICO.	

5. CONCLUSIONES.....	251.
5.1. Conclusiones específicas	
5.2. Conclusiones generales	
6. BIBLIOGRAFÍA.....	257.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tirosinasa

El primer trabajo sobre tirosinasa se publicó hace 118 años (Bertrand, 1896). Cuarenta y dos años más tarde se publicaron los procedimientos para su aislamiento en grandes cantidades por Keilin y Mann (Keilin y Mann, 1938) y Kubowitz (Kubowitz, 1938), esto hizo posible un estudio más detallado acerca de las propiedades de tirosinasa. Hacia 1956 Mason discutió la estructura y posibles funciones de la enzima (Mason, 1956) y unos años más tarde, en 1966, indicaba que era necesario determinar el número de átomos de cobre del sitio activo, la naturaleza de las isoenzimas de tirosinasa e identificar si las actividades monofenolasa y difenolasa se deben a una única enzima (Mason, 1966).

Actualmente varios de estos interrogantes están resueltos. Se conoce el número de átomos de cobre del centro activo. Se ha llevado a cabo la cristalización de la enzima de distintas fuentes. En 2006 se publicó la primera estructura cristalizada de tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006), posteriormente se publicó la de *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2011). Recientemente se ha resuelto la estructura de la enzima de hongo *Agaricus bisporus*, que es la enzima tipo en los estudios experimentales de tirosinasa (Ismaya et al., 2011a; 2011b; Mauracher et al., 2014a). Asimismo, también se ha publicado la de hoja de nogal *Juglan regia* (Zekiri et al., 2014). Gracias al conocimiento de estas estructuras, se ha avanzado en la comprensión del mecanismo de actuación de la enzima, así como en otras características estructurales (Sánchez-Ferrer et al., 1995; Solomon et al., 2014).

Un aspecto que normalmente ha sido relegado a un segundo lugar es el estudio de la función de la enzima en hongos y plantas (Mayer, 2006), de modo que en muchos casos no está inequívocamente establecida. Por ejemplo, todavía no están claras las razones de la latencia de la enzima y cuál es el mecanismo que regula su conversión a la forma activa. Otro aspecto en el que debería profundizarse es en la distinción entre tirosinasas constitutivas e inducibles. En este sentido, se sabe que el jasmonato de metilo induce la producción de tirosinasa, pero no se conoce bien el mecanismo molecular. Sería necesario estudiar más a fondo la localización cromosómica de los genes que codifican a tirosinasa, así como la respuesta a patógenos y herbicidas.

La enzima que se va a estudiar en la presente Memoria es tirosinasa o polifenol oxidasa, utilizando como modelo la enzima de champiñón, *Agaricus bisporus*. Esta enzima es una cupoproteína, que desempeña cuatro funciones básicamente: 1) almacenamiento, transporte y recogida del ión metálico; 2) transferencia de electrones; 3) almacenamiento, transporte y recogida de oxígeno; 4) catálisis. La presencia de cobre en estas proteínas les confiere unas propiedades espectroscópicas características, a través de las cuales estas proteínas han sido históricamente clasificadas en tres tipos (1, 2 y 3), aunque en los últimos años el acceso a más estructuras ha hecho ampliar la lista. Actualmente se distinguen siete clases diferentes (Solomon et al., 1996; Bubacco et al., 1999), las principales se resumen brevemente a continuación.

Tipo-1: Los centros de cobre tipo-1 se encuentran en las proteínas de simple transferencia de electrones, tales como plastocianina, azurina, pseudoazurina y amicianina. Debido a su intenso color azul en la forma oxidada del Cu (II), estas proteínas han sido también llamadas “proteínas de cobre azul”. Los centros tipo-1 se encuentran también en enzimas redox tales como nitrito reductasa y en oxidasas multicúpricas (ascorbato oxidasa, lacasa) que contienen más de un sitio de cobre. La esfera de coordinación del cobre está formada por dos átomos de nitrógeno procedentes de histidina, un átomo de azufre de cisteína y un átomo de azufre procedente de metionina coordinado débilmente de forma axial. En lugar de metionina, en algunos casos se ha encontrado una leucina o glutamina.

Tipo-2: Los centros de cobre en estas proteínas están unidos a cuatro átomos de nitrógenos u oxígenos y sus espectros de EPR permite distinguirlos de los centros de tipo-1. Las proteínas que contienen un centro tipo-2 están mayoritariamente implicadas en procesos catalíticos. Estos centros se encuentran en las oxidasas, como galactosa oxidasa y cobre amino oxidasa, y en oxigenasas, como dopamina- β -monooxigenasa. También se puede encontrar en el centro metálico dinuclear de Cu-Zn de superóxido dismutasa.

Tipo-3: Los centros de cobre tipo-3 consisten en dos átomos de cobre próximos en el espacio, cada uno de los cuales se encuentra coordinado a tres restos de histidina. Las proteínas que contienen estos centros están involucradas en el transporte y activación de O₂. Ejemplos de proteínas de cobre tipo-3 son hemocianina, catecol oxidasa y tirosinasa. Una descripción más detallada de este tipo de centros y su reactividad será dada más adelante.

Tipo-4: Los centros de cobre tipo-4 frecuentemente se describen como una combinación de los centros tipo-2 y tipo-3, formando un grupo trinuclear. Estos centros se encuentran en proteínas que catalizan reacciones de oxidación como lacasa, ascorbato oxidasa y ceruloplasmina. Los tres átomos de cobre están ligados por 8 residuos de histidina.

Cu_A: El Centro Cu_A es dinuclear. Los dos cobres están puenteados a dos cisteínas a través de los átomos de azufre y cada Cu está ligado a un átomo de nitrógeno de histidina. Su función es transferir electrones y se encuentra, por ejemplo, en citocromo c oxidasa. El centro muestra un espectro EPR muy característico y presenta un color violeta.

Cu_B: El Centro Cu_B se encuentra próximo al hierro del grupo hemo del centro catalítico del citocromo c oxidasa (COX) que cataliza la reducción de 4 electrones de O₂ a agua. La energía liberada de la oxidación es utilizada para bombear protones fuera de la membrana en donde COX se encuentra incrustada.

Cu₂: El centro activo Cu₂ contiene cuatro átomos de cobre formando un tetraedro distorsionado y siete residuos de histidina. Este tipo de sitios activos se encuentra en enzimas como la óxido nitroso reductasa que reduce el óxido nitroso a nitrógeno.

La enzima tirosinasa o polifenol oxidasa (monofenol, *o*-difenol: oxígeno óxido-reductasa, EC 1.14.18.1) se encuentra ampliamente distribuida en toda la escala filogenética. Esta cuproproteína cataliza dos tipos de reacciones acopladas en las que interviene oxígeno molecular: (a) hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y (b) oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa). La gran inespecificidad de sustrato y la elevada reactividad de las *o*-quinonas generadas por esta enzima determinan su participación en procesos fisiológicos tan diversos como la biosíntesis de ligninas, la esclerotización de la cutícula de artrópodos y la biosíntesis de melaninas (Mason, 1955; Vámos-Vigyázó, 1981; Robb, 1984; Jiménez et al., 1986; Lozano y Solano, 1989; Sugumaran, 2001; 2010; Claus y Decker, 2006; Abebe et al., 2010; Solomon et al., 2014).

En los organismos aeróbicos, la mayor parte del oxígeno consumido es reducido a agua en la oxidasa terminal de la cadena respiratoria. Sin embargo, también se utiliza una cantidad significativa del mismo en reacciones catalizadas por una clase de enzimas denominadas oxigenasas (Hayaishi, 1962). Es conocido que estas enzimas incorporan uno o dos átomos de oxígeno por mol de sustrato, por lo que se dividen en monooxigenasas y dioxigenasas, respectivamente (Hayaishi, 1974). Las monooxigenasas, llamadas también oxidasas de función mixta, catalizan la

reducción de un átomo de oxígeno a agua, mientras que el otro es transferido al sustrato. Estas enzimas pueden presentar cuatro tipos distintos de grupos prostéticos: cobre, hierro “no hemo”, hierro “hemo” y flavinas. Aquellas monooxigenasas que contienen cobre como cofactor representan un grupo bastante reducido en comparación con las otras tres clases. Una de las monooxigenasas más importantes y extensamente estudiadas, que tiene cobre como cofactor, es la tirosinasa o polifenol oxidasa.

1.1.1. Tirosinasa de bacterias

Aunque la melanina es un pigmento comúnmente asociado con mamíferos, especialmente humanos (Hearing, 2005), este pigmento también se encuentra presente en muchos microorganismos como levaduras o bacterias. Las tirosinasas del género *Streptomyces* son las más estudiadas dentro de las bacterianas. Las bacterias de este género están implicadas en la formación de biopolímeros como ligninas, melaninas o sustancias húmicas, también son una importante fuente industrial de antibióticos y de otros metabolitos secundarios. Alrededor del 40% de las especies de *Streptomyces* producen melanina como exopigmento en un medio de agar que contenga tirosina. Las primeras tirosinasas bacterianas purificadas procedían de *S. nigrifaciens* y *S. glaucescens*. Las tirosinasas procedentes de organismos procariotas han sido muy útiles para el estudio y comprensión de tirosinasa de otras fuentes ya que presentan ciertas ventajas frente a las que proceden de organismos eucariotas: 1) se cultivan rápidamente; 2) son secretadas al medio extracelular, donde están implicadas en la producción de melanina extracelular; 3) su forma activa más probable es monomérica, aunque también se han aislado distintas tirosinasas procariotas que no son monómeros. En el caso de *S. glaucescens* es monomérica y de una masa molecular de 29 KDa, la más pequeña de todas ha sido aislada de *Bacillus thurigiensis*, con sólo 14 KDa (Liu et al., 2004), actualmente es la de menor masa molecular de las conocidas hasta el momento y a diferencia de las tirosinasas del género *Streptomyces* se cree que la forma activa es un dímero; 4) la proteína no es modificada post-traduccionalmente en procesos de activación proteolítica de proenzimas o glicosilaciones. Por todo esto, han sido caracterizadas genética y espectroscópicamente, resultando útiles para profundizar en el estudio estructural de tirosinasa. Esto contrasta con las tirosinasas de células eucariotas que son difíciles de aislar con la pureza y cantidad suficiente para llevar a cabo un estudio estructural adecuado.

La producción del pigmento melanina, como ya se indicó anteriormente, se produce gracias a las cuproproteínas, principalmente tirosinasa pero en algunos casos también a lacasa. Además del efecto fotoprotector, la función que tienen las melaninas en los microorganismos no está totalmente definida, pero parece claro que juegan un papel clave en la protección del microorganismo contra la radiación o en la propia virulencia de éste. También se han descrito otras funciones para tirosinasa como son la eliminación, en bacterias simbióticas, de fenoles defensivos de plantas; la producción de pigmentos como betalainas; síntesis de antibióticos basados en aminoácidos como lincomicina; etc. (Fairhead y Thöny-Meyer, 2012). Como ya se dijo, las tirosinasas bacterianas más extensamente estudiadas son las del género *Streptomyces*. Sin embargo, actualmente se han caracterizado, tanto cinética como estructuralmente, otras muchas tirosinasas bacterianas (*Bacillus*, *Marinomonas*, etc) (Sánchez-Amat et al., 2010; Sendovski et al., 2011).

Las tirosinasas bacterianas se dividen en cinco tipos principales como se muestra en la Figura 1.1 La primera clase de tirosinasa bacteriana (Figura 1A-I) se caracteriza por ser el producto del operón *melC* (*operón de melanina*) (Lerch y Ettinger, 1972), por lo que también se denomina tirosinasa *melC*. Este tipo de tirosinasas son secretadas por las bacterias del género *Streptomyces* usando la vía de señalización TATA (secuencia donde se unen la ARN polimerasa en el ADN (Región del promotor) caja TATA) y son producidas en forma de heterodímero (Chen et al., 1993; Schaerlaekens et al., 2001). Este dímero consiste en una apotirosinasa que está unida a una proteína auxiliar, que es el producto del gen *melC1* (el operón que codifica este gen se esquematiza en la Figura 2). Esta proteína auxiliar o proteína caddie (CP) tiene muchas funciones como, por ejemplo, ser la responsable de la secreción, o de la incorporación del cobre al sitio activo de la enzima en su ensamblamiento (Chen et al., 1993). Ejemplos de este tipo de tirosinasas pueden ser *Streptomyces castaneoglobisporus*, de la que se ha obtenido su estructura tridimensional (Matoba et al., 2006), o *Marimonas mediterránea* (López-Serrano et al., 2004).

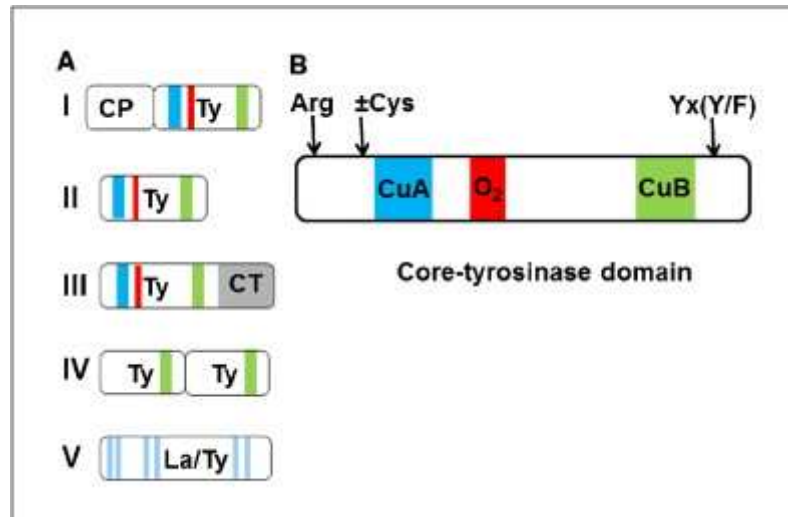


Figura 1.1. Distintos tipos de tirosinasas bacterianas (Fairhead y Thöny-Meyer, 2012).

El segundo tipo de tirosinasa bacteriana (Figura 1.1 A-II) no requiere proteína auxiliar para incorporar el cobre al sitio activo. Un ejemplo de este tipo es la tirosinasa de *Bacillus megaterium*, la cual tiene una estructura muy similar a las tirosinasas de tipo I (Sendovski et al., 2011). Esta tirosinasa de *Bacillus megaterium* puede tener grandes aplicaciones biotecnológicas, ya que es estable incluso a concentraciones altas de disolventes orgánicos en el medio; por ejemplo, una concentración de etanol, acetona o dimetilsulfóxido superior al 50% (Shuster y Fishman, 2009).

Las tipo III (Figura 1.1 A-III) son similares a las tirosinasas fúngicas y se caracterizan por tener un extremo C-terminal que actúa de una forma similar a como lo hace la proteína caddie, pero que no interviene tampoco en la incorporación del cobre a la enzima, y son sintetizadas como zimógenos. Un ejemplo es la tirosinasa de *Verrucomicrobium spinosum* (Fairhead y Thöny-Meyer, 2010).

Las tipo IV (Figura 1.1 A-IV) son más pequeñas que el resto de tirosinasas bacterianas y sólo son activas como homodímeros. Como principal ejemplo se encuentra la tirosinasa de *Bacillus turingiensis* (Liu et al., 2004).

La tirosinasa tipo V (Figura 1.1 A-V) ha sido bien caracterizada pero hoy en día hay mucha discusión acerca de si es en realidad una tirosinasa o si, por el contrario, es una enzima que posee actividad similar a tirosinasa, es la llamada "polifenol oxidasa multipotente" obtenida de *Marinomonas mediterránea* (Sánchez-Amat et al., 2001). Parece ser que esta enzima tiene más semejanza estructural a la de lacasa

(Sakurai y Kataoka, 2007). Además, no tiene el motivo de unión del cobre A y B característico de las tirosinasas ni el motivo de unión del oxígeno, pero sin embargo es capaz de oxidar monofenoles (Sakurai y Kataoka, 2007). Otra enzima que muestra actividad tirosinasa, pero no tiene una secuencia homóloga a las tirosinasas conocidas, es la enzima producida por *Aeromonas media*.



Figura 1.2. Esquema del operón *melC* de *Streptomyces antibioticus*. Las cajas representan las regiones codificantes, los círculos blancos simbolizan las regiones promotoras, los círculos negros los sitios de unión del ribosoma y la flecha indica el sitio del comienzo de la transcripción (Claus y Decker, 2006).

Tabla 1.1. Ejemplos de tirosinasas bacterianas descritas en la literatura (Fairhead y Thöny-Meyer, 2012).

Organismo	Tiposde tirosinasas	Referencias
		Shuster y Fishman, 2009
<i>Bacillus megaterium</i>	II	Sendovski et al., 2011
<i>Bacillus thuringiensis</i>	II y IV	Metwally y El-Shora, 2008 Zhang et al., 2008
<i>Marinomonas mediterranea</i>	I y V	López-Serrano et al., 2004 López-Serrano et al., 2007
<i>Ralstonia solanacearum</i>	III	Hernández-Romero et al., 2006 Hernández-Romero et al., 2005
<i>Rhizobium etli</i>	III	Piñero et al., 2007
<i>Streptomyces antibioticus</i>	I	Marino et al., 2011
<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	I	Kohashi et al., 2004
<i>Streptomyces glaucescens</i>	I	Lerch y Ettinger, 1972
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	I	Michalik et al., 1975
<i>Streptomyces sp. REN-21</i>	I	Ito y Oda, 2000
<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	III	Fairhead y Thöny-Meyer, 2010

Las tirosinasas de *Streptomyces nigrifaciens*, *Streptomyces glaucescens*, *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas putida* F₆ (Claus y Decker, 2006; McMahon et al., 2007) son monómeros, mientras que las de *Vibrio tirosinaticus* y *Thermomicrobium roseum* son dímeros (Kong et al., 2000; Liu et al., 2004).

Los estudios con tirosinasa de *Streptomyces* han sido impulsados en los últimos años. Así se ha sobreexpresado y purificado la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Kohashi et al., 2004), llegando a obtener la estructura cristalina de la enzima de esta bacteria. Como se acaba de indicar, se ha cristalizado esta enzima, formando un complejo con ORF378 (open reading frame; marco de lectura abierto), que es una proteína transportadora de cobre al sitio activo de tirosinasa (Matoba et al., 2006). Los estudios cristalográficos realizados por estos autores revelan que el sitio activo contiene el cobre dinuclear.

Recientemente se ha aislado y caracterizado la tirosinasa de *Bacillus megaterium*, sobreexpresándola en *Escherichia coli* (Shuster y Fishman, 2009). Esta tirosinasa es más activa en mezclas agua/ disolvente orgánico, por lo cual esta enzima puede tener aplicaciones en síntesis orgánica. La estructura de la tirosinasa de *Bacillus megaterium* se ha resuelto con una precisión de 2 Å y la unidad asimétrica de estos cristales revela que esta enzima se encuentra en forma de un dímero (Sendovski et al., 2010; 2011). En 2013 se ha descrito un posible mecanismo de incorporación de cobre a esta enzima (Kanteev et al., 2013). Otra tirosinasa bacteriana, la de *Verrucomicrobium spinosum*, se ha sobreexpresado también en *Escherichia coli*, con un gran rendimiento de 464 mU L⁻¹ h⁻¹ (Ren et al., 2013).

1.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas

La enzima tirosinasa de champiñón, *Agaricus bisporus*, y la del ascomiceto, *Neurospora crassa*, son las más conocidas desde el punto de vista molecular, estructural y cinético (Lerch, 1981; Robb, 1984; Gerritsen et al., 1994; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Wichers et al., 2003; Van Gelder et al., 1997; Espín et al., 1997; Fan y Flurkey, 2004).

Tirosinasa ha sido extraída y purificada de muchos tejidos vegetales, entre ellos: manzana (Nicolas et al., 1994; Espín et al., 1995), aguacate (Weemaes et al., 1998; Gómez-López, 2002), champiñón (*Agaricus bisporus*, Espín et al., 1999a; Fan y Flurkey, 2004; Ismaya et al., 2011a), pera (Espín et al., 1996), menta (*Mentha piperita*, Kavrayan y Aydemir, 2001), tabaco (*Nicotiana tabacum*, Shi et al., 2002), látex (*Hevea brasiliensis*, Wititsuwannakul et al., 2002), patata (*Solanum tuberosum*, Marri et al.,

2003; Cheng et al., 2015), café (*Coffea arabica*, Goulart et al., 2003), álamo (*Populus trichocarpa* P. *deltoides*, Wang y Constabel, 2003), caqui (*Diospyros kaki*, Núñez-Delgado et al., 2003), mora (*Morus alba* L., Arslan et al., 2004), remolacha (*Beta vulgaris* L., Gandía-Herrero et al., 2004), melocotón (*Prunus persica* L., Cabanes et al., 2007), mandarina (*Satsuma mandarine* L., Cheng et al., 2014) y hoja del árbol de caucho (Li et al., 2014).

Se ha revisado la función de esta enzima en hongos y plantas, destacando un papel defensivo frente a patógenos (Mayer, 2006). Se ha puesto a punto un método sencillo para extraer la enzima de patata a partir de residuos de piel (Niphadkar et al., 2015). Recientemente se han estudiado la enzima de lechuga *Lactuca sativa* (Zlotek y Gawlik-Dziki, 2015), la enzima de mango o melocotón de los trópicos (Palma-Orozco et al., 2014) y de *Ataulfo mango* (Cheema y Sommerhalter, 2015). Se ha descrito un nuevo método de purificación de la enzima de champiñón (Zaidi et al., 2014b) y caqui (Navarro et al., 2014). Se ha extraído y estudiado la tirosinasa de la morácea *Artocarpus heterophyllus* (Tao et al., 2013) y de patata (Cheng et al., 2014). También se ha conseguido la purificación de una forma latente de polifenol oxidasa de champiñón, la isoenzima PPO4 (Mauracher et al., 2014a).

Respecto a su localización, se trata de una enzima intracelular localizada en el cloroplasto, mitocondria, microsoma, peroxisoma y citoplasma (Mayer y Harel, 1979; Zawistowski et al., 1991; Mayer, 2006), aunque suele estar fundamentalmente ligada a la membrana tilacoidal en el cloroplasto. El nivel y localización predominante de tirosinasa en la célula, en plantas, depende de la especie, variedad, madurez y edad (Vámos-Vigyázó, 1981).

Su función sigue siendo confusa y objeto de controversia (Sommer et al., 1994; Joy et al., 1995; Onsa et al., 2000; Mayer, 2006) debido a las características propias del sistema enzimático, entre ellas su actividad bivalente y la complejidad en su extracción y purificación (Robb, 1984; Mayer, 1987; Zhang et al., 2000; Nagai y Suzuki, 2001). Debido a la dificultad de extracción y purificación se han propuesto distintas formas enzimáticas para tirosinasa de hongos y plantas superiores. Así, tirosinasa de champiñón se ha descrito con una estructura tetramérica con un peso molecular de 120 KDa, compuesta por dos subunidades de ≈ 43 KDa (subunidad pesada o H) y dos subunidades de ≈ 14 KDa (subunidad ligera o L). La identidad, función y origen de la subunidad L es todavía desconocida (Strothkamp et al., 1976, Mayer, 2006; Schurink et al., 2007; Flurkey e Irlow, 2008). Igualmente, se han obtenido dos isoenzimas monoméricas de *Agaricus bisporus* 43 KDa (Wichers et al., 1996).

En plantas superiores la enzima protege a la planta frente a insectos y microorganismos, catalizando la formación de una capa de melanina frente al ataque (Kowalski et al., 1992). En muchos frutos y vegetales, tirosinasa es responsable del pardeamiento enzimático, después del daño causado a la célula (van Gelder et al., 1997).

Una característica frecuente de tirosinasa de hongos y plantas es que, en estado nativo, existe como una enzima latente, la cual tiene que ser activada. Se ha descrito activación *in vivo* por proteasas (Rathjen y Robinson, 1992). Por otra parte, *in vitro* se ha demostrado activación proteolítica (Laveda et al., 2001), activación por detergentes, SDS (Laveda et al., 2000), o por poliaminas (Jiménez-Atienzar, 1991).

Se han clonado, expresado y caracterizado dos cADNs de tirosinasa a partir de *Agaricus bisporus* (Wichers et al., 2003; Wu et al., 2010). Recientemente se han publicado dos estructuras cristalizadas de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Ismaya et al., 2011a; 2011b; Mauracher et al., 2014a) y una de las hojas del nogal *Juglans regia* (Zekiri et al., 2014). Además se han cristalizado dos catecol oxidasas, una de boniato *Ipomea batatas* (Klabunde et al., 1998) y la otra procedente de la uva *Vitis vinífera* (Virador et al., 2010a; 2010b).

Los sustratos fisiológicos de tirosinasa más importantes encontrados en frutas y hortalizas, aunque varían según especies y variedades, son: las catequinas (catequina, epicatequina, galocatequinas, etc.), derivados del ácido cinámico (ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, etc.), catecoles y derivados, derivados del ácido benzoico (ácidos protocatéquico, vaníllico, siríngico, etc.), flavonas, flavonoides, antocianidinas, etc. (Vámos-Vigyázó, 1981). Debido a esta inespecificidad, las tirosinasas también pueden actuar sobre otros tipos de sustratos sintéticos no naturales.

Actualmente la investigación sobre tirosinasas de hongos y plantas se ha impulsado notablemente debido a sus posibles aplicaciones biotecnológicas en la industria de la alimentación, farmacéutica y medio ambiental (Seo et al., 2003; Halaouli et al., 2006). Debido a la importancia de esta clase de enzimas se ha optimizado la expresión en bacterias de las tirosinasas de plantas (Dirks-Hofmeister et al., 2013).

1.1.3. Tirosinasa de artrópodos

La tirosinasa de insectos, también llamada fenoloxidasa (PO), está soluble en la hemolinfa y, por lo tanto, en contacto con sus sustratos. PO se encuentra en forma de proenzima y se activa, cuando se requiere, por mecanismos regulados como son la proteólisis limitada (Söderhäll et al., 1990; Hall et al., 1995; Asano y Ashida, 2001). La presencia de pro-tirosinasa fue sugerida hace mucho tiempo pero no había sido purificada hasta ahora. Recientemente se ha cristalizado la pro-fenoloxidasa (ProPO) de *Manduca sexta* a una resolución de 1.97 Å, (Li et al., 2009); es un heterodímero consistente en dos polipéptidos homólogos, cada uno con un sitio activo tipo III. En un extracto de cutícula del gusano de seda *Bombyx mori*, se ha demostrado la existencia de dos isoformas de pro-tirosinasa, las cuales presentan pequeñas variaciones en cuanto a su movilidad electroforética (Asano y Ashida, 2001).

La ruta de biosíntesis de melaninas en insectos y otros artrópodos es un proceso importante para la vida de estos organismos. La ruta es diferente a la de mamíferos ya que en esta intervienen enzimas y sustratos diferentes. La enzima de mamíferos que inicia la melanogénesis, tirosinasa, en insectos se denomina fenoloxidasa (PO) y existe una dopacromo isomerasa (decarboxilante) en lugar de la dopacromo tautomerasa (Sugumaran, 2002; 2010). Con respecto a los sustratos, PO utiliza fundamentalmente dopamina y *N*-acetildopamina (Sugumaran, 2002), necesarias para los procesos de esclerotización. Por otra parte, las melaninas de insectos son polímeros de 5,6-dihidroxiindol (DHI) y las de mamíferos son mezclas de DHI y de ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). La polimerización a través de DHI es mejor y más rápida. Así, la formación de DHI en el sitio de infección da lugar a una mejor encapsulación del agente invasor.

Por otra parte, el estudio del origen filogenético de las enzimas implicadas en la melanización en mamíferos y en insectos parece indicar, por las secuencias, que tirosinasa vendría de la hemociacina de moluscos y que PO podría derivar de hemocianina de artrópodos (Fujimoto et al., 1995). Las dos enzimas se diferencian también en el tamaño, PO es mayor que tirosinasa de mamíferos, y además PO no lleva péptido señal y se encuentra soluble en la hemolinfa de insectos. Recientemente se ha detectado actividad tirosinasa en hemocianinas (Raynova et al., 2013).

La importancia de las melaninas en insectos es amplia y está relacionada con procesos de camuflaje, la esclerotización de la cutícula, la respuesta inmune y la curación de las heridas (Sugumaran, 2002).

En invertebrados se produce la activación de profenoloxidasa (proPO) a fenoloxidasa (PO) en presencia de patógenos. Además de la activación de proPO, se ponen de manifiesto otras reacciones inmunes como son la generación de factores con actividad anti-microbiana o citotóxica (Cerenius y Söderhäll, 2004). Este mecanismo se ha demostrado en la infección del camarón *Penaeus monodon* por *Vibrios furnissii* (Subramanian et al., 2014). En la Figura 1.3 se muestra la respuesta de la activación de proPO frente a patógenos.

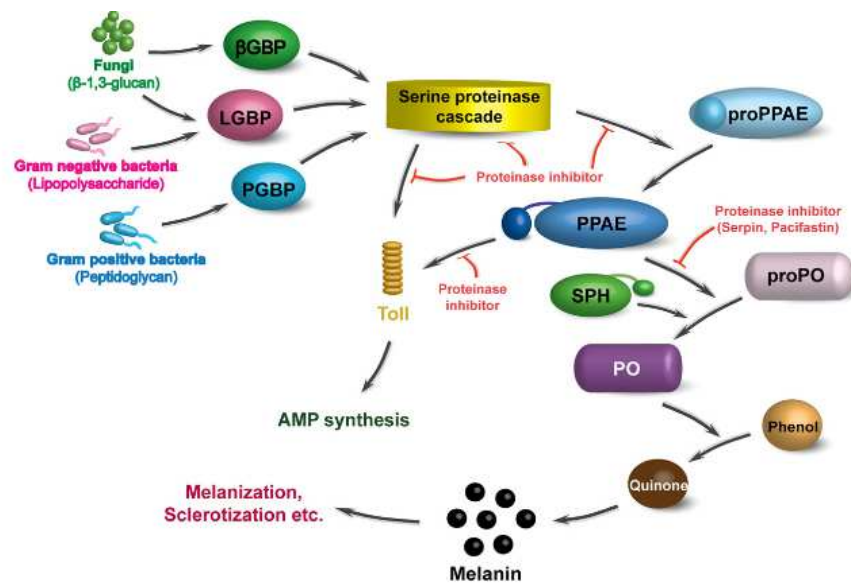
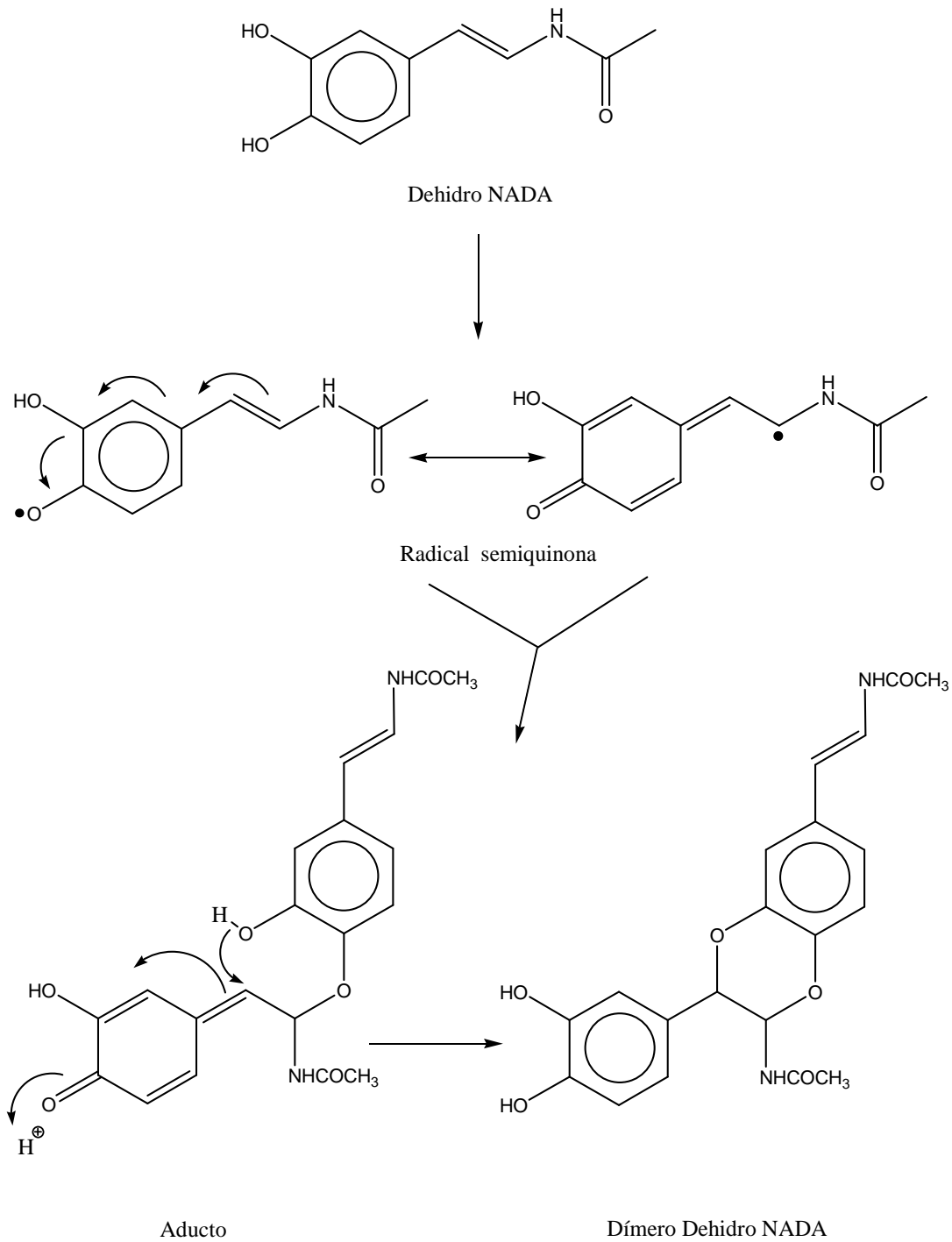


Figura 1.3. Representación esquemática de los componentes del sistema de activación de profenoloxidasa (proPO) en artrópodos (Amparyup et al., 2013).

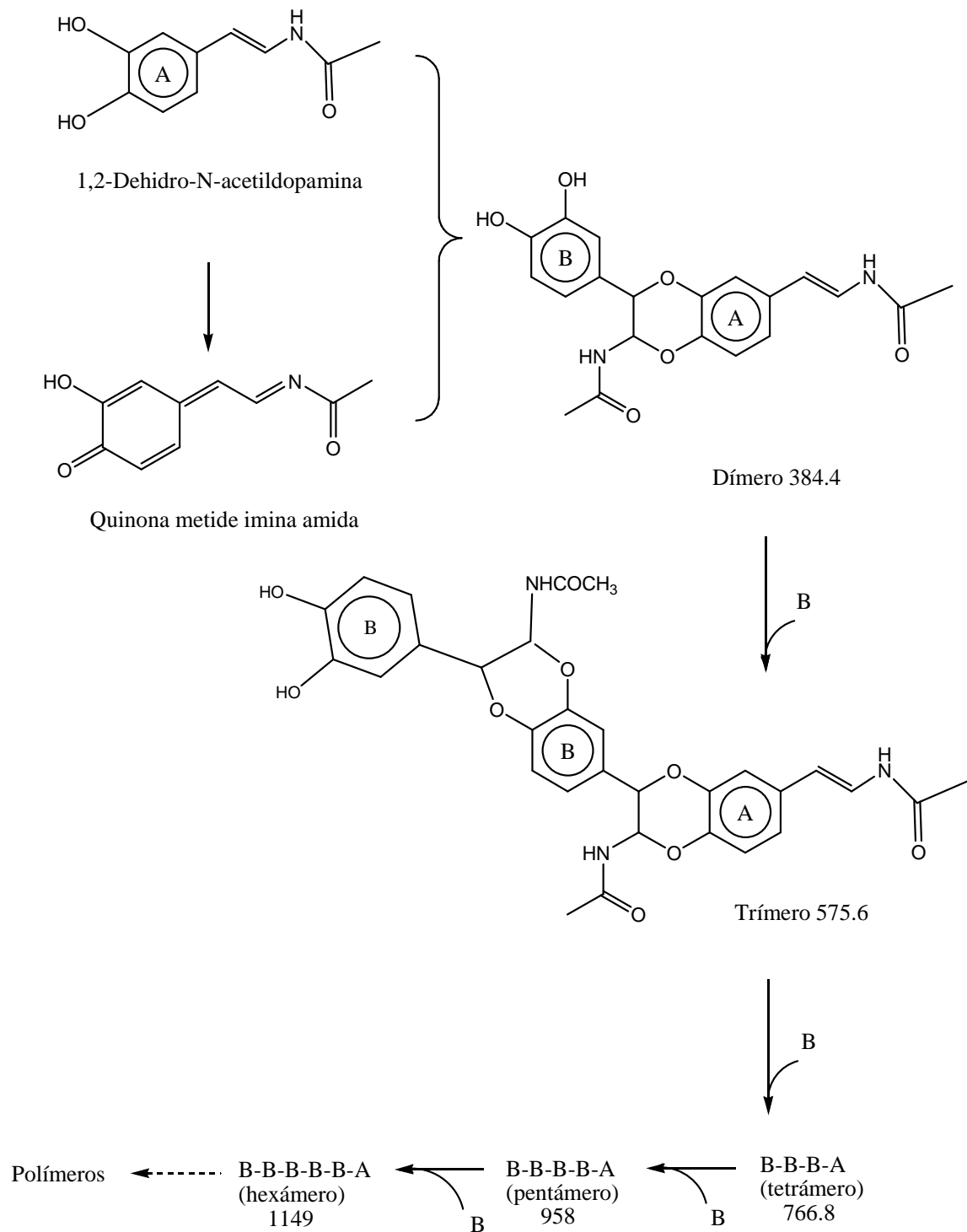
Durante una infección microbiana se generan moléculas como: β -1,3-glucano (β G) (hongos), lipopolisacáridos (LG) (bacterias Gram negativas), peptidoglicano (PG), (bacterias Gram positivas), éstas son reconocidas por las proteínas de reconocimiento (PRPs), (proteína de enlace a péptido glicano PGBP), y las proteínas de enlace a lipopolisacárido y a β -1,3-glucano, LGBP y β GBP respectivamente. A su vez, estos complejos desencadenan la activación de una cascada de serin proteasas (SPs) (Abebe et al., 2010), dando lugar a la activación de la proenzima activante de proPO, PPAE, la cual convierte el zimógeno inactivo proPO en fenoloxidasa activa (PO) y ésta

actuando sobre fenoles produce quinonas. Estas moléculas pueden unirse con moléculas vecinas para formar melanina en torno a los microorganismos invasores. Existe una conexión entre el sistema de activación de proPO y la vía de señalización a través de receptores del sistema inmune (Toll (receptores glicoproteicos transmembrana que están en el dominio Toll)) por medio de las serin proteasas comunes que conduce a la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs). Estos mecanismos están apoyados en los trabajos publicados sobre el gusano de la harina *Tenebrio molitor* (Roh et al., 2009) y el gusano del tabaco *Manduca sexta* (An et al., 2010; Amparyup et al., 2013).

Otro proceso importante en insectos es la esclerotización de su cutícula, en este proceso intervienen: tirosinasa, peroxidasa y lacasa (Abebe et al., 2010). El proceso se inicia a partir de 1,2-dehidro-*N*-metildopamina, llevando consigo la formación de un dímero y posteriormente un polímero (Esquema 1.1 y 1.2).



Esquema 1.1. Mecanismo propuesto para explicar la formación de dímeros dehidro NADA por acoplamiento de radicales libres. Dehidro NADA es oxidada por lacasas a su radical libre. Después isomeriza a quinona metide. El acoplamiento de los radicales permite la generación del aducto quinona metide. Posteriormente el cierre del anillo genera el dímero benzodioxano dehidroNADA (Abebe et al., 2010).



Esquema 1.2. Mecanismo propuesto para la oligomerización de dehidro NADA por la acción de tirosinasa (Abebe et al., 2010).

Tirosinasa cataliza la oxidación de dehidro NADA produciendo la quinona metide imina amida (QMIM), el cual reacciona con la molécula original (en la ausencia de cualquier otro nucleófilo) generando el dímero benzodioxano (adición de dos grupos OH a los dos grupos reactivos de quinometano y la amida imina). Puesto que el dímero tiene dos grupos hidroxilo libres es similar a su catecol original. Cuando se producen suficientes dímeros en la mezcla de reacción, QMIM puede adicionar al dímero produciendo trímeros y otros productos poliméricos como se indica en el Esquema 1.2. Los números indican el peso molecular de cada oligómero (Abebe et al., 2010).

Tabla 1.2. Profenol oxidasas (proPO) de artrópodos (Cerenius y Söderhäll, 2004).

Organismos	Número de genes de proPO clonados	Sitio de ruptura para la conversión de proPO en PO	Referencias
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	1	Arg ¹⁷⁶ -Thr ¹⁷⁷	Aspán et al., 1995 Wang et al., 2001
<i>Bombyx mori</i>	2	ProPO-I: Arg ⁵¹ -Phe ⁵²	Schmid-Hempel y Ebert, 2003.
<i>Drosophila melanogaster</i>	3	Arg ⁵² -Phe ⁵³	Asada et al., 2003.
<i>Holotrichia diomphalia</i>	2	ProPO-I: Arg ⁵⁰ -Phe ⁵¹ , Arg ¹⁶² -Ala ¹⁶³ ProPO-II: Arg ⁵¹ -Phe ⁵²	Kim et al., 2002 Li et al., 2002

1.1.4. Tirosinasa de mamíferos

Las tirosinasas de mamíferos actúan sobre sus sustratos fisiológicos L-tirosina y L-dopa (Hearing y Ekel, 1976; Hearing et al., 1981). Las moléculas de esta enzima son glicoproteínas a las que se unen diversos azúcares en residuos de asparragina. El procesado de tirosinasa se produce en los polirribosomas donde, en primer lugar, se produce la síntesis de la parte proteica de la molécula. A continuación, la enzima se traslada al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi donde sufre diferentes modificaciones estructurales. Así, en este procesado, se incorpora una molécula de ácido siálico y cuatro azúcares (manosa, glucosamina, galactosa y fructosa) por cada molécula de tirosinasa (Ferrini et al., 1987). Con este procesado post-traducciona l tirosinasa pasa de tener 55000 daltons y un punto isoeléctrico (pI) de 4.2, a ser una molécula de 70000 daltons y con un pI de 3.3 (Burnett, 1971; Hearing et al., 1981; Laskin y Piccinini, 1986). Una vez se produce este procesado y la enzima ya está madura, se transporta por medio de vesículas a los melanosomas, donde permanece unida a la membrana de éstos y desde ahí participa en la ruta de biosíntesis de melaninas (Hearing y Jiménez, 1987).

La tirosinasa es la responsable de la conversión de L-tirosina en L-dopa y éste en o-dopaquinona. Esta o-dopaquinona formada se transforma, por medio de una serie de reacciones espontáneas no enzimáticas, en diferentes tipos de melaninas. Mutaciones en el gen que codifica a tirosinasa provocan la interrupción de la ruta de biosíntesis de melaninas (Camand et al., 2001) produciendo albinismo (Oetting, 2000). Se ha aislado y caracterizado el gen de tirosinasa en niños afectados por albinismo oculocutáneo, en los que no se detectaba actividad tirosinasa. El análisis secuencial mostró una simple inserción en el exón 2, lo que producía una señal de terminación prematura, que daba lugar a una molécula de tirosinasa inactiva (Tomita et al., 1989).

En organismos inferiores y en plantas, tirosinasa es el único enzima que controla la síntesis de melaninas. Sin embargo, en animales la duplicación del gen de tirosinasa da dos genes que codifican las proteínas relacionadas con tirosinasa (TRPs), con una gran similitud con tirosinasa como se muestra en la Figura 1.4. (Jackson, 1994; Olivares y Solano, 2009), aunque con diferentes funciones y capacidades catalíticas (Hearing y Tsukamoto, 1991; del Marmol y Beerman, 1996).

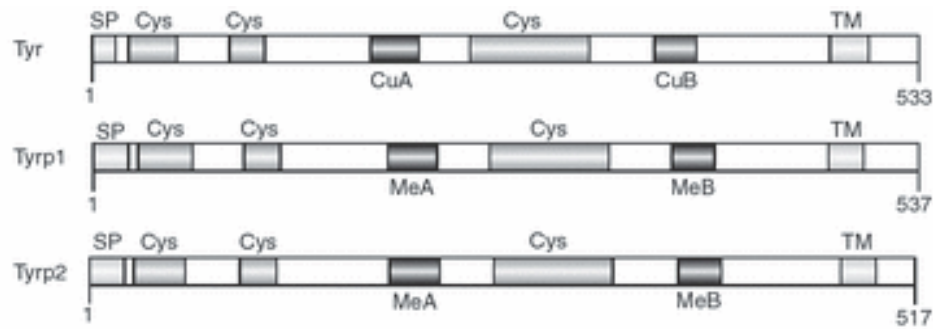


Figura 1.4. Representación esquemática de la tirosinasa de mamífero (Tyr) y las proteínas relacionadas (Tyrp1) y (Tyrp-2). La posición y numeración de los dominios correspondientes de estas proteínas en ratón son: SP, péptido señal; Cys, segmentos ricos en cisteína; Cu o Me, dominios de unión de cobre o metal; TM, fragmento transmembrana (Olivares y Solano, 2009).

Estas proteínas dirigen los intermedios quinónicos a un polímero más ordenado y estructuralmente diverso. TRP-2, también llamada dopacromo tautomerasa, cataliza el reagrupamiento no descarboxilativo de dopacromo a ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) (Aroca et al., 1990; Olivares y Solano, 2009). Sin embargo, TRP-1 tiene una función que todavía está sujeta a controversia, es una enzima importante para el tráfico de tirosinasa hacia el melanosoma (Jimbow et al., 1997). Las funciones de las tres enzimas están relacionadas con el cofactor metálico que utilizan: tirosinasa (cobre), TRP-2 (dopacromo tautomerasa) (zinc) y, probablemente, TRP-1 (cobre) (Olivares y Solano, 2009).

1.2. Tirosinasa: funciones fisiológicas

En este apartado se resumirán brevemente las funciones principales de los distintos tipos de tirosinasas de: bacterias, hongos, artrópodos y plantas. Se dedicará más extensión a tratar las funciones de la tirosinasa de mamíferos. Esta enzima que está distribuida en toda la escala filogenética, en principio, no tiene una función única, esto llevó a que Mayer en 1979 definiera a tirosinasa como “una enzima en busca de función” (Mayer y Harel, 1979; Mayer, 2006). Tirosinasa tiene diversas funciones, como se expone a continuación, pero muchas de ellas derivan de la generación de *o*-quinonas como producto de reacción, ya que estas *o*-quinonas son muy reactivas. Sin embargo, algunas tirosinasas se ha demostrado que tienen un papel específico en la biosíntesis de metabolitos (biosíntesis de betalainas, 3,3'-dihidroxicarbazona y sulfuretina) (Sullivan, 2015).

1.2.1. Tirosinasa de bacterias

En bacterias, la función de tirosinasa podría ser la defensa del microorganismo y sus esporas a la radiación ultravioleta, gracias al pigmento melanina (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 y 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.

-Distintos modelos para explicar la incorporación de cobre a tirosinasa en bacterias.

Para que la enzima exprese actividad es necesario que incorpore cobre al centro activo. En el caso de la enzima de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006) se ha determinado la estructura cristalina de tirosinasa libre de metal, con enlace al cobre en un complejo con ORF378, designada como una proteína “caddie”, aportando los dos átomos de cobre al sitio activo de la enzima (chaperona de cobre) (ver Figura 1.3). Estas estructuras sugieren que las proteínas “caddie” cubren la superficie hidrofóbica de tirosinasa e interfieren con el enlace al centro activo.

En la tirosinasa de *Bacillus megaterium* (Kanteev et al., 2013) se ha propuesto un camino diferente de incorporación de cobre a la enzima (Figura 2.1). Mediante estudios de mutagénesis dirigida, estos autores han demostrado, a partir de una serie de hechos experimentales, que los dos átomos de cobre Cu_A y Cu_B se incorporan por distintos mecanismos. En la región del Cu_A uno de los residuos coordinantes es His⁶⁰

(Figura 2.1(a)). Posteriormente His⁶⁰ interacciona con Met⁶¹ (Figura 2.1(b)), además de Met⁶¹, Met¹⁸⁴ toma parte en la unión del cobre, estos residuos transfieren el cobre hacia His⁶⁰ y ésta altera su conformación y transfiere el Cu_A al sitio activo. Para el acceso del Cu_B se ha propuesto una ruta a través de Asp²⁰⁵ y Phe¹⁹⁷ (Figura 2.1(a)). La sustitución de estos dos residuos afecta a la incorporación del cobre y a la actividad.

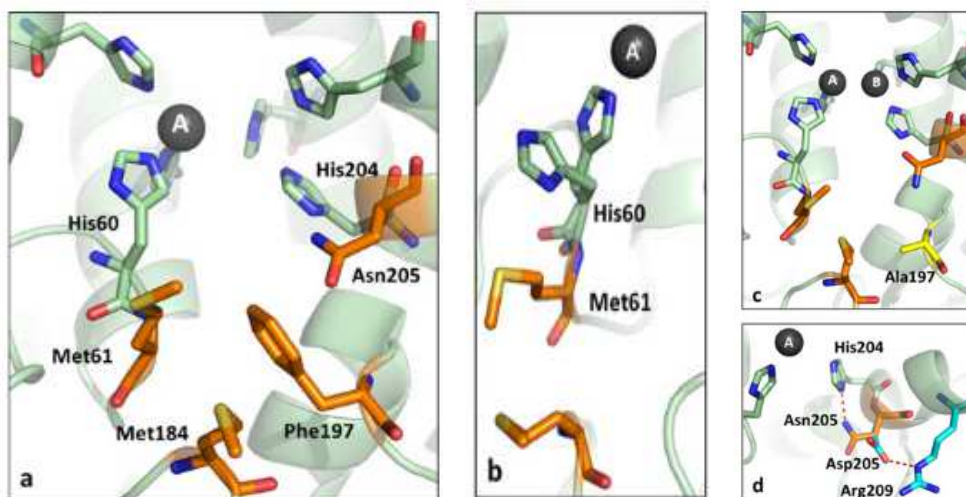


Figura 2.1. Estructura de la tirosinasa natural de *Bacillus megaterium* y sus mutantes. a) Sitio activo de la enzima y residuos adyacentes a él (PDB; 3NQ0). Los seis residuos de histidina que componen el sitio activo están representados en verde con un modelo de varillas. Los residuos Met⁶¹, Met¹⁸⁴, Phe¹⁹⁷, y Asn²⁰⁵ fueron estudiados usando mutagénesis dirigida y están representados en naranja con un modelo de varillas. Cu_A y Cu_B se muestran como esferas grises. b) Sitio activo del mutante V218F (PDB; 4HD4). Los residuos His⁶⁰ y Met⁶¹ se muestran en verde y naranja, respectivamente. El residuo His⁶⁰ se muestra en dos conformaciones, coordinando al Cu_A en el sitio activo o girado hacia Met⁶¹. c) Sitio activo del mutante F197A (PDB; 4J6T), con la alanina en esta posición en amarillo. d) Superposición de BmTYR salvaje (PDB; 3NQ0) y el mutante N205D (PDB; 4J6V). Los residuos de histidina, coordinando los iones de cobre, se representan en color verde mientras que Asn²⁰⁵, formando un puente de hidrógeno (línea roja discontinua) con His²⁰⁴, en naranja. El Asp²⁰⁵, perteneciente al mutante N205D, forma un puente de hidrógeno (línea roja discontinua) con Arg²⁰⁹; ambos residuos están mostrados en turquesa (Kanteev et al., 2013).

1.2.2. Tirosinasa de plantas y hongos

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 betalainas (Steiner et al., 1999; Strack et al., 2003; Sullivan, 2015). Por otra parte, Gandía-Herrero et al., en 2005, han 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 (Esquema 2.1).

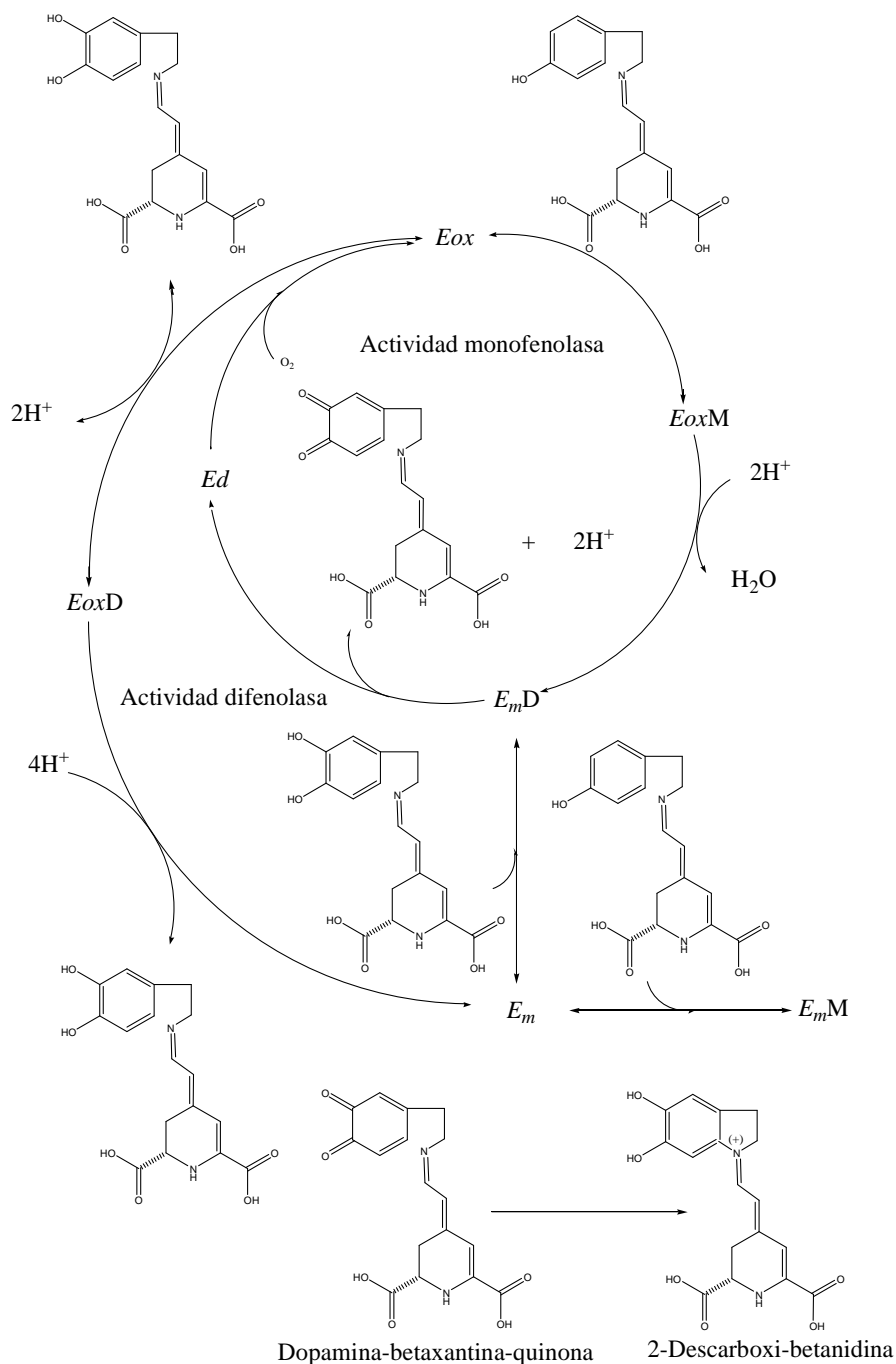
Se ha puesto de manifiesto la estereoespecificidad de la enzima de *Larrea tridentata*, la cual hidroxila el isómero (+)-larreatricina (Cho et al., 2003).

B. Reacciones de pardeamiento

Tirosinasa está implicada en el pardeamiento de frutas y hortalizas, pero se ha demostrado que no es el factor mayoritario (Zhou et al., 2003; Veltman et al., 1999). 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 (Noble y Burton, 1993; Nicolas et al., 1994; Soliva et al., 2003; 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 (Li y Steffens, 2002). En la Figura 2.2 se muestra la relación entre los cambios en los niveles de tirosinasa con sus distintos efectos.



Esquema 2.1. 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); E_m , metatirosinasa o forma oxidada de tirosinasa con Cu^{2+} - Cu^{2+} en el sitio activo; E_d , desoxitirosinasa o forma reducida con Cu^+ - Cu^+ en el sitio activo y E_{ox} , oxitirosinasa o forma oxidada y oxigenada con Cu^{2+} - Cu^{2+} en el sitio activo (Gandía-Herrero et al., 2005).

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* (Wang y 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 (Wang y 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 polifenol oxidasas muestran menos estrés oxidativo (Mayer, 1987).

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).

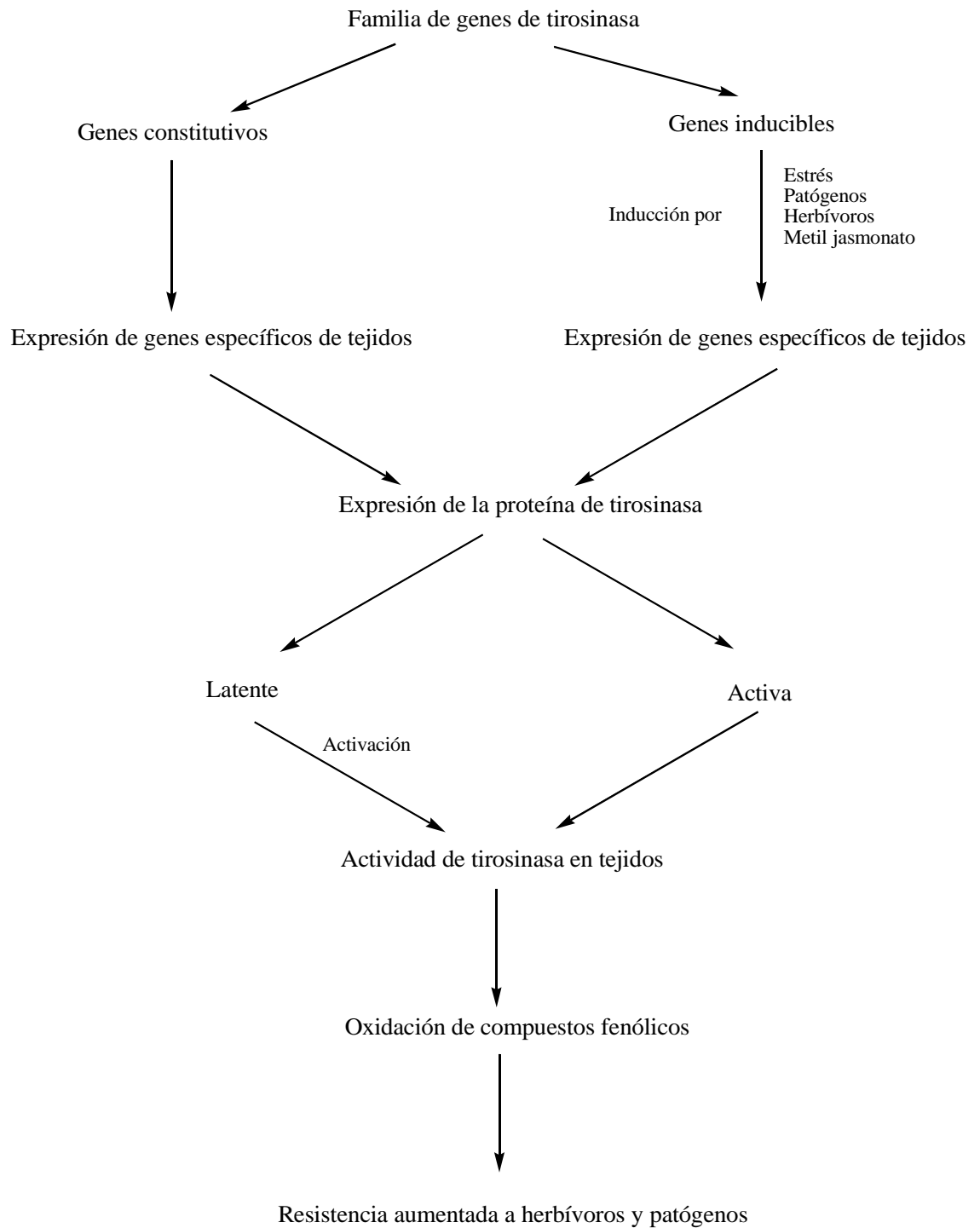


Figura 2.2. Relación entre los cambios en los niveles de la actividad de tirosinasa y algunas de sus funciones (Mayer, 2006).

-Posible mecanismo de incorporación del cobre al sitio activo en tirosinasa del hongo *Aspargillus oryzae*.

Los estudios realizados con el hongo *Aspergillus oryzae* (Fujieda et al., 2013a; 2013b) han puesto de manifiesto un posible mecanismo para explicar la incorporación del cobre a la enzima. 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 2.3).

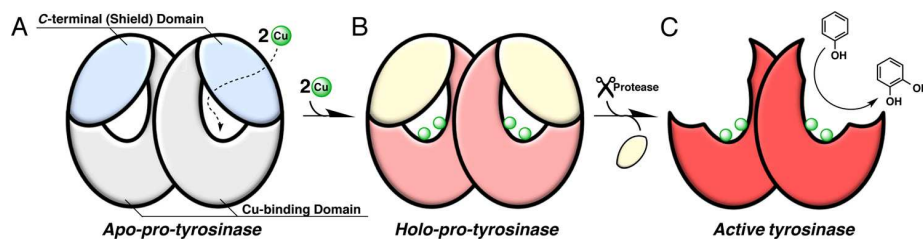


Figura. 2.3. Representación esquemática del proceso de maduración de tirosinasa en hongos (Fujieda et al., 2013a).

A partir de los resultados obtenidos, se propuso que la incorporación de los iones de cobre ocurre a través de tres cisteínas: Cis^{92} , Cis^{522} y Cis^{525} (Fujieda et al., 2013a). La región del Cu_A tiene dos cisteínas flexibles, Cis^{522} y Cis^{525} . El motivo $^{522}\text{CXXC}^{525}$ puede actuar como un ligando bidentado para el cobre (I), Figura 2.4 (A). Posteriormente, de forma transitoria, se ligan las tres cisteínas Figura 2.4 (B) y Figura 2.4 (C). El otro cobre (I) puede ser incorporado de manera similar, así los dos Cu (I) se sitúan en el Cu_A y Cu_B , y por reacción con oxígeno se llega al paso F (Figura 2.4 (F)).

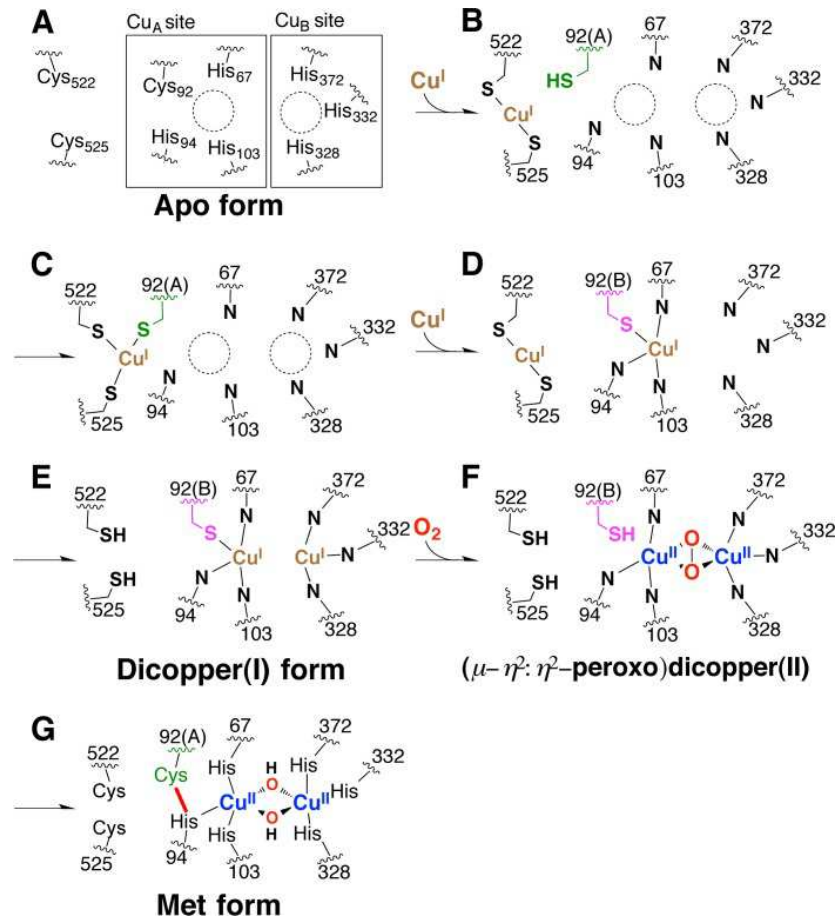


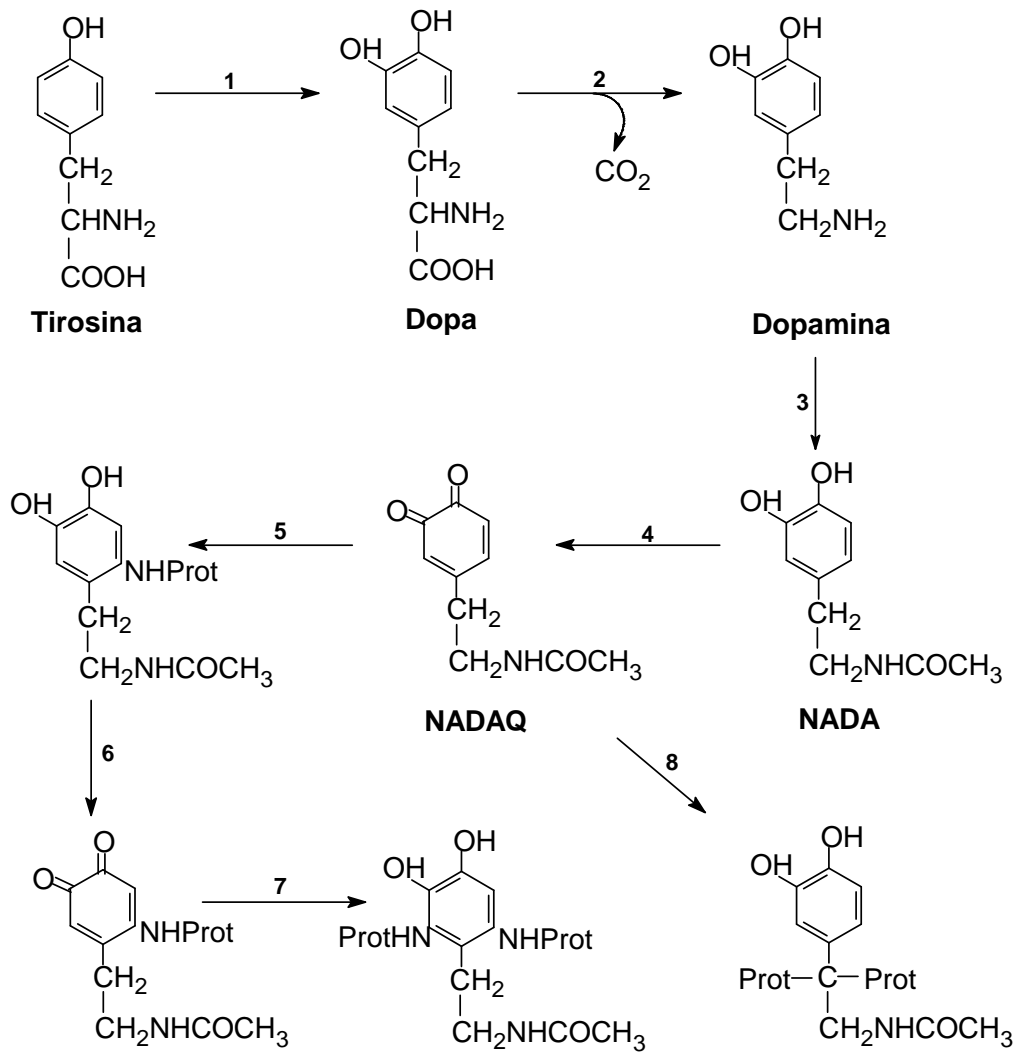
Figura 2.4. Representación esquemática de la posible incorporación del cobre a pro-tirosinasa de *Aspergillus oryzae* (Fujieda et al., 2013a).

1.2.3. Tirosinasa 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 que 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 (Sugumaran et al., 1991;

Sugumaran, 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, 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 NADA-quinona (NADAQ), debido a la acción de tirosinasa (Esquema 2.2). 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.

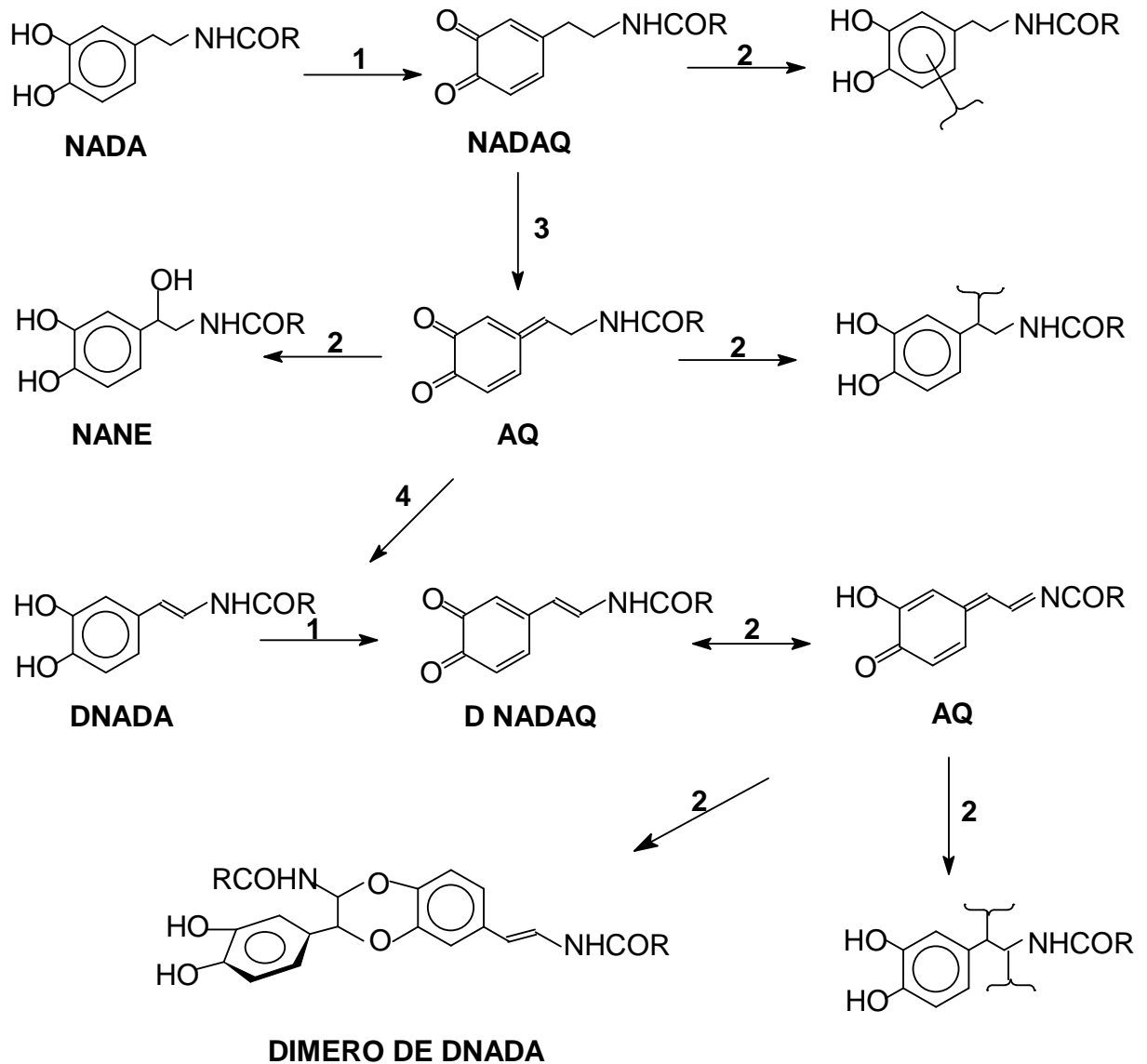


Esquema 2.2. Ruta propuesta para la intervención de tirosinasa en el proceso de esclerotización. Los pasos 1-4 están catalizados enzimáticamente, pudiendo estar implicada tirosinasa (Pryor, 1940).

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 saturación de su cadena lateral (ver Esquema 1.1). 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 (Sugumaran y 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 y Sugumaran, 1989; 1990), pudiéndose unificar las tres vías descritas en una ruta general de esclerotización (Esquema 2.3) (ver Esquema 1.2).



Esquema 2.3. 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 = dehidro-NADAQ; 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 (Sugumaran, 1991).

humana (hTir), los resultados descritos por estos autores pueden considerarse extrapolables. Recientemente se ha expresado la tirosinasa humana madura (RHT) recombinante en *Escherichia coli* (Chen et al., 2012). Así, la RHT podría ser usada para el estudio de inhibidores.

1.2.4.1. 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 2.6:

- 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 y 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 y Heath, 2000).

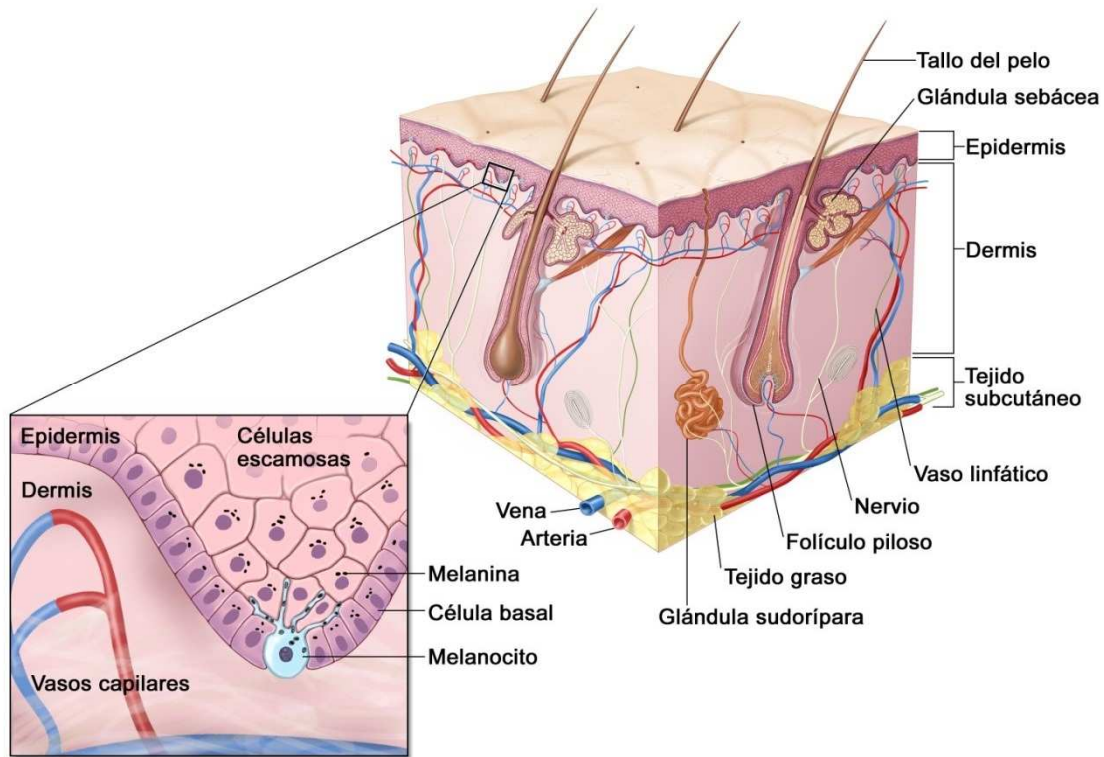


Figura 2.6. Representación de las diferentes capas de la piel (Epidermis/Dermis/Hipodermis (tejido subcutáneo)). Unión dermoepidérmica. Unión del melanocito con sus dendritas y queratinocitos. Transferencia de gránulos de melanosoma (Young y Heath, 2000).

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 2.6. 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 (La Bonne y Bronner-Frasser, 1998). Durante el desarrollo de los melanoblastos intervienen un cierto

número de factores de crecimiento y receptores (Baynash et al., 1994; Hosada 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 y 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 y 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 (Provance et al., 1996; Wu et al., 1997; Lambert et al., 1998; Hara et al., 2000; Sharlow et al., 2000; Vancoillie et al., 2000a; 2000b). La degradación de los melanosomas ocurre por la acción de la hidrolasa ácida lisosomal presente en los queratinocitos.

1.2.4.2. Tipos de melaninas

El estudio de las propiedades físicas y químicas de las melaninas, íntegras y degradadas, condujo al descubrimiento de tres tipos de melaninas (Prota, 1988; Lamoreux et al., 2001), Figura 2.7:

- (a) Eumelaninas: Pigmentos insolubles de color marrón a negro, con una estructura polimérica nitrogenada formada a partir de unidades indólicas. Es el responsable principal de la pigmentación de la piel, pero también puede encontrarse en el pelo.
- (b) Feomelaninas: Pigmentos solubles en bases fuertes, de color amarillo a pardo-rojizo, caracterizados por su alto contenido en azufre. Originan algunos tipos de coloraciones de cabello, labios, etc.
- (c) Tricocromos: Pigmentos fenólicos de bajo peso molecular que contienen el cromóforo Δ -bi-(1,4-benzotiazina).

Las (b) y (c) son responsables del pelo rojo (Ortonne y Prota, 1993). Muchas de las melaninas que aparecen son mezclas de eumelaninas y feomelaninas en proporciones variables.

En humanos, el grado de pigmentación de la piel y el pelo es dependiente del tamaño, número y distribución de los melanosomas, así como de la naturaleza química de las melaninas que contiene (Hearing, 1999). Entre los factores que regulan la cantidad y calidad de la melanina se incluyen RUV, α -MSH, ASP (Proteína Señalizadora Agouti), etc. Estos factores modulan la expresión de reguladores de los genes que sintetizan feo/eumelaninas. Existen estudios que apuntan que la interacción α -MSH y PSA es crucial para producir eumelanina o feomelanina (Bhardwaj y Luger, 1994; Barsh, 1996; Hartmeyer et al., 1997).

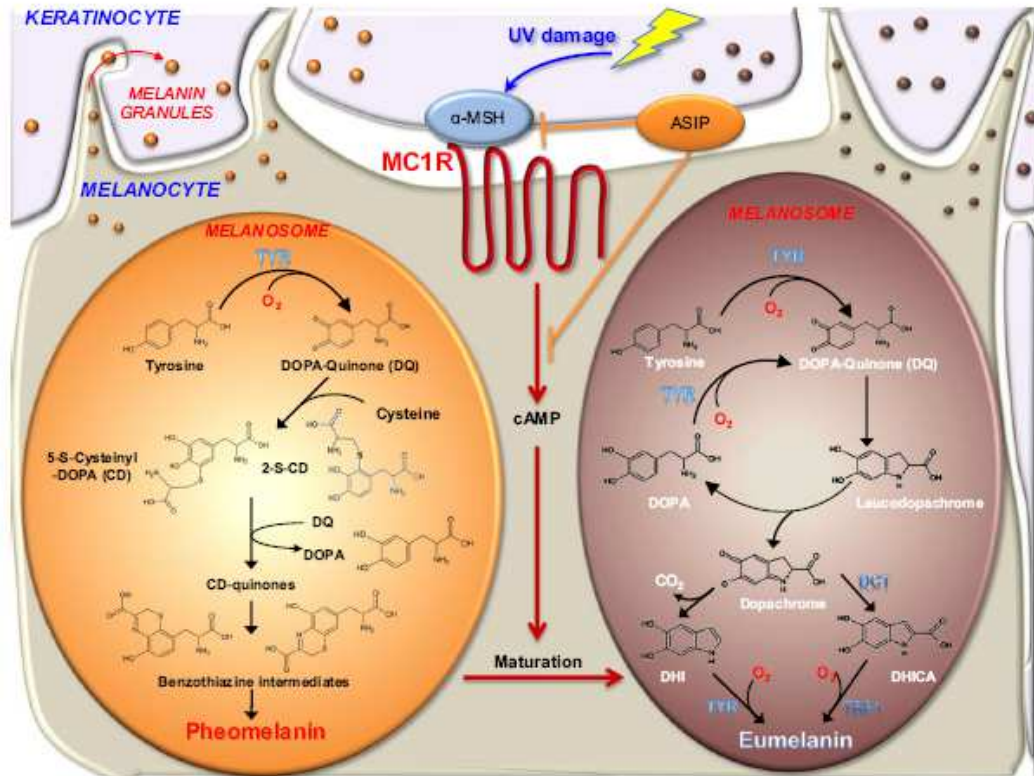


Figura 2.7. Rutas biosintéticas involucradas en la síntesis de eumelaninas y feomelaninas. Tirosinasa participa en ambas vías de biosíntesis, mientras que TRP1, DCT (TRP2) sólo en la síntesis de eumelaninas (no feomelaninas). MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos; péptido de señalización Agouti, ASIP (en humanos) y ASP (en ratones); α -MSH, hormona estimulante de melanocitos (Nasti y Timares, 2015).

1.2.4.3. Feomelaninas y su papel en el cáncer de piel inducido por la radiación UV

Las personas de piel clara son 70 veces más propensas a desarrollar cáncer de piel en comparación con las personas de piel oscura (Halder y Bang, 1988). Los efectos beneficiosos de las melaninas se deben principalmente a la presencia de eumelanina que sirve para dispersar y absorber entre el 50-75% de la radiación ultravioleta (RUV) y eliminar los radicales libres generados por los rayos UV; por lo tanto, protegen contra daños generados por RUV en capas más profundas (Brenner y Hearing, 2008). En algunos individuos de piel clara existe un mayor índice en el turnover de la eumelanina en queratinocitos, debido al aumento de la degradación de ésta por enzimas lisosomales, por lo que, la fotoprotección en estos individuos está disminuida (Szabó et al., 1969; Brenner y Hearing, 2008).

Efectos beneficiosos de las eumelaninas

Se estudió si la disminución de eumelaninas se asociaba a mayor riesgo de cáncer de piel o si por el contrario las feomelaninas, por sí mismas, aumentaban el factor de riesgo de producir cáncer. Estos estudios sugieren que hay mayor contenido en feomelaninas en nevus atípicos y melanomas, comparando con melanocitos normales del mismo paciente; sin embargo, las células de melanoma tienen menos feomelanina que en los nevus atípicos. Aunque no se entiende muy bien por qué las células de melanoma tienen menos pigmento, algunos investigadores sugieren que la alta división de células de melanoma diluye el pigmento (Pavel et al., 2004). Los ratones que tienen mutaciones del gen BRAF activado son susceptibles a una baja tasa del desarrollo de melanoma espontáneo. Cuando se introduce la mutación inactivante de MC1R (receptor de melanocortina), ya no se produce más eumelanina, los melanosomas se enriquecen más en feomelaninas y el resultado es un aumento en melanoma espontáneo (Mitra et al., 2012). Como ese modelo no depende de la exposición a agentes carcinogénicos, tales como RUV, se propuso que el mecanismo de aumento de melanomagénesis se debía a un incremento en el daño oxidativo generado por las feomelaninas (Mitra et al., 2012). Cuando el gen para tirosinasa se elimina en estos ratones se produce una pérdida de la producción de feomelaninas y esto lleva consigo que disminuya la susceptibilidad a melanoma. La presencia de feomelaninas está fuertemente implicada en la patogénesis del desarrollo de melanoma. Aunque las RUV siguen siendo un factor importante de la melanomagénesis, este estudio describe cómo nevus y melanomas pueden desarrollarse en zonas que no están expuestas al sol (Mitra et al., 2012).

La función de feomelanina no se entiende completamente. Los melanosomas que contienen feomelaninas son generalmente pequeños y ovalados, en contraste con la forma alargada de los melanosomas que contienen eumelanina. Por lo tanto, se piensa que la feomelanina puede tener un papel en la preparación del melanosoma para la síntesis de eumelaninas y puede actuar como un soporte para la polimerización de eumelanina y su depósito (Simon et al., 2009; Greaves, 2014).

Mecanismo de tumorigénesis inducido por feomelaninas

Algunos de los mecanismos por los que las feomelaninas promueven carcinogénesis pueden estar relacionados con el aumento de la producción de ROS (Reactive Oxigen Species, especies reactivas de oxígeno) que está asociado con su síntesis. La síntesis de feomelaninas lleva consigo la reducción de los retiradores de ROS tales como el glutatión, haciendo a los melanocitos más vulnerables a sufrir

daños (Morgan et al., 2013). La generación de feomelaninas utiliza cisteína generada por el glutatión. Por lo tanto, la síntesis de feomelaninas puede reducir las reservas de glutatión y hacer melanocitos más susceptibles al daño del ADN y la inestabilidad genética. Muchos estudios han demostrado esta correlación entre las feomelaninas, el agotamiento de glutatión y el estrés oxidativo (Galván y Moller, 2011; Galván et al., 2012; Morgan et al., 2013).

El mecanismo de formación de ROS dependiente de feomelaninas ocurre con o sin RUV (Ranadive et al., 1986; Morgan et al., 2013). Se cree que el azufre en el anillo aromático de feomelaninas disminuye su potencial de ionización, lo que les hace menos estables y más eficientes para la generación de radicales libres, en comparación con eumelaninas (Ranadive et al., 1986; Thody et al., 1991; Ancans et al., 2001; Morgan et al., 2013). En muchos estudios se han propuesto mecanismos por los que las feomelaninas llevan asociadas la generación de ROS. No se entiende bien cómo las feomelaninas producen ROS. Algunos trabajos sugieren que el zinc, que está presente en cantidad en el pelo rojo, puede ayudar a las feomelaninas en la producción de altos niveles de ROS, incluso en la presencia de luz visible (Panzella et al., 2010; Morgan et al., 2013). El zinc aumenta el consumo de oxígeno y la producción de superóxido por feomelaninas después de la irradiación con UVA y luz visible. La fotorreactividad de las feomelaninas es mayor en la presencia de zinc que en su ausencia. Este aumento de la fotorreactividad es debido a los cambios inducidos por el zinc en la estructura de las feomelaninas. Además, se ha demostrado que la radiación nuclear y el ruido median en la producción de ROS en aves y cerdos con altas cantidades de feomelaninas, lo que indica que las feomelaninas no requieren energía electromagnética para producir ROS (Barrenäs y Holgers, 2000; Galván y Moller, 2011; Morgan et al., 2013). La detección de feomelaninas en los núcleos de las células de melanoma es controvertido y, por lo tanto, su capacidad para dañar directamente el genoma es discutible (Morgan et al., 2013).

Efectos sobre el sistema inmunitario

Otro mecanismo por el cual las feomelaninas pueden promover el desarrollo de tumores es a través de su efecto indirecto sobre el sistema inmune. Estudios en varios animales y, en concreto, con pájaros, sugieren que hay algunos efectos de melaninas sobre la respuesta inmune. Se sabe que las células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC) son inducidas después de la exposición a la RUV y que son potentes inhibidoras de la inmunidad antitumoral mediada por células T (linfocitos T). Su actividad inhibitoria es atribuida a la producción de arginasa, ROS, a la inducción de la óxido nítrico sintasa y al bloqueo de la activación de células T (linfocitos T) limitando la

disponibilidad de cisteína (Srivastava et al., 2010). Cisteína es un aminoácido esencial para la activación de células T, porque las células T pierden la enzima cistationina- β -sintasa que convierte metionina en cisteína (Srivastava et al., 2010). Las células T requieren cisteína en el sitio de acción. Por lo tanto, en tejidos donde las feomelaninas son abundantes, cisteína puede estar limitada y la capacidad de las células T locales, para erradicar células mutadas, puede estar disminuida. Por otra parte, el incremento de las concentraciones de ROS asociado con las feomelaninas inhiben la función de las células CD8⁺T, lo cual está indicado para reducir la expresión de CD3 así como IFN γ (interferón gamma, activación de macrófagos) (Kusmartsev et al., 2004). Otros mecanismos involucran la nitración y nitrosilación de componentes del receptor de células T (TCR), de este modo se inhibe la activación de células T (Gabrilovich et al., 2012). La cantidad de ROS es muy importante en la diferenciación de macrófagos de fenotipo M2, asociado a tumor (TAMs) (Zhang et al., 2013) (Figura 2.8).

Los efectos de feomelaninas y eumelaninas sobre el sistema inmune pueden ser vistos extensamente a través de la escala filogenética. Por ejemplo, la coloración de melanina en las plumas del vientre de la golondrina común (*Hirundo rustica*) tienen un efecto sobre su inmunidad adquirida (Saino et al., 2013). Estudios en diferentes especies sugieren que aquellos con mayor contenido en eumelaninas poseen propiedades inmuno activantes, protegen contra la supresión de la inmunidad inducida por UV (Ito y Fujita, 1985; van Nieuwpoort et al., 2004; Roulin et al., 2000).

Otro punto importante es que la luz solar es requerida en humanos para activar a los precursores de la síntesis de vitamina D. Así, la eficacia de la penetración de RUV en el tejido de la piel es influenciada por una variedad de factores, incluyendo la pigmentación de la piel (Aranow, 2011). Como eumelanina absorbe RUV, esto tiene un gran efecto sobre la síntesis de precursores de la vitamina D desde 7-dihidrocolesterol (Aranow, 2011). En latitudes altas (donde los rayos del sol son menos potentes), las personas con piel oscura son propensas a tener un déficit de vitamina D. La vitamina D tiene numerosos efectos sobre el sistema inmunitario. Se ha demostrado que los monocitos de humanos producen péptidos antimicrobianos después de la exposición a la vitamina D (Hewison et al., 2006; Liu et al., 2006). Otros estudios muestran que no sólo inhibe la diferenciación de células B (linfocitos B), la proliferación y la secreción de inmunoglobulinas, sino que también suprime la proliferación de células T (Bhalla et al., 1984). Esto produce un cambio en la diferenciación de las células T en los fenotipos de Th1 a Th2 (Mattner et al., 2000; Boonstra et al., 2001) y facilita el desarrollo de células T supresoras reguladoras (Tregs, suprimen la activación del sistema inmunitario) (Gorman et al., 2007). Las células dendríticas, tratadas con vitamina D,

producen un incremento en los niveles de IL-10 (interleuquina 10, un potente supresor de citoquinas) y reducen los niveles de IL-12 (el cual activa a células inmunes) (Penna y Adorini, 2000; Gorman et al., 2007).

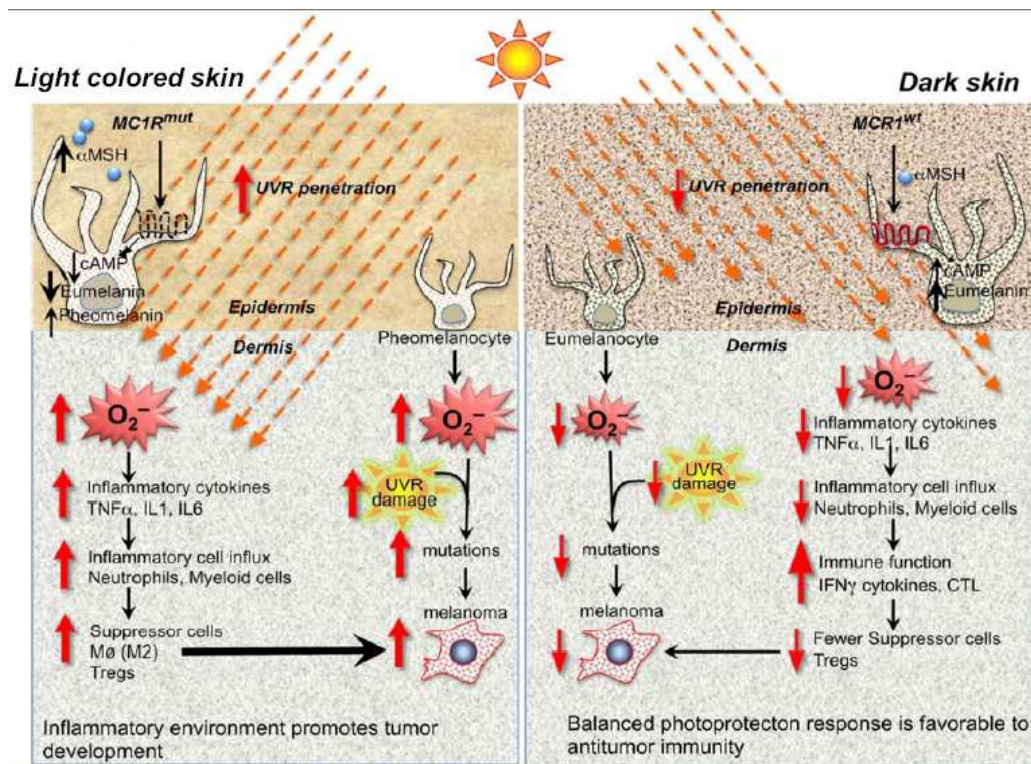
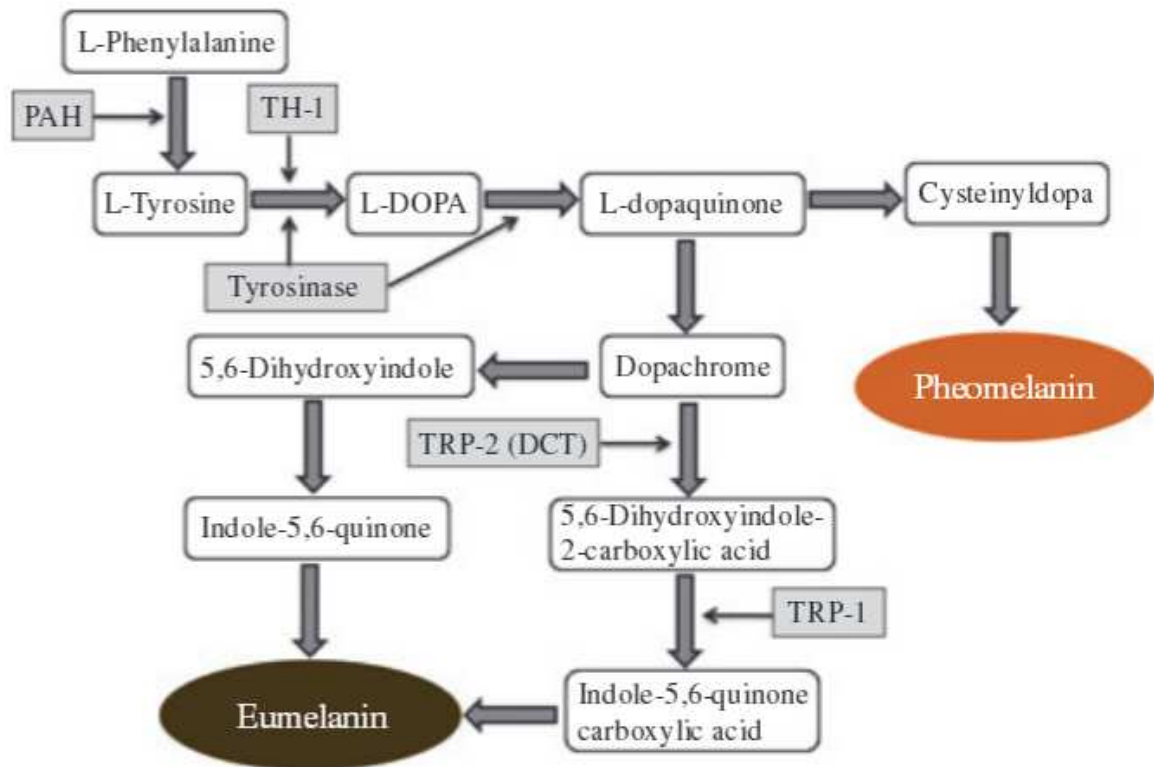


Figura 2.8. Sistema inmune en individuos con piel oscura y clara. En individuos de piel oscura después de RUV hay una ligera inflamación, poca producción de ROS y una mayor actividad de células T (mayor respuesta de IFN-γ) que pueden eliminar las células mutadas. Además, la alta señalización de MC1R en células endoteliales disminuye el nivel de la selectina-E, de la molécula de adhesión vascular celular (VCAM), y de las moléculas de adhesión intracelular (ICAM), y una menor infiltración de macrófagos y neutrófilos. Así, los niveles de citoquinas proinflamatorias y protumorigénicas son bajos. Todo esto da lugar a un ambiente favorable para la inmunidad antitumoral. Los individuos con piel clara tienen una alta respuesta inflamatoria, alta generación de ROS y reducción de los depósitos de cisteína, lo cual da lugar a la inhibición de células T. Una alta infiltración de neutrófilos y macrófagos genera un entorno que es dirigido por las células mutadas a propagar y dar lugar a la propagación del tumor (Nasti y Timares, 2015).

1.2.4.4. El papel clave de tirosinasa en la melanogénesis

Durante su desarrollo el melanosoma adquiere tres metalo enzimas melanogénicas: tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa 1 (TRP-1) y proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2). En mamíferos, estas tres enzimas altamente similares están implicadas en el control catalítico de la melanogénesis (Jimbow et al., 1994). La TRP-2, también llamada “dopacromo tautomerasa”, cataliza la tautomerización de dopacromo en un intermedio más estable llamado ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (Esquemas 2.4-2.6) (Aroca et al., 1990). La decarboxilación espontánea del dopacromo (Esquemas 2.4-2.6) puede también ocurrir dando 5,6-dihidroxiindol (DHI). TRP-1 de ratón, pero no tirosinasa, cataliza la conversión de DHICA a 5,6-quinona-2-carboxílico. En humanos TRP-1 no muestra actividad DHICA oxidasa, pero tirosinasa humana si lo hace (Olivares et al., 2001; García-Borrón y Solano, 2002). Tirosinasa es la enzima más importante de las tres para la melanogénesis.

Las enzimas melanogénicas se sintetizan en el ribosoma y en el retículo endoplásmico sufren modificaciones post-traduccionales, entre las que se encuentran la formación de puentes disulfuro, la *N*-glicosilación y la oligomerización de proteínas. Posteriormente, las proteínas se transportan al aparato de Golgi, donde vuelven a ocurrir más modificaciones y probablemente adquieren el metal que actúa como cofactor. Si estos procesos no son correctos, la proteína no irá del retículo endoplásmico al Golgi, sino que irá dirigida al citosol y será degradada por el proteosoma. Si son correctos, se empaquetan en vesículas hacia el melanosoma. La *N*-glicosilación, en animales, se dirige hacia una diana (Asn-X-Thr/Ser), donde X no puede ser Pro. La glicosilación es importante, puesto que serán reconocidos por chaperonas que contribuyen al plegamiento (Ferrini et al., 1987; Hearing y Jiménez, 1987; Petrescu et al., 2000). Una vez en el melanosoma, encontramos tres dominios de tirosinasa, uno interno, cuyos residuos están libres en el interior, uno transmembrana y otro citoplasmático (Park y Gilchrest, 1999). Alrededor del 90% de los sitios activos del Cu se encuentran en el interior. El dominio citoplasmático ayuda al transporte desde el retículo endoplásmico rugoso, a través del Golgi, al melanosoma (Vijayasaradhi et al., 1995). La PKC- β (protein quinasa C β) es una señal de transducción de la enzima requerida para la activación de la tirosinasa (Park y Gilchrest, 1999). Se localiza con tirosinasa en la membrana del melanosoma y la activa, fosforilando los residuos serina en el dominio citoplasmático C-terminal. La melanogénesis comienza con la oxidación, de monofenoles (L-tirosina) y/o *o*-difenoles (L-dopa) por oxígeno molecular, que proporciona las correspondientes *o*-quinonas.



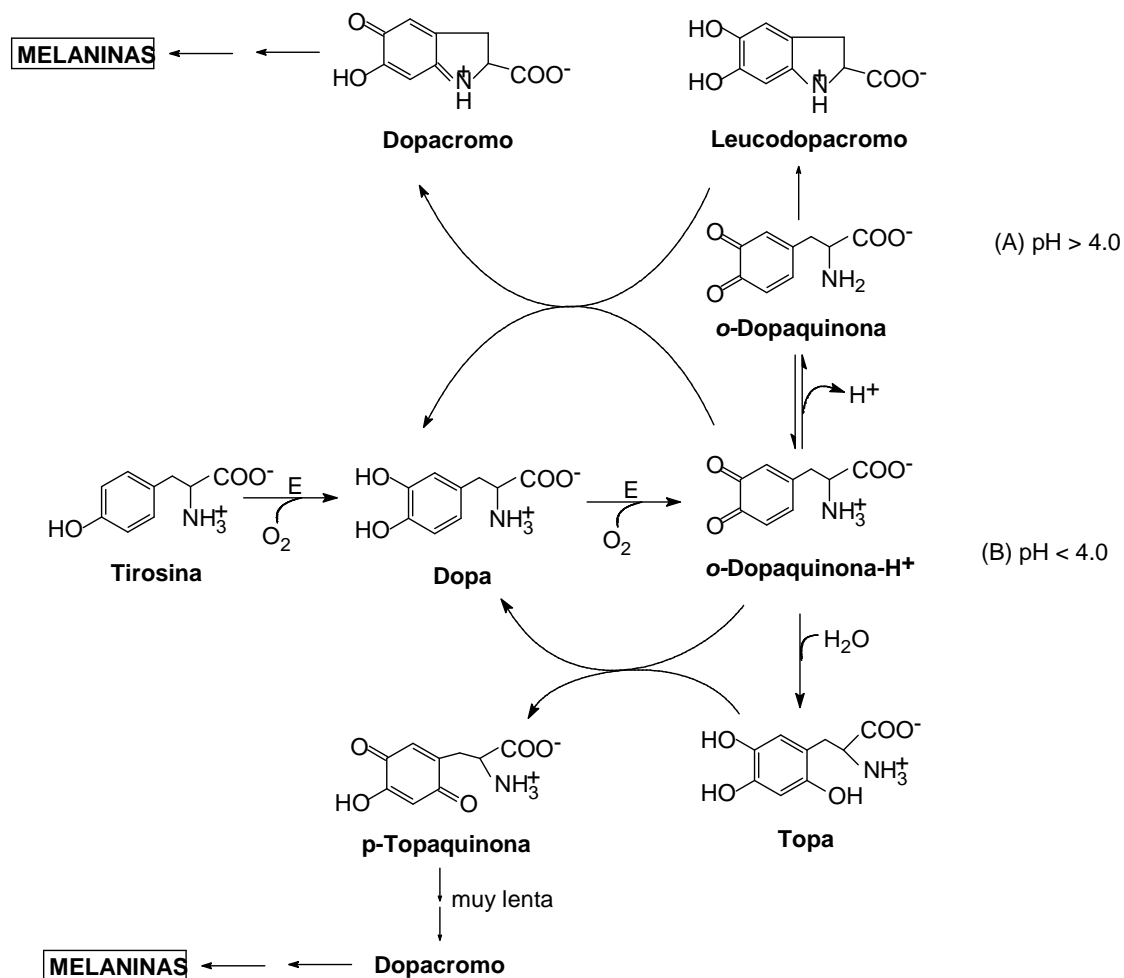
Esquema 2.4. Principales rutas biosintéticas de melaninas (Gillbro y Olsson, 2011).

En ambos casos, las *o*-quinonas evolucionan, a través de reacciones enzimáticas acopladas, hacia la formación de melaninas (Robb, 1984). Estas *o*-quinonas son el intermedio clave de la ruta melanogénica, y han sido descritas tres rutas distintas para su evolución (Esquemas 2.4-2.6):

- Ciclación de *o*-dopaquinona a dopacromo y generación posterior de eumelaninas.
- Adición de compuestos azufrados a *o*-dopaquinona, formándose feomelaninas y tricocromos.
- Adición de agua al anillo quinónico, generándose compuestos trihidroxilados.

Para la síntesis de eumelaninas, la *o*-dopaquinona sufre una ciclación espontánea, previa desprotonación del grupo amino, para generar ácido 5,6-dihidroxiindolil-2-carboxílico (leucodopacromo). A continuación, hay una reacción redox, espontánea y muy rápida, entre leucodopacromo y *o*-dopaquinona, para dar

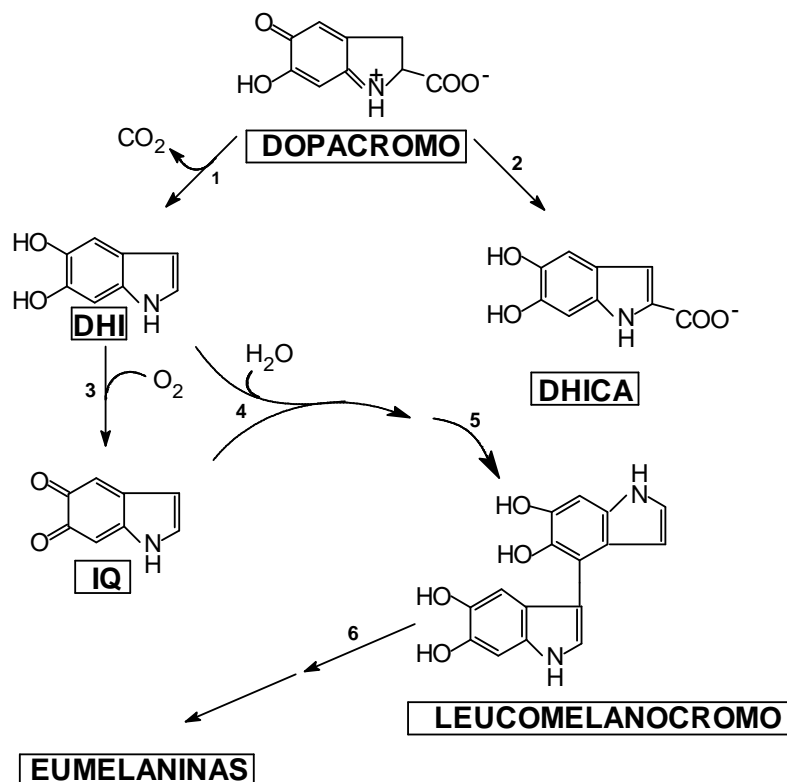
dopacromo y regenerar dopa (Esquema 2.5) (Lerner y Fitzpatrick, 1950; García-Cánovas et al., 1982; Serna-Rodríguez et al., 1990; García-Moreno et al., 1991; Rodríguez-López et al., 1991a).



Esquema 2.5. Rutas propuestas para la oxidación de tirosina hasta dopacromo catalizada por tirosinasa a diferentes valores de pH. E = tirosinasa. A valores de pH > 4.0 predomina la contribución de la ruta de ciclación (A), mientras que a valores de pH < 4.0 participan significativamente las rutas de ciclación y de hidroxilación (A y B) (García-Cánovas et al., 1982).

Dopacromo se transforma lenta y espontáneamente en 5,6-dihidroxiindol (DHI), que se oxida a 5,6-indolquinona (IQ), en una reacción que podría ser catalizada por tirosinasa (Körner y Pawelek, 1980) o por TRP-1 (Solano et al., 1994). La IQ es un compuesto muy reactivo, que puede reaccionar con intermedios de la ruta,

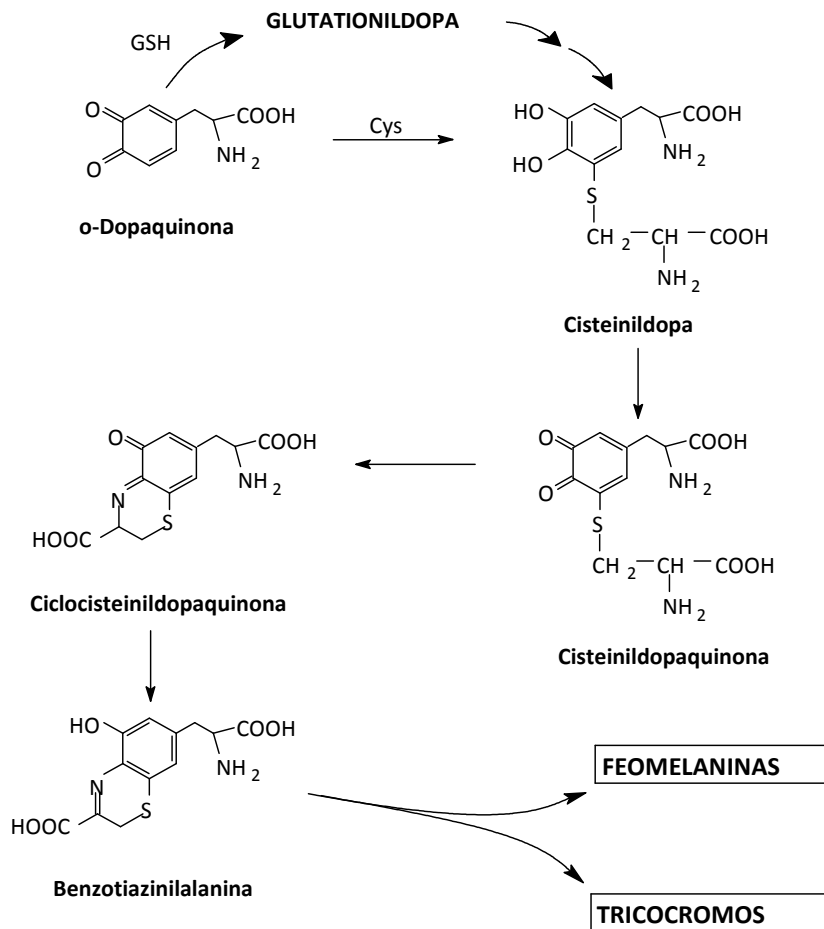
principalmente con DHI (Lambert et al., 1989), para dar lugar a un proceso polimerizante que conduce a la formación de eumelaninas (Esquema 2.4).



Esquema 2.6. Rutas de evolución de dopacromo (Lambert et al., 1989). Las etapas 1, 4, 5 y 6 son espontáneas, mientras que las 2 y 3 podrían estar catalizadas enzimáticamente. En la etapa 2, la enzima implicada sería la dopacromo tautomerasa (TRP2) (Barber et al., 1984; Jiménez-Cervantes et al., 1994), mientras que en la 3 sería tirosinasa o TRP1 (Körner y Pawelek, 1982; Olivares et al., 2001).

Dopacromo tautomerasa (TRP-2) cataliza la reacción 2 y consigue la aceleración de la ruta de biosíntesis de melaninas en combinación con tirosinasa humana (Olivares et al., 2001). La participación de dopacromo tautomerasa en la melanogénesis afecta a las propiedades del polímero melánico (Orlow et al., 1992; Kushimoto et al., 2001) y, al mismo tiempo, la desviación de la ruta hacia la formación de DHICA evita la generación de compuestos citotóxicos (Olivares et al., 2001). Se ha demostrado la formación de peróxido de hidrógeno en la ruta de biosíntesis de melaninas (Muñoz-Muñoz et al., 2009b).

Si en el medio de reacción existe cualquier compuesto que contenga grupos tioles, tales como el tripéptido fisiológico glutatión o el aminoácido cisteína, la *o*-dopaquinona sufre una adición nucleofílica del grupo tiol, para producir cisteinildopa o glutationildopa. Esquema 2.7, este grupo puede adicionarse a varias posiciones del anillo aromático de la *o*-dopaquinona, pero la posición más favorable es la 5.



Esquema 2.7. Ruta de biosíntesis de feomelaninas. Cisteína (Cys) y glutatión (GSH) se adicionan a *o*-dopaquinona, obteniéndose 5-cisteinildopa como producto mayoritario. Tras una serie de reacciones se forman las feomelaninas y tricocromos (Prota, 1980).

1.2.4.5. Regulación de la melanogénesis.

La melanogénesis en mamíferos se puede resumir en las siguientes etapas:

- Paso I → Migración de melanoblastos de la cresta neural.
- Paso II → Diferenciación de melanoblasto a melanocito. Poblaciones clonales de piel por melanocitos.
- Paso III → Formación de la matriz del melanosoma.
- Paso IV → Inducción de genes melanogénicos, como tirosinasa, proteínas relacionadas con tirosinasa y matriz melanosomal. Se sintetizan tirosinasa y proteínas relacionadas con tirosinasa.
- Paso V → Procesado postranslacional y glicosilación de tirosinasa y proteínas relacionadas.
- Paso VI → Fusión de vesículas para formar melanosomas e iniciar la melanogénesis.
- Paso VII → Control de actividad tirosinasa.
- Paso VIII → Control de la actividad de las proteínas relacionadas con tirosinasa.
- Paso IX → Modificaciones del procesado post-síntesis.
- Paso X → Modificación de melanina.
- Paso XI → Transferencia del melanosoma al queratinocito.
- Paso XII → Degradación del melanosoma.
- Paso XIII → Eliminación de la melanina con pérdida de las células queratinizadas (estrato córneo).

A continuación, se describen distintos factores que influyen en la melanogénesis.

A. Papel de las radiaciones ultravioleta en la melanogénesis

El grado de pigmentación, en mamíferos, puede aumentar por la exposición a radiación ultravioleta. Las radiaciones ultravioletas, que se corresponden con longitudes de onda de 10-400 nm, tienen dos efectos sobre la pigmentación, bien sean de tipo A (longitudes de onda 315-400 nm) o de tipo B (longitudes de onda 280-315 nm), Figuras 2.9 y 2.10. Las radiaciones ultravioleta A (UVA) producen una pigmentación inmediata, resultado de la translocación del melanosoma desde el área perinuclear al área de las dendritas. Este fenómeno ocurre tras unos segundos de exposición a UVA (320-400 nm). Las radiaciones ultravioletas B (UVB) tienen un efecto más tardío, 2-3 días, y su acción principal es incrementar el número de melanocitos y el número de melanosomas, en dichos melanocitos y queratinocitos.

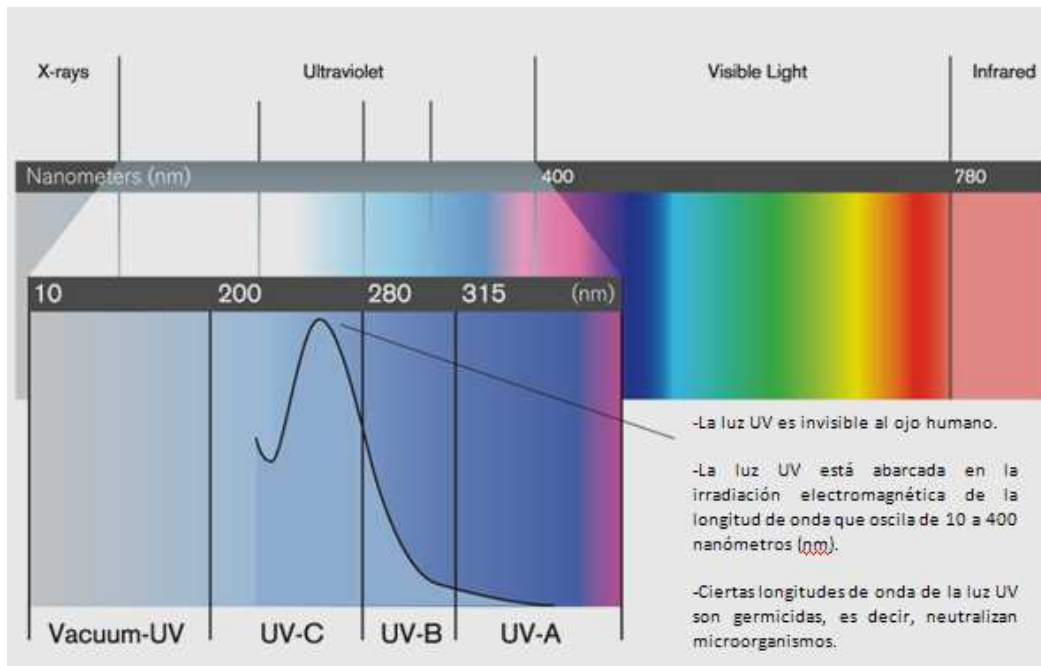


Figura 2.9. Espectro electromagnético.

La radiación UVB es absorbida directamente por el ADN celular, dando lugar a la formación de fotoproductos de ADN, principalmente dímeros de timina (Hearing y Jiménez, 1987). Las longitudes de onda, que intervienen en el oscurecimiento de la piel, son las mismas que las que producen los dímeros de timina (Freeman et al., 1989), Figura 2.10. El tratamiento de los melanocitos con agentes que actúan exclusivamente dañando el ADN, también estimulan la melanogénesis (Eller et al., 1996).



Figura 2.10. Distintas tonalidades de coloración de piel humana.

El gen supresor de tumores p53 activado regula positivamente los niveles de ARNm de tirosinasa, aumentando la melanogénesis (Gilchrest et al., 1996; Eller y Gilchrest, 2000; Nylander et al., 2000; Khlgatian et al., 2002). Cui et al., en 2007, encontraron una secuencia consenso p53, en el gen promotor de la proopiomelanocortina (POMC). Después de la irradiación UV en ratones, se estimula la transcripción del promotor de POMC en queratinocitos, incrementando la liberación de α -MSH (hormona melanocito estimulante), inductora de la melanogénesis. La α -MSH estimula el receptor de melanocortina-1 (MC1R) de melanocitos, aumentando la síntesis de eumelanina (Cui et al., 2007). p53 regula transcripcionalmente el factor hepatocítico nuclear 1 α (HNF-1 α ; Heptocitic nuclear factor-1 α) en melanocitos, para aumentar la transcripción de tirosinasa (Schallreuter et al., 2003; 2008), Figura 2.11. Recientemente se ha demostrado que TRP-2, que es una proteína implicada en la síntesis de melanina, no interviene en la represión de la proteína supresora de tumores p53 (Houben et al., 2014).

El melanoma es un tumor agresivo en el que se expresa la pigmentación por tirosinasa. La expresión de tirosinasa aumenta durante la tumorigénesis, esto permitiría terapias dirigidas hacia la enzima. Estas aproximaciones terapéuticas deberían llevar consigo rutas mediadas por p53 de una forma directa o indirecta. El flavonoide quercetina induce la estabilización de p53 y esto posibilita la utilización de los bioflavonoides en la dieta, como un complemento a los tratamientos convencionales del cáncer (Vargas et al., 2011).

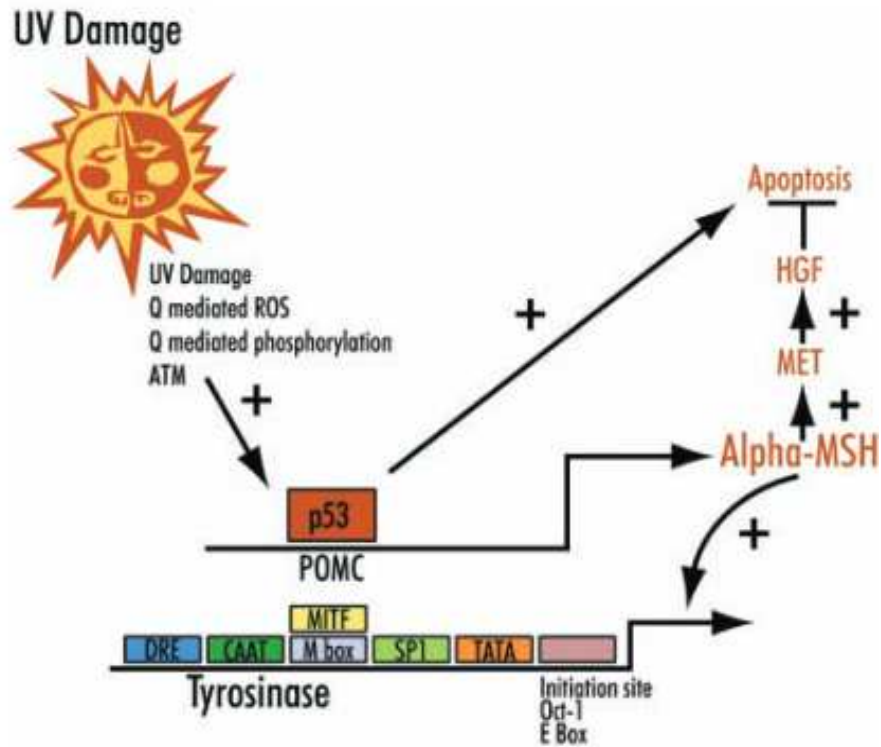


Figura 2.11. Promotor de tirosinasa, potenciadores y dominios de proteínas. La inducción de tirosinasa implica muchos factores de transcripción, incluyendo p53. La expresión de POMC puede conducir a la expresión de tirosinasa, pero esto también puede prevenir la apoptosis. Claramente existe un balance a considerar a la hora de poder desarrollar unas estrategias terapéuticas u otras (Vargas et al., 2011).

Adicionalmente, las radiaciones UV también afectan a los lípidos de la membrana plasmática que liberan diacilglicerol (Punnonen y Yuspa, 1992), que pueden activar PKC- β , la cual estimula la melanogénesis (Park et al., 1993; 1999).

B. PKC- β y activación de tirosinasa

PKC- β es una proteína quinasa, que está involucrada en la regulación de la actividad de tirosinasa, mediante la fosforilación de residuos serina del dominio citoplasmático de ésta (Park et al., 1993; Park et al., 1999). PKC- β activada está asociada con la membrana melanosomal y se encuentra sólo en los melanocitos, no en queratinocitos epidérmicos ni fibroblastos (Park et al., 1999) Figura 2.12.

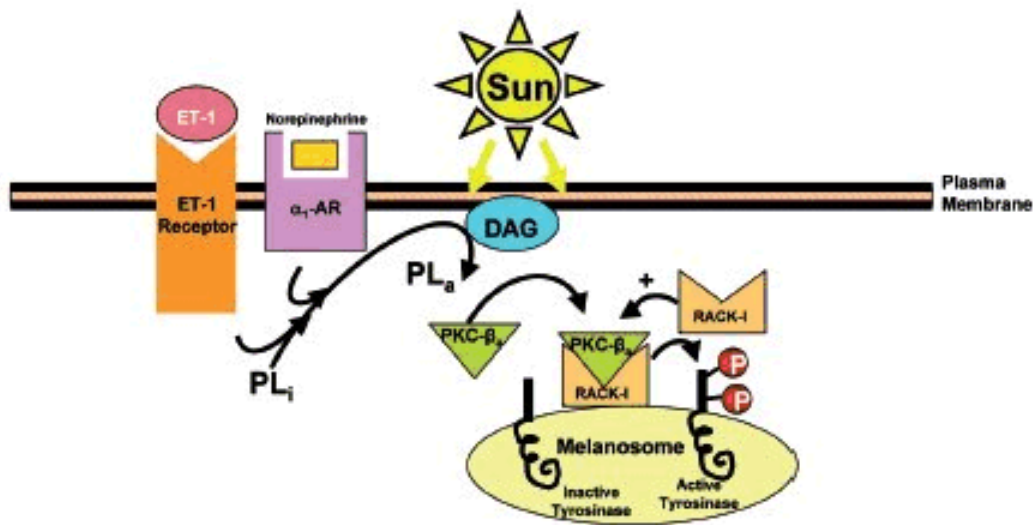


Figura 2.12. Activación de tirosinasa por PKC- β . La radiación UV, así como los receptores activados de la superficie celular tras la unión con sus respectivos ligandos (Endotelina/Receptor de endotelina 1 y Norepinefrina/ α_1 -adrenoreceptor), liberan diacilglicerol (DAG) desde la membrana celular. PKC- β es activada por DAG y la PKC- β activada (PKC- β_a) se une a RACK-1 formando el complejo PKC- β_a /RACK-1, el cual se transfiere al melanosoma y fosforila residuos de serina de tirosinasa activando a la enzima (Park et al., 2009).

La activación de DAG activa PKC- β , ésta se une al receptor de la C-quinasa I (RACK-1) (Mochly-Rosen, 1995). El complejo PKC- β / RACK-1 transloca a la membrana melanosomal y fosforila tirosinasa (Park et al., 2004). La fosforilación de tirosinasa parece conducir a la formación de complejos entre tirosinasa y TRP-1 (Wu y Park, 2003), hecho que estabiliza tirosinasa y aumenta la actividad enzimática (Kobayashi et al., 1998a). Los melanocitos expresan tanto receptores β_2 como α_1 adrenérgicos (Gillbro et al., 2004; Grando et al., 2006). El receptor α_1 interactúa con norepinefrina derivada del melanosoma, activa a la fosfolipasa C e incrementa el nivel de DAG (Kausser et al., 2003; Grando et al., 2006), por lo que se induce la melanogénesis dependiente de la PKC- β . Los queratinocitos producen epinefrina que se une mejor a los receptores β_2 de los melanocitos y aumentan los niveles de AMPc y, por lo tanto, conducen a la síntesis de melaninas (Grando et al., 2006).

C. Proteínas reguladoras de la melanogénesis

El locus Microftalmia (*mi*) codifica un factor de transcripción, al que se le llamó factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) Figura 2.13. El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) se une a elementos consenso en promotores génicos (Yasumoto et al., 1997), regulando la transcripción de tirosinasa, TRP-1, TRP-2 (Esquema 2.4) y PKC- β (Figuras 2.12-2.14) (Goding, 2000; Park et al., 2006). La isoforma M del MITF controla la transcripción de tirosinasa y PKC- β en melanocitos (Fuse et al., 1996; Du et al., 2003; Park et al., 2006). La actividad y estabilidad de MITF está regulada por su estado de fosforilación. MITF interfiere también en la biogénesis y transporte de melanosomas.

Los receptores de melanocortinas (MCRs) (Figura 2.13) constan de cinco proteínas relacionadas, cada una con 7 dominios transmembrana, que pertenecen a la superfamilia del receptor de proteínas G acopladas (Mountjoy et al., 1992). MC1R es el receptor expresado en melanocitos y es activado por los péptidos α -MSH y ACTH (Figura 2.14). Éstas son, a su vez, derivados de la proteína de 39 aminoácidos originada por el gen POMC, proopiomelanocortina (Suzuki et al., 1996; Kadakara et al., 2003; Rouzaud et al., 2005). La interacción ligando-receptor conduce a la activación de la adenilato ciclasa, de una forma dependiente de la proteína G, seguido de un incremento de los niveles de AMPc, activación de la PKA, a través de la unión de AMPc a las subunidades reguladores de PKA, y la liberación de las subunidades catalíticas que fosforilan los sustratos diana. Entre ellos se encuentran las proteínas nucleares CREB (cAMP responsive element binding proteína), que activan la transcripción de genes que contengan en sus promotores las secuencias consenso CRE (región palindrómica de 8 bp); la cual, por medio de la activación de factores de transcripción, estimula la melanogénesis Figura 2.13 (Rouzaud et al., 2005; Nasti y Timares, 2015).

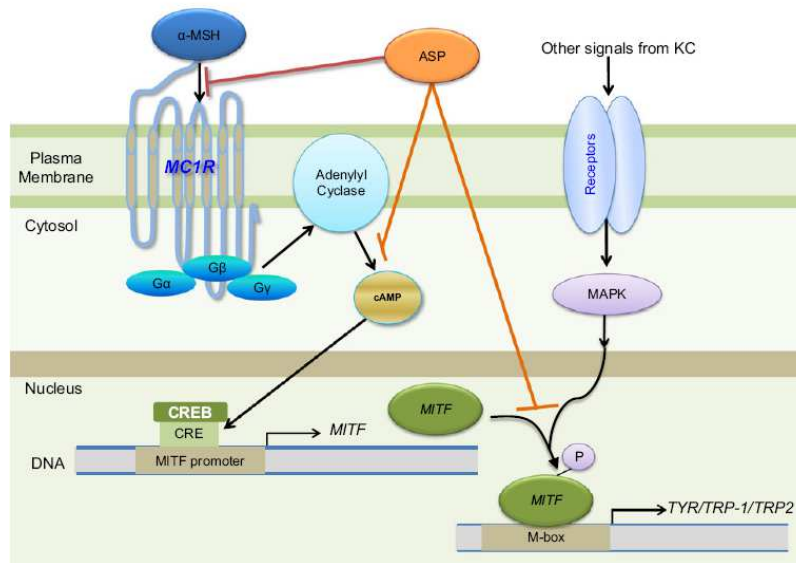


Figura 2.13. Ruta de señalización de melanocortina. α -MSH se une a su receptor (MC1R) y se activa la proteína G acoplada al MC1R. Esto lleva consigo la activación de la adenilato ciclasa, formándose AMPc que activa la proteína quinasa A (PKA), la cual sufre activación y se trasloca al núcleo, donde fosforila la familia de factores de transcripción CREB y éstos al factor de transcripción MITF, que se une al promotor de los genes de tirosinasa, TRP-1 y TRP-2. ASP (Proteína Señaladora Agouti) puede actuar en diferentes puntos de la ruta: inhibiendo la unión de α -MSH al receptor MC1R, inhibiendo la fosforilación de MITF y bloqueando la síntesis de AMPc y, por lo tanto, reduciendo la síntesis de eumelaninas (Nasti y Timares, 2015).

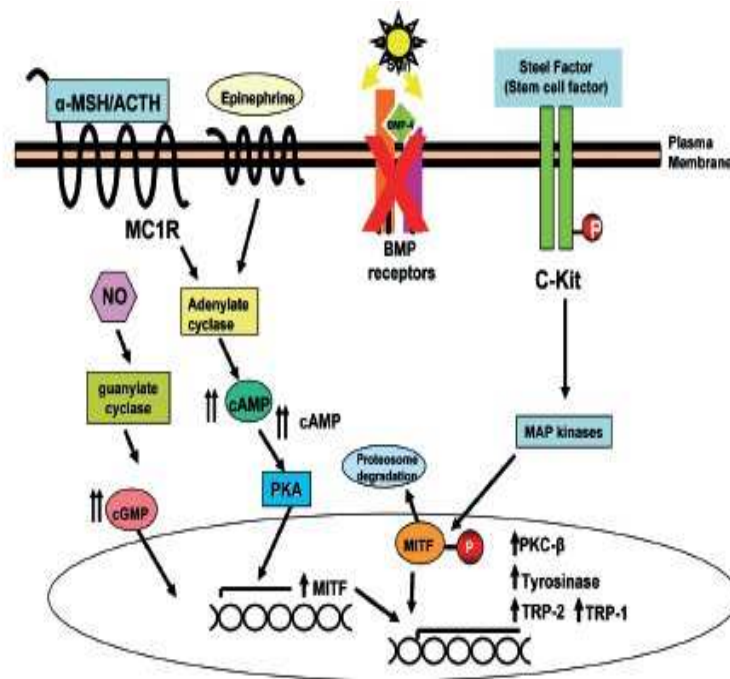


Figura 2.14. Rutas de señalización que regulan la melanogénesis. La radiación ultravioleta incrementa los niveles de α -MSH, ACTH y su receptor, el MC1R, para estimular la producción de AMPc. El AMPc también puede aumentar por la unión de epinefrina a su receptor. El agonista de c-Kit actúa fosforilando a MITF, por medio de las MAPK quinasas (Park et al., 2009; Kondo y Hearing, 2011).

La proteína señalizadora *Agouti* (ASP) se expresa tanto en humanos como en ratones (Lu et al., 1994; Ollmann et al., 1997; Siegrist et al., 1997). Antagoniza con α -MSH, por medio de una unión competitiva a MC1R, inhibiendo la adenilato ciclasa e incrementando la síntesis de feomelaninas, en relación a las eumelaninas. La sobreexpresión de ASP en ratones conduce a un color de pelo amarillo. En perros existe la β -defensina (K^B), esta proteína se une a MC1R en los melanocitos e incrementa la producción de eumelanina, dando pigmentación oscura (Candille et al., 2007). Se desconoce el papel de esta β -defensina en la pigmentación humana.

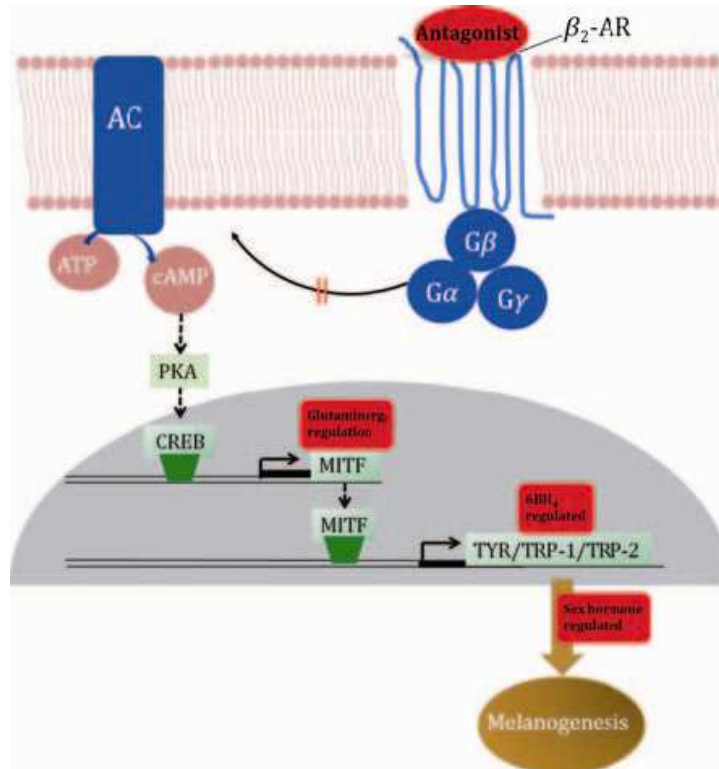


Figura 2.15. Nuevas etapas potenciales de transducción para reducir la pigmentación cutánea. Efecto de antagonistas del receptor β_2 -adrenérgico, MITF, a través de regulación glutamérgica, regulación de 6BH₄ y control por hormonas sexuales (Gillbro y Olsson, 2011).

Proopiomelanocortina (POMC) y péptidos derivados de ella (α -MSH y ACTH). α -MSH y ACTH son estimuladores potentes de la melanogénesis. Su precursor, POMC, se sintetiza en los queratinocitos y en la glándula pituitaria. La expresión de POMC en queratinocitos se induce por la radiación UV y las interleuquinas (citoquinas secretadas en procesos inflamatorios). α -MSH aumenta la síntesis de melanina por otro mecanismo distinto de la activación del MC1R, el cual consiste en la unión a 6-R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (6BH₄, inhibidor de tirosinasa), impidiendo su acción (Schallreuter et al., 1994; Schallreuter, 1999).

Stem cell factor (SCF: Factor de células totipotenciales) (Figura 2.14). Es un factor de crecimiento derivado de queratinocitos, que se une al receptor tirosina quinasa c-Kit; tal unión provoca una serie de reacciones que desencadenan en la transcripción de las tres enzimas melanogénicas (tirosinasa, TRP-1 y TRP-2). Además el SCF participa en la pigmentación inducida por irradiación UV (Slominski et al., 2004).

c-Kit. Es una proteína transmembrana (glicoproteína) de 145 KDa. Funciona como un receptor con actividad tirosina quinasa (Heinrich et al., 2002). El ligando para c-Kit es el SCF. La pérdida de expresión de receptor c-Kit está asociada con la progresión del melanoma a su forma metastásica (Lassam y Bickford, 1992; Zakut et al., 1993).

Endotelina-1 (ET-1). Es un péptido de 21 aminoácidos, involucrado en la homeostasis vascular que regula la melanogénesis, activando tirosinasa y aumentando los niveles de TRP-1 (Yada et al., 1991; Imokawa et al., 1992). También estimula la proliferación de melanocitos y formación de dendritas (Hara et al., 1995). Los queratinocitos sintetizan y secretan ET-1 y la radiación UV estimula dicha producción por los queratinocitos (Imokawa et al., 1992; Hara et al., 1995). ET-1 aumenta los niveles de MC1R e incrementa la afinidad de este por α -MSH (Funasaka et al., 1988; Tada et al., 1998).

Neurotrofinas (NTS): Factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) (Levi-Montalcini, 1987; Hohn et al., 1990). Los melanocitos expresan el receptor de baja afinidad de 75kD común a todas las neurotrofinas p75^{NTR} (Peacocke et al., 1988), así como los de alta afinidad para NGF y NT-3 (TrkA y TrkC de la familia de los receptores de tirosina quinasa) (Yaar et al., 1991; Botchkarev et al., 2006).

Mediadores Inflamatorios. Varios mediadores inflamatorios pueden afectar a la pigmentación de la piel. Los melanocitos expresan receptores de PG (PGE₂ y PGF_{2 α}). La radiación UV regula positivamente los niveles de receptores para PG en melanocitos (Scott et al., 2004; 2005). Igualmente, los leucotrienos B₄ y C₄ incrementan la síntesis de melaninas y estimulan la proliferación de melanocitos y su motilidad (Norris et al., 1998). Los melanocitos responden también a histamina, que es liberada por mastocitos durante la inflamación cutánea; la histamina produce dendricidad y regulación positiva de los niveles de tirosinasa (Gantz et al., 1991; Yoshida et al., 2000).

Otros estimuladores: bFGF (basic Fibroblastic Growth Eactor; Factor de crecimiento fibroblástico básico) es un mitógeno de melanocitos (Halaban et al., 1987; 1988), producido por queratinocitos, afecta a los melanocitos, a través del contacto célula-célula. El factor de crecimiento de queratinocitos, otro miembro de la familia de proteínas FGF, promueve la transferencia de melanosomas desde los melanocitos a los queratinocitos (Cardinali et al., 2005). El NO (óxido nítrico) es producido por melanocitos y queratinocitos, en respuesta a las citoquinas antiinflamatorias (Heck et

al., 1992; Bécherel et al., 1994; Joshi et al., 1996; Fecker et al., 2002) y la irradiación ultravioleta (Roméro-Graillet et al., 1997). El óxido nítrico aumenta la actividad tirosinasa en la melanogénesis (Roméro-Graillet et al., 1997).

D. Potenciadores de la pigmentación de la piel

Crema protectoras solares. El uso de estas cremas es una forma artificial de añadir protección a la piel. Existen estudios que indican que el uso de estas cremas no es tan protector como se pensaba originalmente (Pathak y Fitzpatrick, 1993). Sirven para prevenir las quemaduras por el sol (Pathak y Fitzpatrick, 1993); sin embargo, se ha visto que, la falsa seguridad que da el uso de protectores alarga mucho la exposición al sol (Westerdahl et al., 1995; Autier et al., 1997), teniendo un resultado dañino. También se observó que los protectores solares no protegen a los ratones del desarrollo de los melanomas inducidos por UV; sin embargo, sí protegen frente a las quemaduras solares e inflamación (Wolf et al., 1994). Como los pigmentos endógenos proporcionan protección, para un amplio rango de longitudes de onda de la radiación solar, se ha propuesto usar los protectores en combinación con agentes que inducen el bronceado.

El bronceado natural es un proceso caracterizado por un aumento del número de melanocitos en el estrato basal de la epidermis, aumento del tamaño y número de melanosomas, incremento de la dendricidad de los melanocitos, aumento del transporte de los melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos, incremento en la proliferación de los queratinocitos y adelgazamiento de la epidermis y estrato córneo (Jimbow et al., 1991; 1993).

Los melanosomas se depositan sobre el núcleo, en los queratinocitos, dando lugar a la formación de “tapas supranucleares”, que son características de la piel bronceada por el sol y de la pigmentación endógena (Gates y Zimmermann, 1953; Kobayashi et al., 1998b). Estas “tapas supranucleares” proporcionan protección frente a la exposición a radiación ultravioleta, absorbiendo los radicales libres generados en las células y produciendo una dispersión de la luz entrante. La protección es también producida por el grosor del estrato córneo (Young, et al., 1988). La enzima limitante en la melanogénesis es tirosinasa (Jimbow et al., 1991; 1993) que, como ya se ha expuesto, cataliza la conversión de L-tirosina a L-dopa y éste a dopaquinona. Esta última puede ser convertida en eumelaninas o feomelaninas. Eumelaninas son más fotoprotectoras que feomelaninas, con un aumento de la fotoprotección en proporción directa con el grado de pigmentación eumelánica (Pathak y Fitzpatrick, 1993).

D.1. Agentes que simulan la pigmentación natural

Dihidroxiacetona (DHA). Hace mucho tiempo que se usan preparaciones con DHA (Levy, 2000). DHA no induce una verdadera respuesta melanogénica, sino que se unen covalentemente a grupos amino libres en proteínas, seguidos por una reacción de polimerización (Levy, 2000). DHA protege frente UVA en animales y humanos (Fusaro y Johnson, 1975; Levy, 2000). Es coadyuvante en el tratamiento de la psoriasis con PUVA (terapia con psoraleno y radiación ultravioleta de longitud de onda A). Se ha sugerido que el bronceado producido por el DHA, en conjunción con los protectores, puede reducir la incidencia de melanoma maligno (Fusaro y Lynch, 2000).

Melaninas tópicas. La aplicación tópica de melaninas no produce una verdadera respuesta de bronceado, pero protegen absorbiendo la radiación UV y neutralizando los radicales libres (Orlow et al., 1992; Kalka et al., 2000; Levy, 2000).

D.2. Agentes que estimulan la pigmentación natural

Psoralenos y UVA (PUVA). Los psoralenos estimulan la pigmentación en presencia de luz UVA y tienen la capacidad de generar puentes cruzados y monoadductos del ADN (Averbeck, 1989). En la oscuridad estimulan también la pigmentación pero con menor daño del ADN (Mengeaud y Ortonne, 1994). Existe evidencia de que la inducción de la melanogénesis por PUVA puede ir unido a la p53 (Zhao et al., 1999).

Dimetilsulfóxido (DMSO). Produce diferenciación de múltiples células (Marks y Rifkind, 1984). La estimulación de melanocitos conlleva la estimulación de la melanogénesis. En humanos no se ha visto efecto bronceador (Scherbel et al., 1967).

L-Tirosina. L-Tirosina es el sustrato fisiológico de tirosinasa. Un incremento de L-tirosina en el medio aumenta la actividad de tirosinasa y el contenido de melaninas de melanocitos epidérmicos humanos que se co-cultivan con queratinocitos (Slominski et al., 1988).

L-dopa y fosfatos de L-dopa. L-dopa es sustrato y "cofactor" de tirosinasa (Lerner y Fitzpatrick, 1949). En células melanomatosas produce un aumento de la feomelanogénesis y disminución de eumelaninas y de tirosinasa en los melanosomas, indicando un potencial efecto inhibitorio (Sato et al., 1987). L-dopa no tiene efecto en el receptor de α -MSH (Slominski et al., 1989).

Aunque los productos de oxidación de L-dopa son tóxicos para las células, durante la melanogénesis, los melanocitos no sufren esta toxicidad por el hecho de

que en este proceso los intermedios están compartimentalizados en los melanosomas (Schachtschabel et al., 1978; 1988). L-dopa es usado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, observándose múltiples efectos secundarios como alteraciones psiquiátricas, fluctuaciones motoras, etc. (King, 1999).

pH del melanosoma. Tirosinasa es la enzima que cataliza la etapa limitante de la ruta de biosíntesis de melaninas. Su actividad es mayor en los melanocitos de piel oscura que en los derivados de la piel de los caucásicos (piel clara). Se demostró que la variación de la actividad enzimática no es debida a diferencias en la cantidad de enzima, sino que más bien es debida a una diferencia de actividad de la enzima preexistente. En los melanocitos, tirosinasa está localizada en la membrana de los melanosomas y en los melanocitos de los caucásicos la enzima es inactiva. Por otra parte, en los melanosomas de los melanocitos de individuos con piel oscura, tirosinasa tiene alta actividad catalítica. Cuando se trataron los melanocitos de los caucásicos con el compuesto lisosomótopico cloruro amónico o con los ionóforos nigericina y monesina resultó en un rápido incremento en la actividad de tirosinasa. El incremento de la actividad ocurre sin cambio en la cantidad de tirosinasa, indicando que estos compuestos aumentan la actividad catalítica de la enzima preexistente. La inhibición de la bomba de protones V-ATPasa (Shin et al., 2014a), mediante el tratamiento de los melanocitos de los caucásicos con bafilomicina (un antibiótico inhibidor específico de la V-ATPasa), también incrementa la actividad de tirosinasa. Sin embargo, aunque la actividad en los caucásicos aumenta por un factor de diez, en los melanocitos correspondientes a piel oscura, ninguno de estos agentes: cloruro amónico, monesina, nigericina, ni bafilomicina son capaces de aumentar la actividad existente en estos melanosomas. Además, cuando se tiñen los melanocitos de los caucásicos con la base débil fluorescente naranja de acridina, se muestra que los melanosomas de los caucásicos son ácidos. Este conjunto de datos apoya un modelo para explicar la pigmentación de las distintas razas, que está basado en la diferencia de pH de los melanosomas. Así, ya que tirosinasa no es activa a pH ácido, esto llevaría consigo la disminución de la pigmentación en individuos caucásicos. Estos datos experimentales confirman que en humanos no hay diferencia en el número y distribución de los melanocitos entre los individuos de distintas razas, sino que la variación en el color de la piel pueden ser debidas a la cantidad de melanina sintetizada por el mismo número de melanocitos (Staricco y Pinkus, 1957; Szabó, 1967). Estudios más recientes han demostrado que la actividad de tirosinasa en melanocitos de piel oscura es diez veces mayor que en los caucásicos (Iwata et al., 1990; Abdel-Malek et al., 1993). Posteriormente se demostró que los niveles de ARNm correspondiente a tirosinasa y

los niveles de enzima no variaron (Fuller et al., 2001). En la Figura 2.16 se muestra un resumen de los efectos descritos anteriormente.

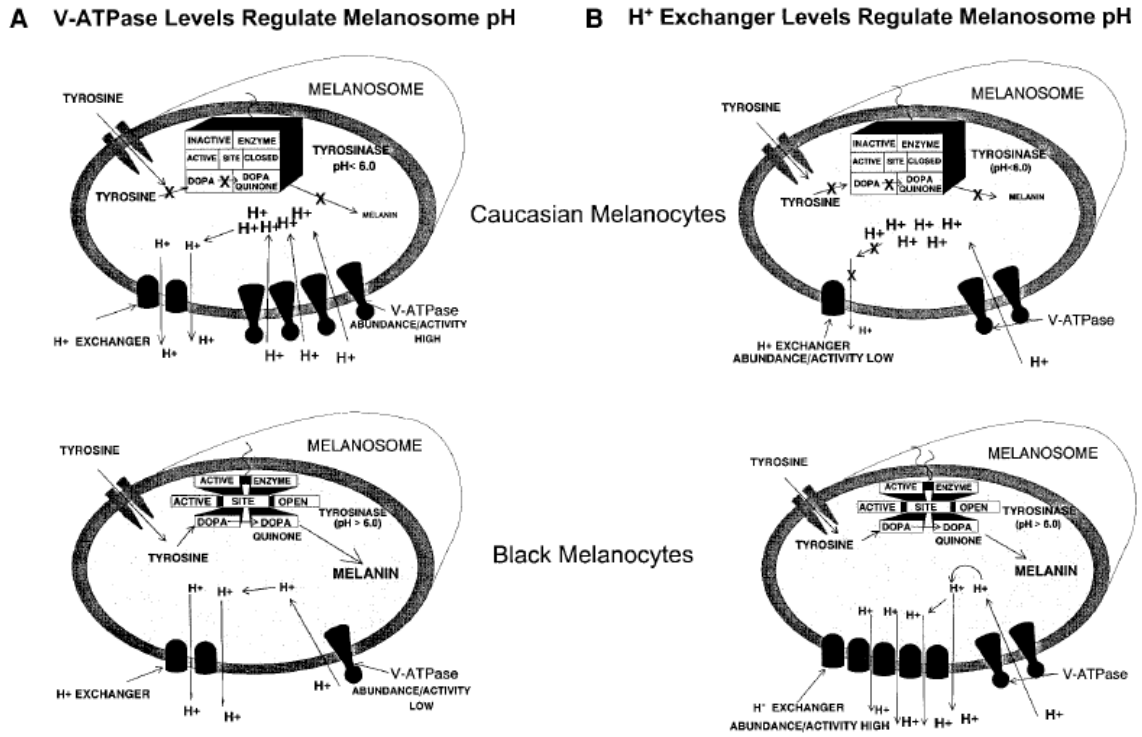


Figura 2.16. Modelos de control del pH del melanosoma sobre la actividad de tirosinasa. (A) Melanocitos en caucásicos (individuos con piel clara) tienen mayor actividad V-ATPasa, produciendo un medio ácido dentro de la organela. Los individuos de piel oscura tienen menor número de V-ATPasas, resultando un pH más neutro. (B) Melanocitos en caucásicos tienen menores niveles de intercambiadores de H⁺, inhabilitando a la organela para eliminar los protones introducidos por V-ATPasa. Melanocitos de individuos de piel oscura tienen mayores niveles de intercambiadores de H⁺, pudiendo eliminar los protones introducidos por V-ATPasa y, por tanto, manteniendo el medio a pH neutro (Fuller et al., 2001).

Diacilgliceroles (DAG) (Figura 2.12). Los DAG estimulan la PKC- β . La estimulación de la PKC- β se ha asociado con proliferación y diferenciación de melanocitos (Abdel-Malek et al., 1992). Varios estímulos, incluyendo RUV, incrementan los niveles de DAG y activan la PKC- β (Matsui et al., 1994). DAG y PKC- β

puede activar la melanogénesis por una ruta PKC- β dependiente (Park y Gilchrest, 1999) descrita anteriormente.

Existen evidencias de que el tratamiento con ciertos DAG puede producir inflamación (Allan et al., 1995). Algunos DAG que activan PKC- β estimulan hiperplasia epidérmica y son promotores de tumores en piel de ratón (Smart et al., 1989; Hansen, et al., 1990).

3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX). Las metilxantinas, incluyendo cafeína, teofilina e IBMX, son inhibidores de la fosfodiesterasa (Perchellet y Boutwell, 1981; Hoganson et al., 1989). IBMX es un potente estimulador de la melanogénesis, por lo que se usa como control positivo en los estudios de melanogénesis (Brown et al., 1998). El tratamiento de las células melanomatosas con IBMX aumenta el contenido de melanina y la actividad tirosinasa en un orden de magnitud (Fuller et al., 1990; Eller, et al., 1994; Pedeux, et al., 1998). El papel del cAMP en la ruta del IBMX no está claro.

E. Regulación redox en melanocitos humanos y melanoma

Síntesis de melaninas y GSH (glutación). La interacción de GSH en la ruta de síntesis de melaninas es compleja. GSH está involucrado en uno de los pasos iniciales de la síntesis de feomelaninas en su conjugación con dopaquinona (DQ), ver Esquema 2.7, y en la reducción de peróxido de hidrógeno producido durante la síntesis de eumelaninas y feomelaninas, a través de una peroxidasa dependiente de GSH, denominada glutación peroxidasa.

Interrupción del metabolismo del GSH y citotoxicidad para células melanomatosas. La glutación peroxidasa es el primer paso para convertir peróxidos en agua, si la neutralización de estas moléculas lleva consigo el agotamiento de GSH se acumula peróxido, formándose un ciclo citotóxico. Butationina sulfoximina (BSO) es un inhibidor selectivo e irreversible de gammaglutamil sintetasa (GGS), enzima involucrada en el primer paso de la síntesis de GSH (Griffith y Meister, 1979; Griffith, 1982). El uso de BSO produce un aumento del estrés oxidativo que proporciona una posible estrategia terapéutica en el tratamiento del melanoma.

Melaninas como anti-oxidantes. Existen numerosos trabajos donde se estudia la interacción de las melaninas con oxígeno, radical hidroxilo y anión superóxido (Sarna et al., 1993). Se ha documentado bastante bien la capacidad de las melaninas para neutralizar especies reactivas del oxígeno (ROS). La fuente de esta reactividad

anti-oxidante es la transformación redox quinol/quinona de monómeros de dihidroxiindol, DHI.

Melaninas como pro-oxidantes celulares. Durante la polimerización oxidativa se generan ROS, (Nappi et al., 1995; Nappi y Vass, 1996), cuyas implicaciones no se sabe todavía cuales pueden llegar a ser. Cuando se inhibe la feomelanogénesis se estimula la eumelanogénesis y se produce dos veces más peróxido de hidrógeno el cual es tóxico. Por tanto, controlando la melanogénesis se controla la toxicidad celular (Nappi et al., 1995; Nappi y Vass, 1996; Muñoz-Muñoz et al., 2009b).

Niveles anti-oxidantes y melanomagénesis. Casi todos los tumores malignos tienen algún desequilibrio en sus niveles anti-oxidantes, comparados con la célula control (Oberley y Oberley, 1997). Los niveles de enzimas anti-oxidantes catalasa, MnSOD y glutatión peroxidasa están disminuidos, así como los niveles de moléculas anti-oxidantes de bajo peso molecular, como GSH, vitamina C y A (Yohn et al., 1991).

1.3. Tirosinasa: estructura

Las metaloproteínas que contienen cobre se pueden catalogar, de manera general, en función de su estructura y sus propiedades espectroscópicas, en una de estas tres clases: tipo-1, tipo-2 y tipo-3 (Kaintz et al., 2014a). Las metaloproteínas con el centro mononuclear tipo-1, “proteínas de cobre azul”, están implicadas en el transporte de electrones. Las del centro tipo-2, “centros de cobre no azules”, son típicamente enzimas que activan oxígeno molecular, y las de centros tipo-3 contienen dos átomos de cobre, y también activan oxígeno molecular (Solomon et al., 1992).

Los centros de cobre tipo-3, enlazan el oxígeno a través de un puente lateral ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$) (Kitajima et al., 1989), así el oxígeno se activa. La forma *oxi* de estas proteínas muestra varias características espectroscópicas significativas, como son: un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones de Cu^{2+} , lo cual suprime la señal de resonancia paramagnética electrónica (RPE), y exhibe una resonancia Raman O-O con una extensión de vibración a 750 cm^{-1} (Solomon et al., 1994). La banda de absorción de la forma *oxi* a 345 nm es debida a una transmisión de complejo de transferencia de carga $\text{O}_2^2(\pi_\sigma^*) \rightarrow \text{Cu(II)}(d_{x^2-y^2})$. La banda de absorción a 580 nm corresponde al segundo complejo de transferencia de carga $\text{O}_2^2(\pi_\nu^*) \rightarrow \text{Cu(II)}(d_{x^2-y^2})$. La forma *met* tiene una o dos moléculas de agua, (*met*) o (*met 2*) respectivamente, en una posición triangular (Eickman et al., 1979).

Las polifenol oxidasas (PPOs) son una clase importante de proteínas de cobre tipo-3 y se encuentran en plantas, hongos, bacterias y animales (Mayer, 2006). Estas proteínas tipo-3 se clasifican según la nomenclatura de enzimas en: catecol oxidasa (CO, *o*-difenoil: oxígeno, oxidoreductasa, E.C 1.10.3.1), tirosinasas (monofenol, *o*-difenoil: oxígeno oxidoreductasa, E.C 1.14.18.1) y aureusidina sintasa (2',4,4',6'-tetrahidroxichalcona 4'-*o*- β -D glucósido: oxígeno oxidoreductasa, E.C 1.21.3.6). En la Figura 3.1 se muestran las reacciones catalizadas por tirosinasa y catecol oxidasa, y en la Figura 3.2 la reacción catalizada por aureusidina sintasa. Recientemente, se ha clonado y expresado en *E.coli* una polifenol oxidasa, transcrita de *Coreopsis grandiflora*, implicada en la formación de aurona (Kaintz et al., 2014b).

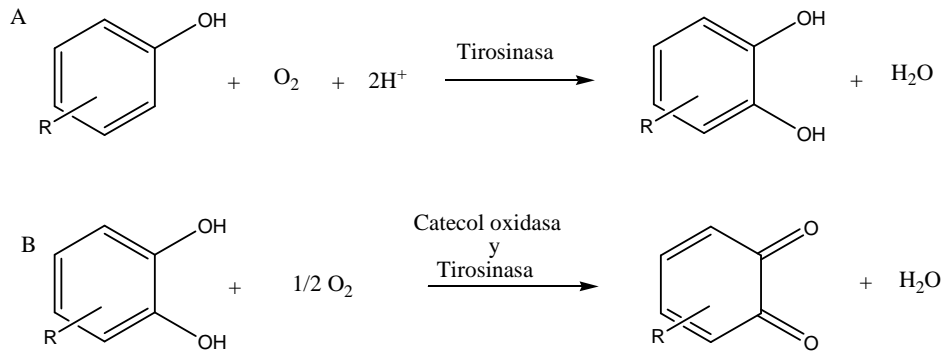


Figura 3.1. Reacciones catalizadas por (A) tirosinasas y (B) tirosinasas y catecol oxidasas.

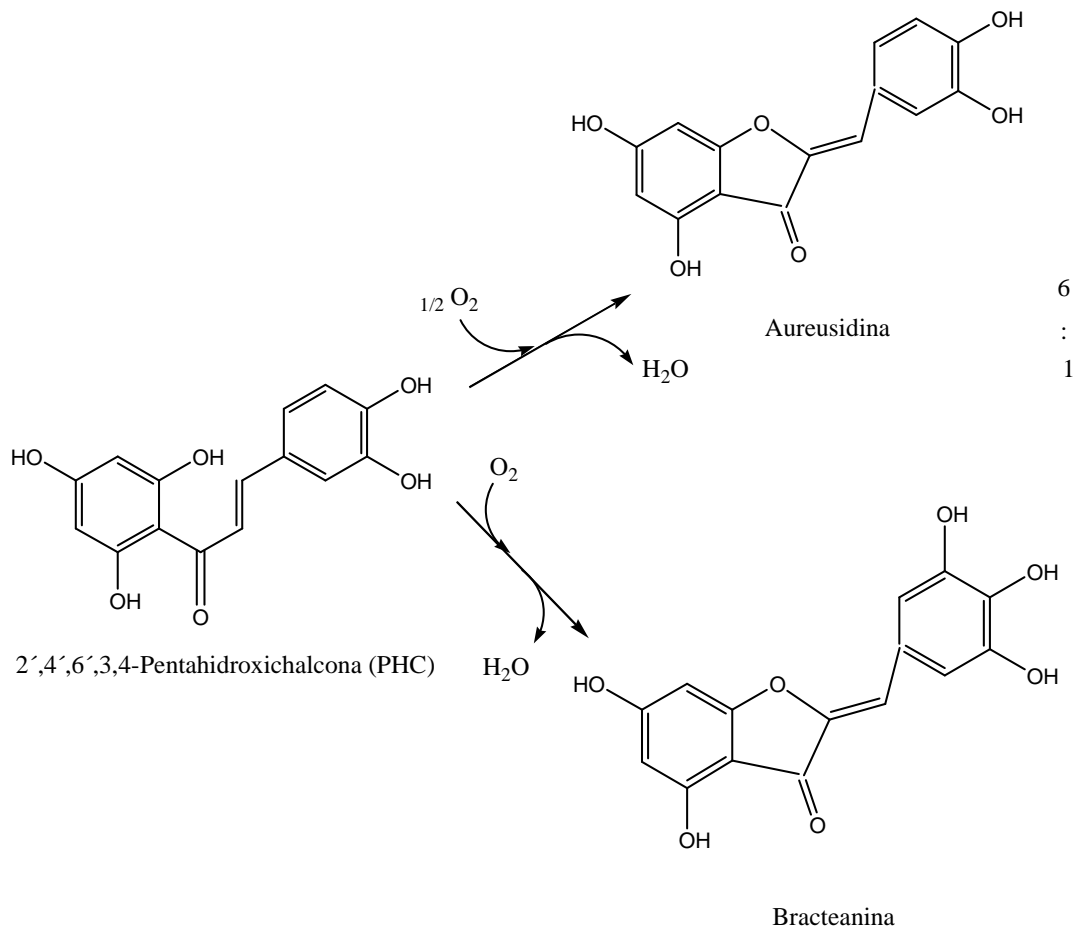
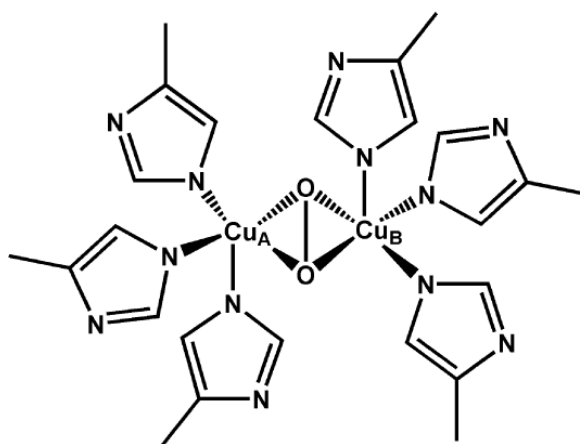


Figura 3.2. Reacción catalizada por aureusidina sintasa (Nakayama et al., 2000).

Las catecol oxidasas (COs) están ampliamente descritas en plantas y también en el hongo *Aspergillus oryzae* (Gasparetti et al., 2010), mientras que las tirosinasas se encuentran en humanos, plantas, bacterias y hongos (Mayer, 2006). Aureusidina sintasa se ha descrito en los pétalos de boca de dragón (*Antirrhinum majus*) (Nakayama et al., 2000). Muchas PPOs tienen un dominio C-terminal en su estado inicial, sugiriendo que las PPOs se expresan como precursores inactivos (proenzimas o zimógenos). La forma activa de PPO se forma por proteólisis del C-terminal (Fujieda et al., 2013a; 2013b; Marusek et al., 2006; Tran et al., 2012).

Las PPOs son bastantes distintas dependiendo del organismo de origen. Sin embargo, todas ellas tienen en común una región altamente conservada con motivos de histidina en la zona de los átomos de cobre Cu_A y Cu_B (Esquema 3.1), para la forma oxitirosinasa, y en la Figura 3.3, se muestra la estructura de *S. castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006; Solomon et al., 2014). Con respecto a CO hasta este momento se dispone de tres estructuras tridimensionales: dos de plantas (boniato y uva) (Klabunde et al., 1998 y Virador et al., 2010a; 2010b respectivamente) y una de hongo (*A. oryzae*) (Hakulinen et al., 2013). Respecto a tirosinasas, hasta ahora están disponibles dos recombinantes bacterianas expresadas en bacterias (Matoba et al., 2006; Sendovski et al., 2011), otra recombinante de tirosinasa de hongo (Fujieda et al., 2013b), las tirosinasas activa PPO3 y la latente PPO4 de hongo obtenidas a partir de champiñón (Ismaya et al., 2011a; 2011b; Mauracher et al., 2014b; 2014c). También se dispone de la estructura de una polifenol oxidasa de insectos (Li et al., 2009) y, por otra parte, se dispone de las estructuras de varias hemocianinas de artrópodos y moluscos (Cuff et al., 1998; Jaenicke et al., 2011).



Esquema 3.1. Sitio activo de la forma oxi de PPOs.

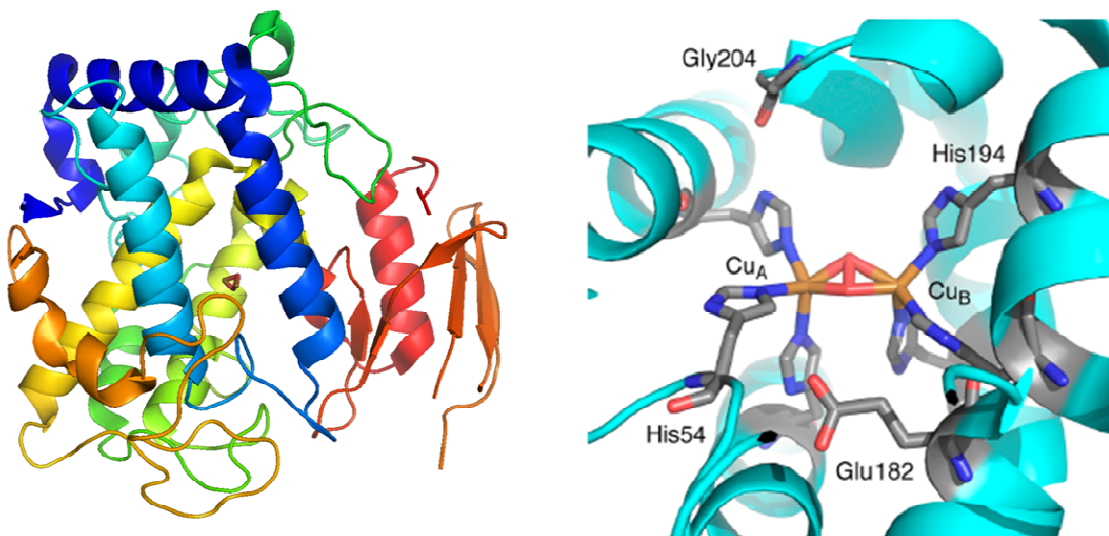


Figura 3.3. Vista general de tirosinasa de *S. castaneoglobisporus* (izquierda) y detalle del puente peroxo en el sitio activo de la oxitirosinasa (derecha) (Matoba et al., 2006; Solomon et al., 2014).

La tirosinasa humana juega un gran papel en la síntesis de melaninas y se ha propuesto que interviene en la bioquímica relacionada con la enfermedad del Parkinson (Tessari et al., 2008). En plantas la enzima está relacionada con el pardeamiento enzimático (Queriroz al., 2011).

1.3.1. Estructura primaria y peso molecular de PPOs

Todas las PPOs de plantas contienen un dominio central, un dominio C-terminal y un péptido de tránsito N-terminal. El dominio central y el dominio C-terminal construyen la forma latente de la enzima, a veces llamada proenzima. Todas las PPOs de plantas se expresan *in vivo* como inactivas, proteínas latentes, antes de ser activadas proteolíticamente separando el dominio C-terminal (Marusek et al., 2006; Tran et al., 2012). El péptido de tránsito N-terminal determina la localización de la enzima, normalmente dirigida al tilacoide o a la vacuola.

1.3.2. Dominio central, dominio C-terminal y el sitio de ruptura proteolítica

El dominio central de las PPOs de plantas, con un rango de 1050 a 1200 pares de bases que codifican a 350-400 aminoácidos, tiene una masa molecular de aproximadamente 38-44 kDa para la forma activa de la enzima. El sitio de ruptura conservado en varias PPOs es un motivo SKE (serina-lisina-ácido glutámico) (Flurkey e Inlow, 2008). Un motivo SK existe en CO de *Vitis vinífera* en S³⁵³ (Uniprot P43311) (Virador et al., 2010a; 2010b) y en ambas isoenzimas de CO de *Iponema batata* en S³⁴⁷ (40 kDa, Uniprot Q9MB14) (Gerdemann et al., 2001) y S³⁴³ (39 kDa, Uniprot Q9ZP19) (Eicken et al., 1998). En 2010 se ha descrito una catecol oxidasa extracelular del hongo *A. oryzae* (AoCO4) (Uniprot Q2UNF9), ésta no tiene el dominio C-terminal y muestra una masa molecular de 44 kDa para el dominio central (Gasparetti et al., 2010).

Se conocen actualmente seis isoenzimas del hongo *Agaricus bisporus* (AbPPO) (Weijn et al., 2013; Wichers et al., 2003; Wu et al., 2010). Wichers et al. en 2003 clonaron la secuencia total de AbPPO1 (Uniprot Q00024) y AbPPO2 (Uniprot 042713) con tamaños de 1.9 y 1.8 kb, respectivamente. Las formas latentes tienen masas de 64 kDa, mientras que las formas activas muestran una masa de 43 kDa (Wichers et al., 1996). Wu et al. en 2010 publicaron la masa molecular de AbPPO3 (Uniprot C7FF04) y AbPPO4 (Uniprot C7FF05) con masas moleculares de 66.3 kDa y 68.3 kDa, respectivamente. En las isoenzimas AbPPOs1-4 se rompen cuatro aminoácidos después del motivo YG (tirosina-glicina) dando lugar a enzimas activas con una masa molecular de 41-43 kDa (Wu et al., 2010). Hasta el momento, la secuencia de aminoácidos de AbPPO5 y AbPPO6 solamente están predichas por modelado (Weijn et al., 2013). El motivo altamente conservado YG (encontrado en AbPPO1-4) está también presente en PPO5 y PPO6 en las posiciones G³⁹² y G⁴²², respectivamente.

Se han descrito tirosinasas de otros hongos, como *Pholiota nameko* (Uniprot A7BHQ9) (Kawamura-Konishi et al., 2007), *Pycnoporus sanguineus* (Uniprot Q2TL94) (Halaouli et al., 2005) y *Neurospora crassa* (Uniprot POO440) (Kupper et al., 1989).

1.3.2.1. Motivos de aminoácidos conservados en el dominio central

El dominio central de todos las PPOs consiste en varios aminoácidos y dominios altamente conservados. Todas las PPOs de plantas comienzan con x P (x es un aminoácido variable y P es prolina). Los dominios de enlace del cobre se caracterizan por residuos conservados de histidina, comenzando muy a menudo con

un motivo H_{CuA} CAYC (Tran et al., 2012). La segunda cisteína, en este motivo, puede formar un enlace tioéter con la segunda histidina conservada del dominio Cu_A (Tran et al., 2012). En hongos, la primera histidina del sitio de enlace Cu_A se encuentra en el motivo H_{CuA} GxP (Wu et al., 2010). En ambas PPOs de hongos y plantas, la tercera histidina conservada del sitio del Cu_A siempre está nueve posiciones después de la segunda conservada. En la región del Cu_B , para ambas enzimas de hongos y plantas, las tres histidinas coordinadas y la cuarta histidina no coordinada forman el motivo H_{CuB} xxx H_{CuB} X(n)Fxx H_{CuB} H (Tran et al., 2012; Wu et al., 2010). En las PPOs, donde la ruptura proteolítica del C-terminal ha sido documentada, la ruptura ocurre inmediatamente después de la tirosina de la secuencia YxY (Tran et al., 2012).

1.3.2.2. Motivos de aminoácidos conservados en el dominio C-terminal

En la ruptura del dominio C-terminal se libera un polipéptido de 16-18 KDa, pero su función no es conocida (Flurkey e Inlow, 2008; Tran et al., 2012). En el dominio C-terminal en PPOs de plantas se ha descrito un motivo KFDV (lisina-fenilalanina-ácido aspártico y valina). Se ha encontrado un motivo conservado CxxC en tirosinasa de *A. oryzae* sobre el bucle 3 en el dominio C-terminal (Fujieda et al., 2013b); este motivo también se ha descrito en AbPPO2, AbPPO3 y en AbPPO4 (Mauracher et al., 2014a). Igualmente este motivo se observa en chaperonas de cobre Ato X 1 y Ccc2 en levaduras (Robinson y Winge, 2010; Fujieda et al., 2013a).

Mientras el tipo salvaje de la protitrosinasa melB (protitrosinasa recombinante de *Aspergillus Oryzae*) captura bien el cobre, los mutantes C92A y C92A/C522A/C525A no tienen habilidad para incorporar el cobre desde el citoplasma de *E.coli*. Así, Fujieda et al. en 2013 consideraron que la cisteína⁹² así como el motivo C⁵²²xxC1⁵²² contribuían a la incorporación del cobre de melB apotirosinasa.

1.3.2.3. Péptido de tránsito y localización de las PPOs

El péptido de tránsito de CO, tirosinasas y aureusidina sintasa de plantas tiene una longitud variable de 60 a 110 aminoácidos. Los primeros 35 residuos contienen una proporción alta del aminoácido serina, típicos del péptido del estroma cTP (péptido de tránsito en cloroplasto) (Tran et al., 2012). Muchas PPOs contienen cTP, sugiriendo que se transportan desde el lumen a la membrana del tilacoide en cloroplastos (Tran et al., 2012). En general, las tirosinasas de hongos no contienen el péptido de tránsito. Se cree que estas son enzimas citoplasmáticas.

1.3.2.4. Homología de secuencias entre PPOs

La secuencia de aminoácidos se muestra en la Tabla 3.1. Algunas secuencias de CO muestran una identidad muy alta, 69.7%; sin embargo, en el péptido de tránsito la variación es mayor. Entre las PPO1 y las PPO2 de *N. tabacum* (Uniprot O49912 y R4JDV1) muestran una identidad de secuencia del 98.8% y las cuatro COs de *Solanum* sp muestran una identidad del 75.4%.

Tabla 3.1. Enzimas, fuentes y códigos Uniprot.

Uniprot	Fuente	Enzima
17HUF2	<i>Taraxacum officinale</i>	Catecol oxidasa
B9VS06	<i>Camellia nitidissima</i>	Catecol oxidasa
P43311	<i>Vitis vinífera</i>	Tirosinasa
Q9MB14	<i>Ipomoea batatas</i>	Catecol oxidasa
Q9ZP19	<i>Ipomoea batatas</i>	Catecol oxidasa
G0ZAL2	<i>Populus euphratica</i>	Catecol oxidasa
P43309	<i>Malus domestica</i>	Tirosinasa
Q948S3	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Catecol oxidasa
Q08307	<i>Solanum lycopersicum</i>	Catecol oxidasa
Q08296	<i>S. lycopersicum</i>	Catecol oxidasa
Q06355	<i>Solanum tuberosum</i>	Catecol oxidasa
F1DBB9	<i>Solanum melongena</i>	Catecol oxidasa
O49912	<i>Nicotiana tabacum</i>	Catecol oxidasa
R4JDV1	<i>N. tabacum</i>	Catecol oxidasa
C0LU17	<i>Juglans regia</i>	Tirosinasa
D1KEC6	<i>Oryza sativa</i>	Catecol oxidasa
Q6YHK5	<i>Ananas comosus</i>	Catecol oxidasa
Q00024	<i>Agaricus bisporus PPO1</i>	Tirosinasa

O42713	<i>A. bisporus PPO2</i>	Tirosinasa
C7FF05	<i>A. bisporus PPO4</i>	Tirosinasa
C7FF04	<i>A. bisporus PPO3</i>	Tirosinasa
Q00234	<i>Aspergillus oryzae</i>	Tirosinasa
Q2UNF9	<i>A. oryzae</i>	Catecol oxisasa
P14679	<i>Tyrosinase human</i>	Tirosinasa
Q06215	<i>Vicia faba</i>	Catecol oxidasa
P43310	<i>Spinacia oleracea</i>	Catecol oxidasa
P00440	<i>Neurospora crassa</i>	Tirosinasa

Las tirosinasas de hongos y la primera CO descrita en un hongo, AoCO4, muestran una identidad de secuencia muy baja 2.6% (Gasparetti et al., 2010; Hakulinen et al., 2013). Las cuatro secuencias de tirosinasa de *A. bisporus* (AbPPO1-4) mostraron únicamente el 19% de identidad. La tirosinasa de *A. oryzae* y de *N. crassa* exhibieron una identidad de secuencia del 14.8%.

Todas las enzimas de plantas, CO, tirosinasas y aureusidina sintasa, muestran distintas secuencias en el péptido señal de tránsito. En el dominio central y en el C-terminal están presentes todos los motivos conservados de las PPOs de plantas.

La tirosinasa humana (Uniprot P14679) mostró la mayor identidad de secuencias (un 10.8%) con la tirosinasa de *N. crassa* (Uniprot P00440).

1.3.2.5. Activación *in vitro* de PPOs

Las formas latentes de PPOs, constituidas fundamentalmente por el dominio central y el dominio C-terminal, pueden ser activadas por una variedad de tratamientos, tales como: proteasas, ácidos grasos, choque ácido o básico y SDS (Cabanes et al., 2007; Sellés-Marchart et al., 2007). El uso de SDS como un agente activante es interesante porque las PPOs son activas a alta concentración de SDS (1mM) (Moore y Flurkey, 1990).

1.3.2.6. Activación *in vivo* de PPO

La activación de tirosinasa de *N.crassa* puede hacerse por una enzima tipo quimotripsina (Lerch, 1978). Burton et al. en 1997 demostraron que una serin proteasa activa las PPOs de *A. bisporus*. En general, no está claro el proceso de activación.

1.3.2.7. Mutantes de PPO

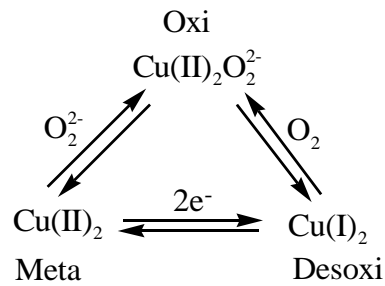
En plantas, la primera mutación la llevaron a cabo Dirks-Hofmeister et al. en 2013. Ellos mutaron Cys 197 por serina (C197S) en la PPO de dandelion tetramérica de *T. officinale* (Uniprot 17HUF2), y determinaron su efecto sobre la actividad y estabilidad. Pudieron probar que C197 forma un enlace disulfuro en la superficie que estabiliza el tetrámero.

En hongos la primera mutación se hizo en *A. oryzae* (Nakamura et al., 2000). Los autores mostraron que la mutación de algunos aminoácidos críticos influye sobre la unión del cobre, y en algunos mutantes existía únicamente un átomo de cobre o ninguno.

Recientes estudios sobre tirosinasa de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Molloy et al., 2013), consiguen mutantes con una relación k_{cat} / K_M aumentada. Kanteev et al. en 2013 encontraron por mutagénesis dirigida a la tirosinasa de *Bacillus megaterium* (Bm TYR), que el residuo Asn 205 estabiliza la orientación de His 204 en el centro activo, favoreciendo la coordinación correcta al Cu_B .

1.3.3. Complejos oxo

El sitio activo de tirosinasa puede existir en varias formas, dependiendo del estado de oxidación de los iones de cobre. La enzima nativa normalmente es una mezcla de meta (E_m), con los iones de cobre en estado Cu (II), y de oxi (E_{ox}), con un grupo peróxido unido a los cobres. Por otra parte, la forma enzimática, con los iones de cobre reducidos, es la desoxi o reducida (E_d). Estas formas enzimáticas, que intervienen en el turnover de tirosinasa, están relacionadas como se muestra en Esquema 3.2 (Jackman et al., 1992).



Esquema 3.2. Equilibrio entre las formas meta, desoxi y oxi de tirosinasa (Jackman et al., 1992).

Metatirosinasa contiene dos Cu (II), los cuales están acoplados antiferromagnéticamente. Metatirosinasa, por reacción con *o*-difenoles, se reduce a desoxitirosinasa, produciendo una *o*-quinona. En la Figura 3.4 y 3.5 se muestran las estructuras del sitio activo de la forma metatirosinasa de *B. megaterium* y la forma inactiva de meta tirosinasa de *M. sexta*, respectivamente. Nótese en ésta última la presencia de una base (Glu 395) y una Phe (Phe 88) en el sitio activo. La estructura de esta enzima de *M. sexta* es similar a la hemocianina de artrópodos (Li et al., 2009; Solomon et al., 2014).

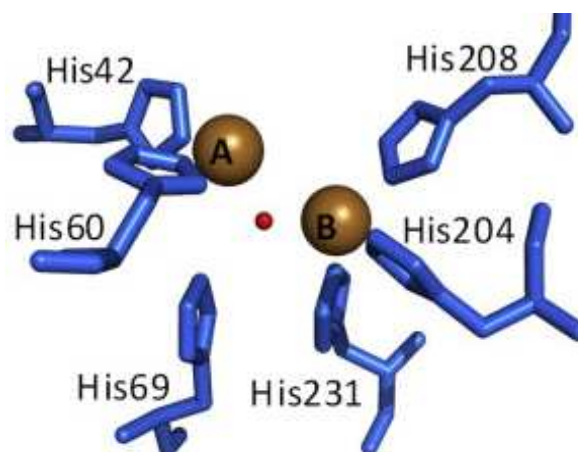


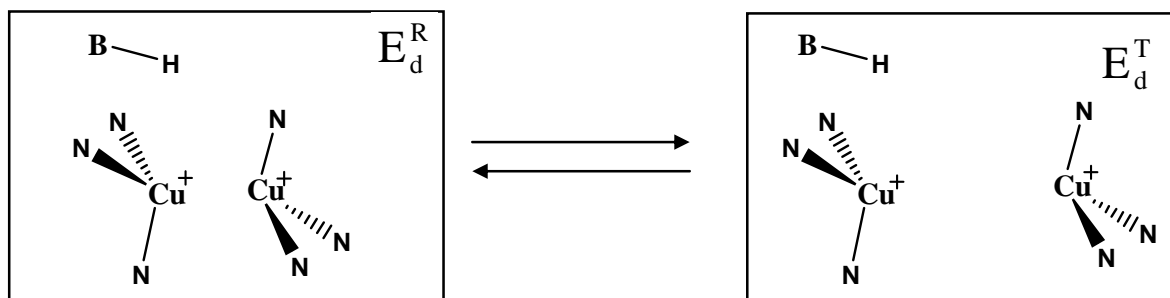
Figura 3.4 Sitio activo de metatirosinasa de *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2011).



Figura 3.5. Vista general de metatirpsinasa de *Manduca sexta* con el detalle del centro binuclear de cobre (en marrón), las 6 histidinas unidas a los dos cobres (gris) y el aminoácido fenilalanina (amarillo) que cubre el sitio activo (Li et al., 2009; Solomon et al., 2014).

Desoxitirpsinasa reacciona con oxígeno formando un puente $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ (Kitajima et al., 1989). Esta forma enzimática, oxitirpsinasa, es la única que es capaz de hidroxilar monofenoles (Solomon et al., 1992; Sánchez-Ferrer et al., 1995). La forma desoxitirpsinasa es la menos estudiada del ciclo catalítico. Se estudió el enlace de oxígeno en el caso de tirpsinasa de *Streptomyces antibioticus* (Hirota et al., 2005) y *Agaricus bisporus* (Della Longa et al., 1996).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado un estudio donde se ponen de manifiesto algunas propiedades de desoxitirosinasa de *Agaricus bisporus* (Muñoz-Muñoz et al., 2010a). Se ha demostrado que en desoxitirosinasa ocurre una transición similar a la descrita en desoxihemocianina (Metz y Solomon, 2001), posiblemente originada por una repulsión de cargas como se muestra en el Esquema 3.3.



Esquema 3.3. Transición entre la forma desoxi relajada a la forma desoxi tensa. Nótese la diferente distancia entre los iones Cu (I) al pasar de una forma a otra (Muñoz-Muñoz et al., 2011a).

1.3.3.1. Técnicas utilizadas para investigar los complejos oxo

Todos los centros de cobre tipo-3, en su forma oxi, muestran una banda de absorción característica en el rango de 335-350nm ($\epsilon = 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), el cual se asigna a la transición de transferencia de carga $\text{O}_2^2(\pi_\sigma^*) \rightarrow \text{Cu(II)}(d_{x^2-y^2})$ (Eickman et al., 1979; Himmelwright et al., 1980; Solomon et al., 1992; 1994). La segunda banda de absorción está alrededor de 580 nm ($\epsilon = 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y es asignada a la transición de transferencia de carga $\text{O}_2^2(\pi_\nu^*) \rightarrow \text{Cu(II)}(d_{x^2-y^2})$ (Eickman et al., 1979; Himmelwright et al., 1980; Solomon et al., 1992; 1994). En dicroísmo circular (CD) se observaron dos componentes con las bandas a 490 y 570 nm, respectivamente.

En espectroscopia de resonancia Raman se indica que el $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ contiene una unidad peróxido con un enlace O-O relativamente débil, en el rango $720\text{-}760 \text{ cm}^{-1}$ (Solomon, 2014).

1.3.3.2. Complejo oxo de catecol oxidasa

Las primeras investigaciones de los complejos oxo de CO fueron descritos por Eicken et al. en 1998. Estos autores investigaron dos isoenzimas de boniato (*I. batatas* Uniprot Q9MB14 y Q9ZP19) en tampón fosfato a pH 6.7 como se indica en la Tabla 3.2. Posteriormente Gerdemann et al. en 2001 estudiaron la actividad catalasa del isoenzima de 39 kDa. Se estudió la saturación de CO de *Lycopus* y *Populus* por H₂O₂ encontrando valores de 6 y 80 equivalentes de H₂O₂ respectivamente (Rompel et al., 1999). Más tarde se descubrió la saturación por H₂O₂ de la CO de *Melissa officinalis*, el valor descrito fue 2 equivalentes de H₂O₂ (Rompel et al., 2012).

Recientemente la saturación de la enzima de *A. oryzae* se ha demostrado que ocurre con 4-5 equivalentes de H₂O₂ (Hakulinen et al., 2013).

1.3.3.3. Complejos oxo de tirosinasa

Oxitirosinasa de *N.crassa* muestra una banda Raman intensa a 274 cm⁻¹ con un hombro definido a 296 cm⁻¹ y otra a 755 cm⁻¹, indicando que el oxígeno está enlazado como peróxido (Eickman et al., 1978).

Lerch (1976) y Himmelwright et al. (1980) realizaron estudios con tirosinasa de *N. crassa*. Jolley et al. en 1974 estudiaron la formación de los compuestos oxo con la enzima de *A. bisporus*.

Más recientemente, la tirosinasa de hoja de nogal *Juglans regia* ha mostrado unas características similares en la formación de los compuestos oxo (Zekiri et al., 2014).

Tabla 3.2. Estudios de formación de complejos oxo de catecol oxidasas y tirosinasas

Fuente	Enzima	Tamaño (kDa)	Equivalentes H ₂ O ₂	Tampón	Rango de pH	$\epsilon_{343-345}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\epsilon_{580-600}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Referencias
<i>Agaricus bisporus</i>	TYR	120	3	26 mM borato sódico, pH 8.6	nd	9000	600	Jolley et al., 1974
<i>Neurospora crassa</i>	TYR	46	2	10 mM fosfato sódico, pH 6.8	nd	9000	600	Himmelwright et al., 1980; Lerch, 1976
<i>Ipomoea batatas</i>	CO	39	6	500 mM cloururo sódico y 50 mM de fosfato sódico, pH 6.7	7.8	6500	450	Eicken et al., 1998
<i>Ipomoea batatas</i>	CO	40	2	500 mM cloururo sódico y 50 mM de fosfato sódico, pH 6.7	7.8	6500	450	Eicken et al., 1998
<i>Lycopus europaeus</i>	CO	40	6	50 mM fosfato sódico, pH 7.0	6.5-7.5	3500	1000	Rompel et al., 1999
<i>Populus nigra</i>	CO	55	80	50 mM fosfato sódico, pH 7.0	6.0-7.0	6000	1000	Rompel et al., 1999

<i>Melissa Officinalis</i>	CO	39	2	50 mM fosfato sódico, pH 7.0	nd	8510	580	Rompel et al., 2012
<i>Aspergillus Oryzae</i>	CO	44	4-5	10 mM TRIS, pH 7.2	nd	3000	Weak	Hakulinen et al., 2013
<i>Juglans regia</i>	TYR	39	2	10 mM acetato sódico, pH 5.0	nd	12984	761	Zekiri et al., 2014

1.3.4. Datos estructurales de cristalografía de rayos X de PPOs

Del grupo de proteínas con cobre tipo-3, las primeras estructuras que se publicaron fueron las de hemocianinas en los años 1990 (Cuff et al., 1998; Magnus et al., 1994; Volbeda y Hol, 1989). En la Figura 3.6 A se muestra la estructura de una hemocianina de artrópodo *L. polyphemus* (Magnus et al., 1994) y en la Figura 3.6 B una hemocianina de molusco de *Enteroctopus defleini* (Cuff et al., 1998). Estas estructuras se encuentran en el banco de datos de proteínas (protein data bank).

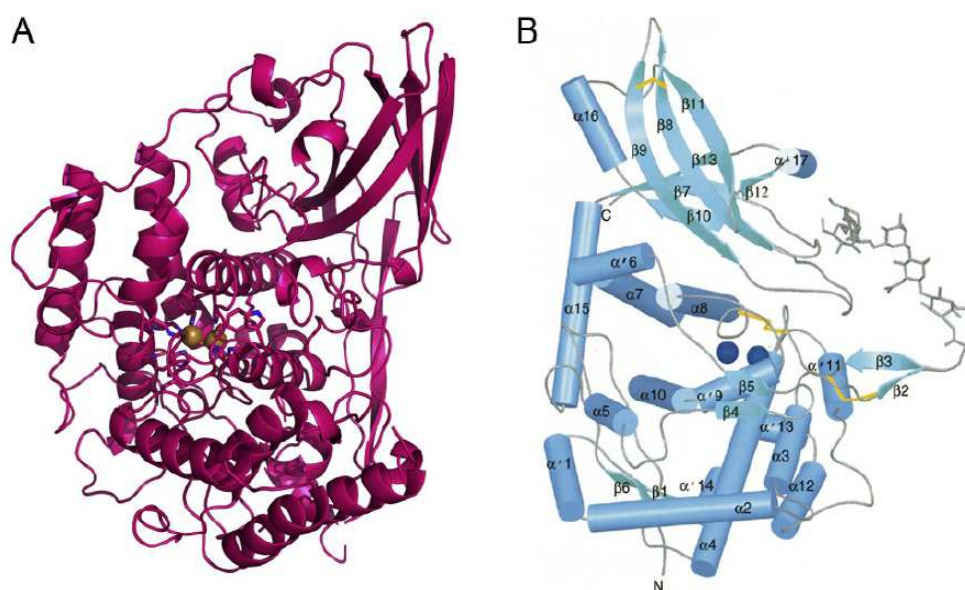


Figura 3.6. Estructuras de hemocianinas: (A) Hemocianina de artrópodos *Limulus polyphemus* (Magnus et al., 1994) y (B) hemocianina de moluscos *Enteroctopus defleini* (Cuff et al., 1998).

1.3.4.1. Estructuras publicadas en el banco de datos de proteínas de catecol oxidasas

Al final de los años noventa se publicó la primera estructura de una enzima de cobre tipo-3 (Klabunde et al., 1998). La estructura se muestra en la Figura 3.7 A y es la isoenzima de boniato (*I. batatas*, PDB ID: 1BT3) Tabla 3.3. Se obtuvieron cristales de la enzima en la forma dicúprica Cu (II)-Cu (II), la forma dicuprosa Cu (I)-Cu (I) y en presencia del inhibidor feniltiourea (PTU). El centro catalítico está compuesto por cuatro hélices localizadas en un bolsillo hidrofóbico cerca de la superficie. La His 109 del Cu_A está covalentemente enlazada a Cys 92 mediante un enlace tioéter. Esta

segunda histidina está localizada sobre un bucle. También, un residuo voluminoso de fenilalanina está colocado encima del sitio del Cu_A .

Recientemente, la estructura cristalina de CO del hongo *A. oryzae* (AoCO4) se presentó a una resolución de 2.5 Å (PDB ID: 453P y 453Q), Figura 3.7 B (Hakulinen et al., 2013). El enlace tioéter encontrado en *Vitis vinífera* no está presente en la AoCO4. Sin embargo, dos residuos de fenilalanina se encuentran próximos a cada átomo de cobre provocando que se pierda la actividad monofenol oxidasa o monofenolasa presente en tirosinasa. Todas las formas de PPOs eucarióticas excepto AoCO4 y MsTYR (polifenol oxidasa de *Manduca sexta*) poseen el enlace tioéter en el sitio activo, mientras que a los procariontos les falta esta modificación postransduccional.

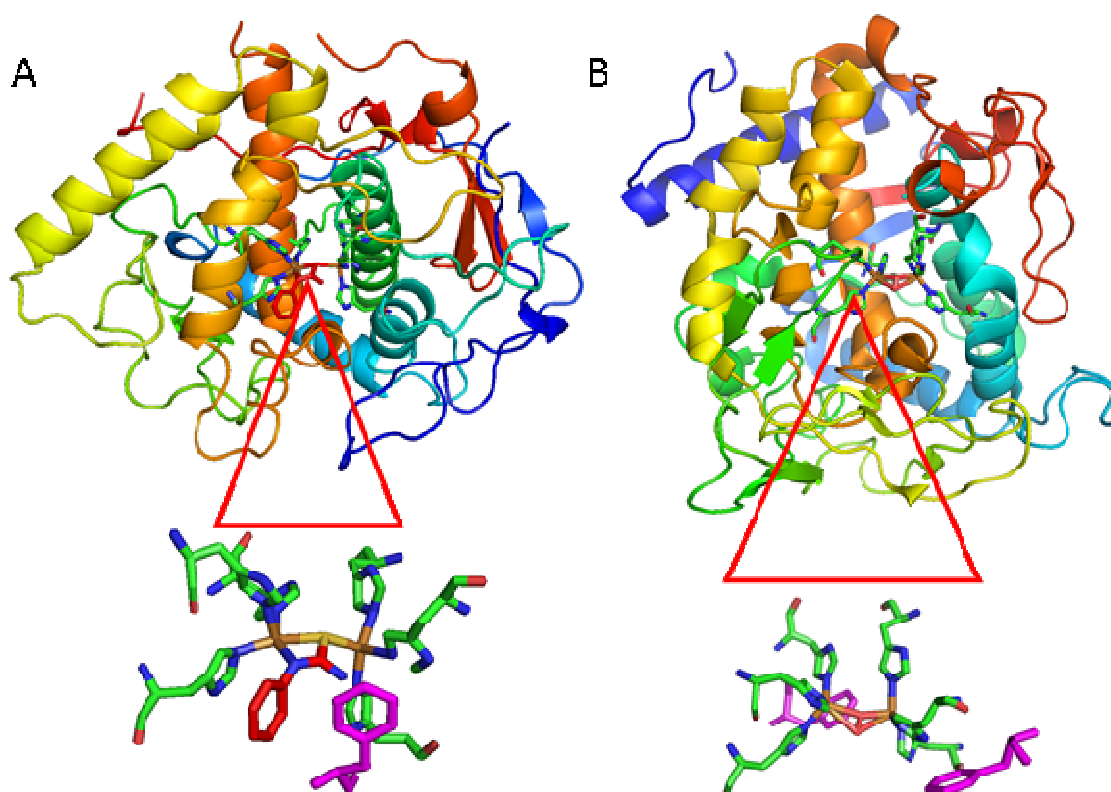


Figura 3.7. Estructuras de catecol oxidasas: (A) catecol oxidasa de *Ipomea batatas* (Klabunde et al., 1998), (B) catecol oxidasa de *Aspergillus oryzae* (Hakulinen et al., 2013).

Igualmente, se ha resuelto la estructura de CO de uva (*V. vinifera*), Figura 3.8 A (Virador et al., 2010a; 2010b) (PDB ID: 2P3X). Las estructuras de 39 kDa de las CO de boniato y de uva son bastantes similares en el plegamiento, la localización de las α -hélices y el sitio activo, el cuál contiene tres histidinas unidas a cada cobre catalítico, y una de las histidinas (His 108 de *V. vinifera*, His 109 de *I. batatas*) está unida por un enlace tioéter con un residuo de cisteína (Cys 91 de *V. vinifera* y Cys 92 de *I. batatas*). En la Figura 3.8 B (parte superior), se muestra la superficie de la enzima con el sitio activo próximo a la superficie. En la Figura 3.8 B (parte inferior) se representan las interacciones polares presentes en la enzima. Como se observa en dicha figura, el sitio activo se encuentra rodeado por aminoácidos con carga positiva como consecuencia de las histidinas unidas a los átomos de cobre.

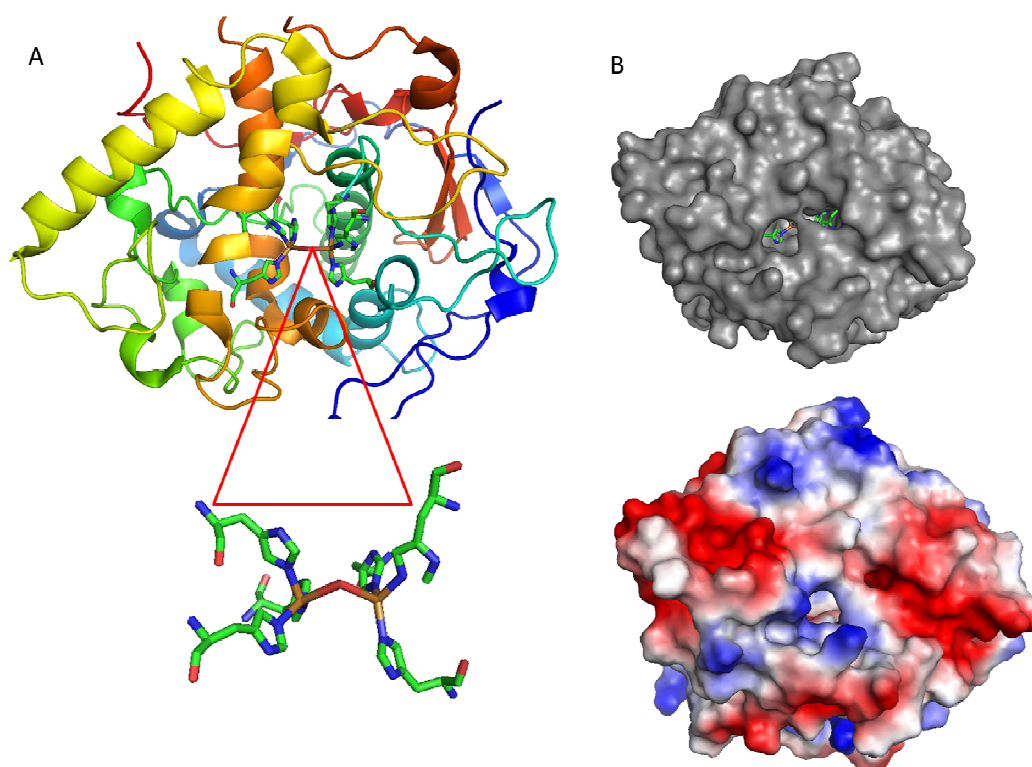


Figura 3.8. Estructuras de catecol oxidasa de *Vitis vinifera* (Virador et al., 2010a; 2010b). A. Vista general de la enzima con detalle del sitio activo en su forma meta. Los átomos de cobre se presentan en color marrón, las histidinas en color verde y la molécula de agua del puente de cobre en color rojo. B. Detalle de la superficie de la enzima (parte superior) con el sitio activo en color verde e interacciones polares de la enzima (parte inferior) (las interacciones con carga negativa se dibujan en rojo, las de carga positiva en azul mientras que las apolares en blanco).

1.3.4.2. Estructuras de tirosinasas publicadas en el banco de datos de proteínas (protein data bank)

La primera estructura cristalina de una tirosinasa bacteriana de *S. castaneoglobisporus* fue resuelta por Matoba et al. en 2006 (PDB: 2AHK) (Figura 3.3). Ellos determinaron la estructura cristalina de tirosinasa formando un complejo con la proteína llamada ORF378, también designada como proteína “caddie” ya que ayuda en la incorporación de los átomos de cobre a la enzima, Tabla 3.3.

Se demostró que existía un gran espacio vacío por encima del sitio activo. Este espacio vacío está ocupado por fenilalanina en CO (IbCO). La estructura cristalina de una enzima bacteriana activa, BmTir, fue resuelta por Sendoski et al. en 2011 con una resolución de 2.0-2.3 Å (PDB: 3NN8), Figura 3.9 A. El espacio vacante en ScTir está ocupado con un residuo de valina en BmTir, pero éste es menos voluminoso que la fenilalanina en IbCO y, por lo tanto, no impide la actividad monofenolasa.

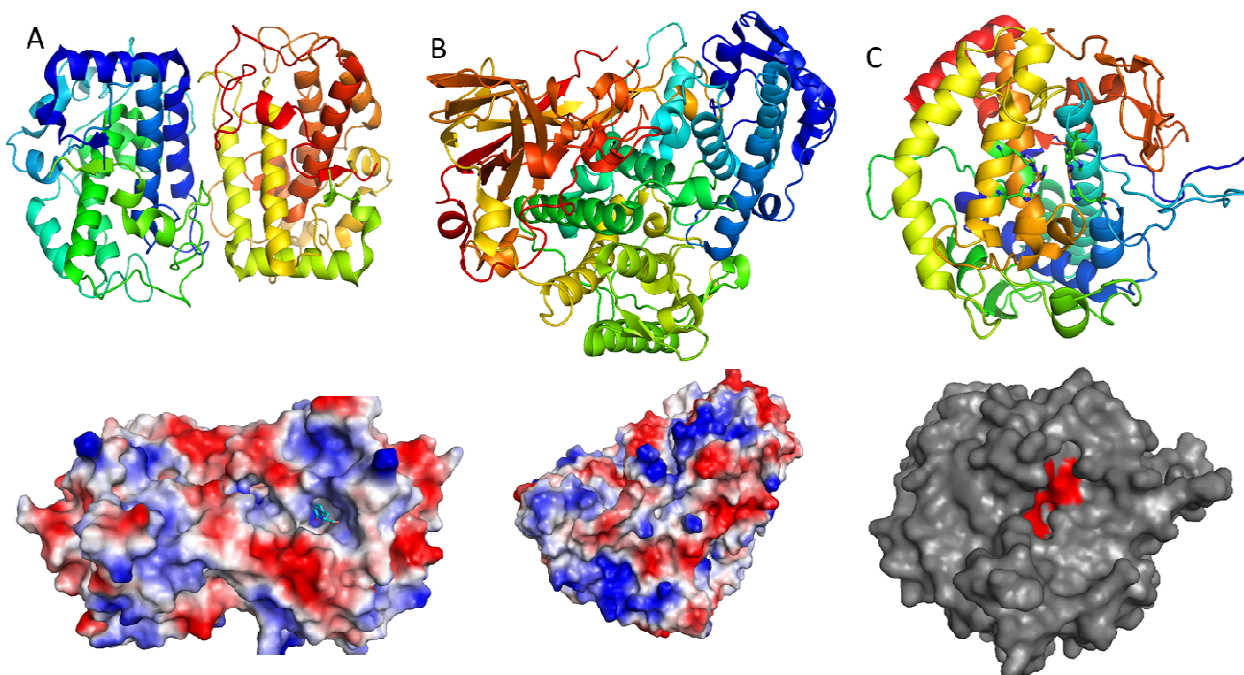


Figura 3.9. Parte superior. Estructuras generales en vista cartoon: (A) dímero de tirosinasa de *Bacillus megaterium* (Sendoski et al., 2011), (B) profenol oxidasa de *Manduca sexta* (Li et al., 2009) y (C) tirosinasa de *Agaricus bisporus* PPO3 (Ismaya et al., 2011a). Parte inferior. Interacciones polares de tirosinasas de *Bacillus megaterium*, *Manduca sexta* y superficie de la enzima de *Agaricus bisporus*.

Anteriormente, Li et al., (2009) publicaron la estructura de un heterodímero de profenoloxidasa de *Manduca sexta*, consistente de dos cadenas polipeptídicas homólogas PPO1 y PPO2 (PDB: 3HHS), Figura 3.9 B. En PPO2 existe un residuo Glu 395, que puede servir como una base general para ayudar en la desprotonación de sustratos monofenólicos; esta etapa es clave en la reacción de hidroxilación de fenoloxidasa. Esta proteína se encontró en una forma latente puesto que una fenilalanina voluminosa está colocada por encima del sitio de CuB. Además, se ha descrito un proceso de activación llevado a cabo por dos enzimas auxiliares, una PPO proteasa activante (PAP) y una serin proteasa homóloga (SPH). Recientemente se ha cristalizado, a partir de hemolinfa del crustáceo *Marsupenaeus japonicus*, una profenoloxidasa hexamérica proPO β (PDB:3WKY) (Masuda et al., 2014). En 2011 se llevó a cabo la purificación de la iosenzima PPO3 de *A. bisporus* y se cristalizó a una resolución de 2.3 Å (PDB: 2YPW) (Ismaya et al., 2011a; 2011b), sugiriendo que la enzima estaba en el estado desoxi, con una distancia entre los átomos de cobre de 4.5 Å, Figura 3.9 C y Figura 3.10.

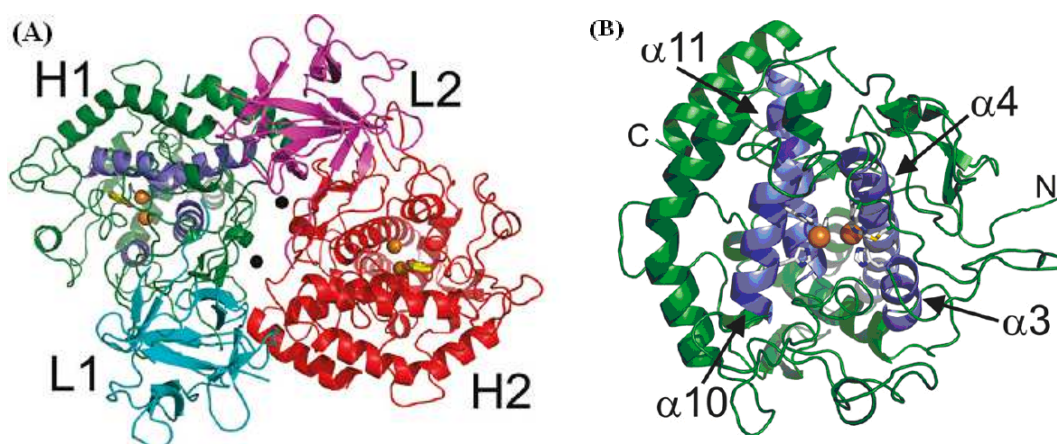


Figura 3.10. Estructura tridimensional de tirosinasa de *Agaricus bisporus*: (A) estructura tetramérica compuesta por H₂L₂ y (B) estructura monomérica con detalle del sitio activo de la enzima. En marrón se muestran los dos átomos de cobre del sitio activo mientras que en azul se muestran las hélices α que forman la cavidad del sitio activo (Ismaya et al., 2011a; 2011b).

Recientemente, otros autores han cristalizado la PPO4 latente de *Agaricus bisporus* (AbPPO4) con una resolución de 2.78 Å (PCB: 404A) en presencia de la sal sódica de hexa-wolframotelurato (VI) Na₆[TeW₆O₂₄]·22H₂O (POM, polioxometalato) como un agente de co-cristalización (Mauracher et al., 2014b; 2014c), Figuras 3.11 y

3.12. Recientemente se ha conseguido la cristalización simultánea de ambas formas, tirosinasa activa (A-Tir) y enzima latente (L-Tir) (Mauracher et al., 2014c), Figura 3.12.

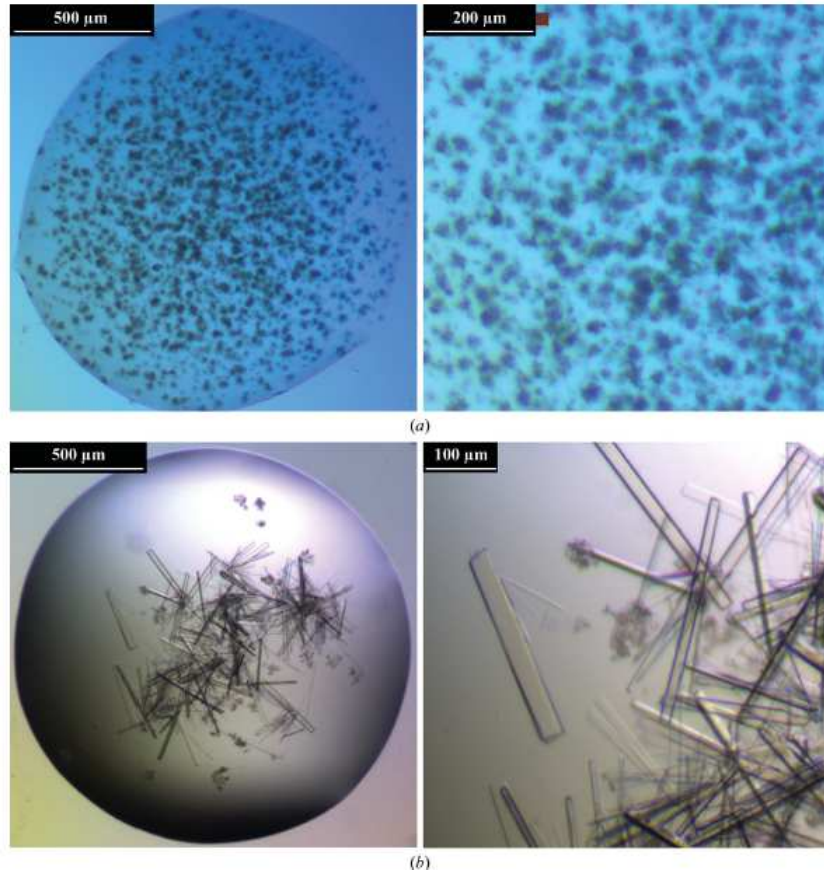


Figura 3.11. Imágenes de los cristales de tirosinasa de champiñón (A la izquierda imagen total y a la derecha imagen ampliada). (a). Imagen poco definida de los microcristales de tirosinasa (en forma de erizo de mar) obtenidos usando MgCl_2 como aditivo en la cristalización (10% PEG 4000, 15 mM MgCl_2 , 25 mM Tris-HCl pH 7.5). (b). Cristales de tirosinasa en forma de aguja plana obtenidos usando el agente POM como aditivo en la cristalización (10% PEG 4000, 1 mM $\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}]\cdot 22\text{H}_2\text{O}$, 25 mM Tris-HCl pH 7.5) (Mauracher et al., 2014b).

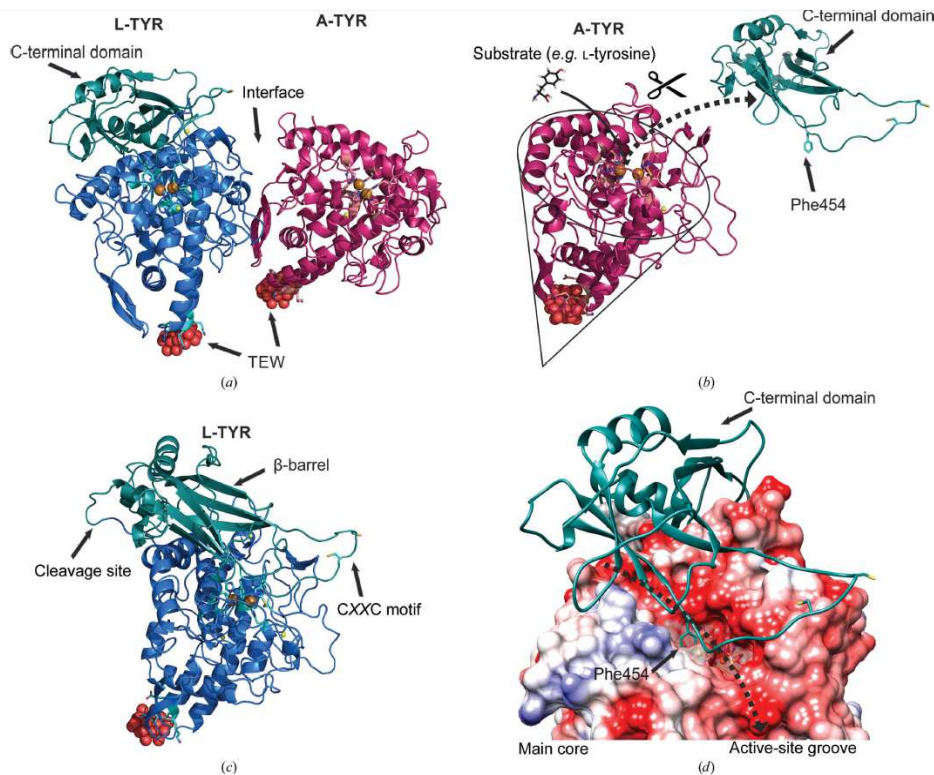


Figura 3.12. Estructura general de tirosinasa. Código de colores: estructura principal de L-Tir (tirosinasa latente) está en azul, el dominio C-terminal en turquesa, la estructura de A-Tir (tirosinasa activa) está en púrpura, los iones sodio en amarillo, los iones de cobre en bronce. En la estructura del compuesto POM (TEW) los iones oxígeno están en rojo mientras que los iones telurio en gris. La superficie con carga electrostática positiva de tirosinasa está en azul mientras que la superficie cargada negativamente se dibuja en rojo. (a). Estructura general de la unidad asimétrica; es decir, del heterodímero cristalográfico de AbPPO4. L-Tir se muestra a la izquierda mientras que A-Tir se encuentra a la derecha. (b). Ilustración del proceso de activación de la enzima. Gracias a la hidrólisis proteolítica del dominio C-terminal, el sitio activo se encuentra más expuesto y el sustrato (por ejemplo, L-tirosina) puede acceder a él. (c). Diferente ángulo de vista del monómero de L-Tir para ilustrar el dominio C-terminal con forma de barril beta, el sitio de ataque proteolítico y el posible agarre de cobre que contiene el motivo CXXC. (d). Ilustración de la superficie electrostática de la enzima con la representación tipo cartoon del dominio C-terminal superpuesta. El surco accesible al disolvente, que muestra un fuerte potencial electrostático negativo, se representa con la flecha discontinúa. La Phe454 se muestra sobresaliendo del sitio activo (en la superficie transparente alrededor del sitio activo) (Mauracher et al., 2014c).

Se ha determinado la estructura cristalina de una protirosinasa del hongo *A. oryzae* a una resolución de 1.39 Å (PDB ID: 3W6W), Figura 3.13 (Fujieda et al., 2013b). El sitio activo tiene una fenilalanina. La primera estructura de una tirosinasa de una planta *J. regia* ha sido descrita a una resolución de 2.39 Å (Zekiri et al., 2014).

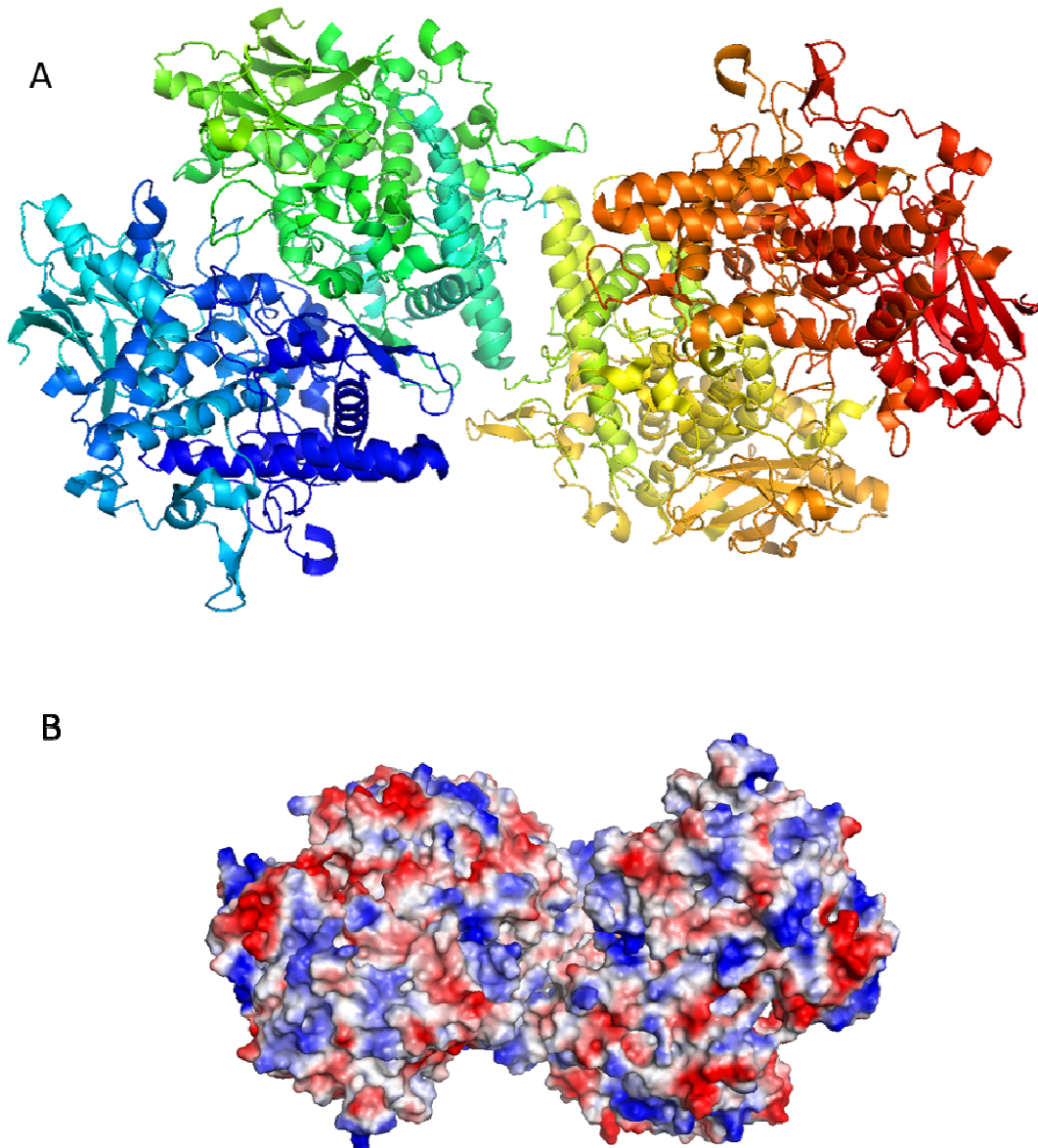


Figura 3.13. Estructura tridimensional de tirosinasa de *Aspergillus oryzae*: (A) Vista general de la estructura dimérica. (B) Interacciones polares del dímero de la enzima (Fujieda et al, 2013b).

Recientemente, en el 2014, se ha resuelto la estructura tridimensional de la primera tirosinasa unida a sus sustratos naturales monofenólicos (L-tirosina y *p*-tirosol) y difenólicos (L-dopa) unidos al sitio activo de la enzima, Figuras 3.14 y 3.15. Goldfeder et al. en 2014 han conseguido cambiar los átomos de cobre del sitio activo por átomos de zinc sin que se modificara la estructura general de la enzima (Goldfeder et al., 2014). En cambio, la nueva proteína perdió las actividades catalíticas. De este modo, cocrystalizaron la enzima de *Bacillus megaterium* con los sustratos unidos a los átomos de Zn²⁺. Como se muestra en la Figura 3.14, en la parte inferior, el sitio activo se encuentra en una cavidad de la enzima y el sustrato puede acceder a él relativamente fácil, lo que explicaría la poca especificidad de sustrato que presenta tradicionalmente tirosinasa.

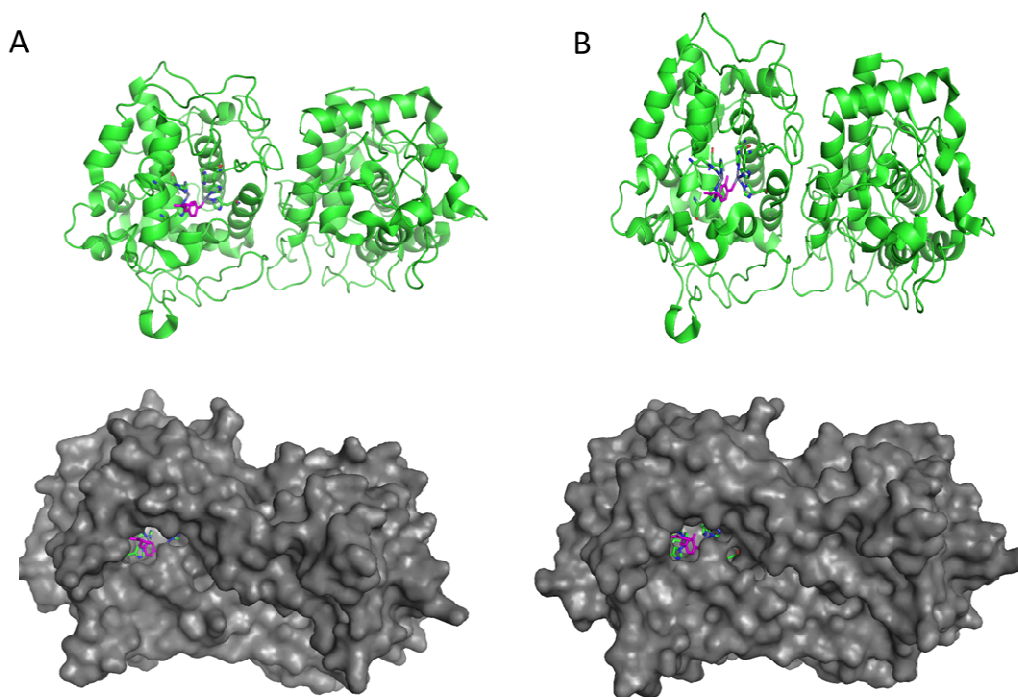


Figura 3.14. Estructura tridimensional del dímero de tirosinasa de *Bacillus megaterium* con sus sustratos L-tirosina (A) y L-dopa (B) unidos al sitio binuclear de cobre. En la parte superior se muestra la estructura general de la enzima con el detalle del sitio activo mientras que en la parte inferior se muestra la superficie de la enzima con la hendidura donde se encuentra el sitio activo (Goldfeder et al., 2014).

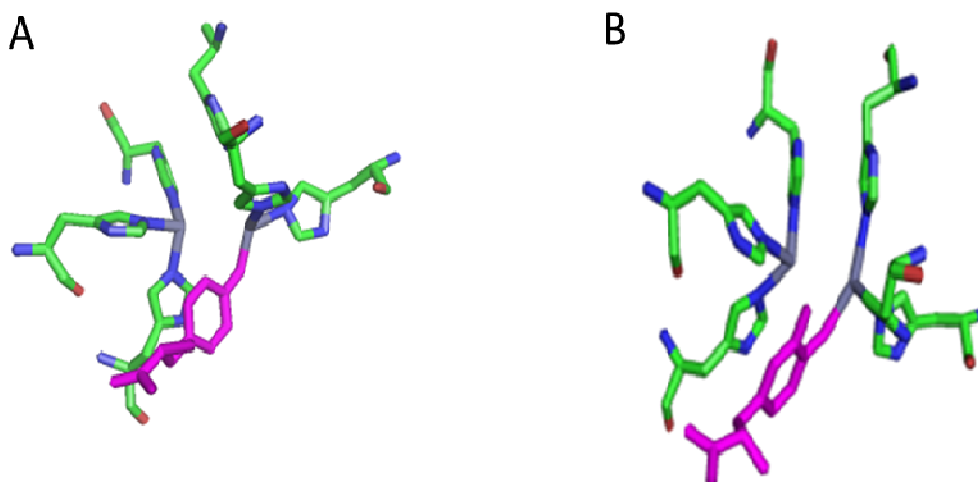


Figura 3.15. Detalle del sitio activo de tirosinasa de *Bacillus megaterium* con sus sustratos L-tirosina (A) y L-dopa (B) unidos al sitio binuclear de cobre. El sustrato (magenta), se encuentra unido a uno de los átomos de cobre y las histidinas se encuentran rodeándolo en la ayuda del proceso catalítico de la enzima (Goldfeder et al., 2014).

1.3.4.3. Diferencias estructurales entre tirosinasas y catecol oxidasas.

Tirosinasa es una enzima capaz de *orto*-hidroxilar tirosina mientras que CO oxida exclusivamente *orto*-difenoles. Una diferencia para explicar esta distinta actividad catalítica sería la presencia de un residuo de fenilalanina (Phe) colocado sobre el Cu_A en CO, que en el caso de tirosinasa estaría sustituido por uno menos voluminoso correspondiente a Ala o Val. Otra explicación podría ser la presencia de un enlace tioéter en las CO, que no está presente en la tirosinasa; sin embargo, la CO, AoCO4, que no posee este enlace tioéter tampoco es capaz de hidroxilar a la tirosina (Hakulinen et al., 2013).

Tabla 3.3. Lista de todas las tirosinasas y catecol oxidasas publicadas y sus características estructurales

Tipo	Organismo	PDB	Resolución	Estructura cuaternaria	Origen	(activa/latente)	Tamaño	Estado del sitio activo	Cu-Cu distancia	Cristalización o aditiva o sustrato	TE Puente	Marcador de posición/ Residuo de bloqueo
TYR	<i>Streptomyces Castaneoglobisporus</i>	1WX2	1.8 Å	Dímero de TYR y caddie	rc (<i>Escherichia coli</i>)	fl (A-TYR)	31/13 kDa	Oxi	3.48 Å	H ₂ O ₂	No	Tyr98 (caddie, di-hidroxilado)/No
TYR	<i>S. castaneoglobisporus</i>	2AHK	1.71 Å	Dímero de TYR y caddie	rc (<i>E.coli</i>)	fl (A-TYR)	31/13 kDa	Met2 (2x H ₂ O puentes)	3.32 Å	CuSO ₄ (calado 6 meses)	No	Tyr98 (caddie)/No
TYR	<i>S. castaneoglobisporus</i>	2AHL	1.60 Å	Dímero de TYR y caddie	rc (<i>E.coli</i>)	fl (A-TYR)	31/13 kDa	Deoxi (1x H ₂ O puentes)	4.17 Å	NH ₂ OH	No	Tyr98 (caddie)/No
TYR	<i>S. castaneoglobisporus</i>	2ZMX	1.33 Å	Dímero de TYR y caddie	rc (<i>E.coli</i>)	fl (A-TYR)	31/13 kDa	Met (~2X H ₂ O puentes)	3.72 Å	CuSO ₄ (calado 36 h)	No	Tyr98 (caddie)/No
TYR	<i>Bacillus megaterium</i>	3NM8	2.00 Å	Homodímero	rc (<i>E.coli</i>)	fl (A-TYR)	34.4 kDa	Met (1x H ₂ O puentes)	3.58 Å	CuSO ₄ (calado 36 h)	No	No/Val218
TYR	<i>Aspergillus oryzae</i>	3W6W	1.39 Å	Homodímero	rc (<i>E.coli</i>)	fl (L-TYR)	71.0 kDa	Met2 (2x H ₂ O puentes)	3.58 Å	No	Si (vuelta)	Phe513/Val359
TYR	<i>Agaricus bisporus</i>	2Y9W	2.30 Å	Heterotetrámero (H ₂ L ₂)	Fuente natural	C-terminal truncado (A-TYR)	45.3/16.5 kDa	Deoxi (1x H ₂ O puentes)	4.43 Å	HoCl ₃	Si (vuelta)	No/Val283

TYR	<i>A. bisporus</i>	2Y9X	2.78 Å	Heterotetrámero (H ₂ L ₂)	Fuente natural	C-terminal truncado (A-TYR)	45.3/16.5 kDa	Deoxi	4.04-4.36 Å	Tropolona /HoCl ₃	Si (vuelta)	Tropolona/Val283
TYR	<i>A. bisporus</i>	4OUA	2.76 Å	Heterodímero A-TYR/L-TYR	Fuente natural	FI and C-terminal truncado (A-TYR/L-TYR)	64.2/43.6 kDa	Deoxi	4.4/4.2 Å	TEW	Si (vuelta)	Phe454/Ala270
TYR	<i>Manduca sexta</i>	3HHS	1.97 Å	Heterodímero (PPO2/PPO1)	Fuente natural	FI (L-TYR)	80.0/78.9 kDa	Deoxi (1XH ₂ O puentes en PPO2, cero en PPO1)	4.86/4.53 Å	No	No	Phe88/Glu395_Phe85/Ser393
CO	<i>Ipomoea batatas</i>	1BT3	2.50 Å	Monómero	Fuente natural	C-terminal truncado (activo)	38.8 kDa	Met (1X OH puentes)	2.87 Å	No	Si (vuelta de hélice)	No/Phe261
CO	<i>I.batatas</i>	1BT2	2.70 Å	Dímero	Fuente natural	C-terminal truncado (activo)	38.8 kDa	Deoxi (1x H ₂ O puentes)	4.37 Å	No	Si (vuelta de hélice)	No/Phe261
CO	<i>I.batatas</i>	1BUG	2.70 Å	Dímero	Fuente natural	C-terminal truncado (activo)	38.8 kDa	Deoxi	4.25 Å	Feniltiourea (PTU)	Si (vuelta de hélice)	No/Phe261

CO	<i>Vitis vinifera</i>	2P3X	2.20 Å	Monómero	Fuente natural	C-terminal truncado (activo)	38.4 kDa	Met (1X OH puentes)	4.17 Å	No	Si (vuelta de hélice)	No/Phe259
CO	<i>Aspergillus oryzae</i>	4J3P	2.50 Å	Monómero	rc (<i>Trichoderma reesei</i>)	fl (activo)	42.0 kDa	Oxi (puentes por dos átomos de oxígeno)	4.23 Å	No	No (vuelta de hélice)	No/Val299

1.4. Tirosinasa: actividades catalíticas.

Tirosinasa (EC 1.14.18.1) es una enzima con cobre ampliamente distribuida en la naturaleza. Cataliza fundamentalmente dos tipos de reacciones: (a) la *orto*-hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y (b) la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa). Ambos tipos de reacciones requieren oxígeno molecular como segundo sustrato de la enzima (Rodríguez-López et al., 1992a; 1993a; Fenoll et al., 2002a; 2002c; García-Molina et al., 2014a; 2014b).

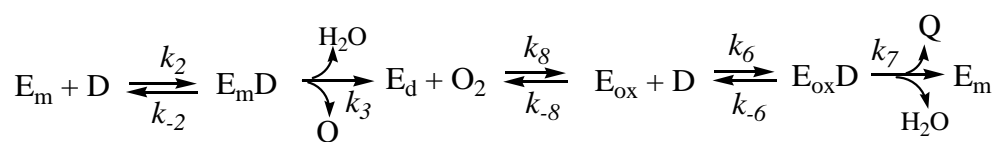
A partir de estudios estructurales de la enzima de *Agaricus bisporus* (Ismaya et al., 2011a; 2011b) se demostró que el sitio activo se encuentra en la superficie de la proteína y que éste posee una cavidad amplia. Estas características facilitan el acceso de distintos tipos de moléculas y en consecuencia la enzima muestra poca especificidad de sustrato (Martínez-Ortíz et al., 1988; Zawistowski et al., 1991; Rodríguez-López et al., 1991b; 1992b; 1992c; 1993b; 1994; García-Molina et al., 2007a; Muñoz-Muñoz et al., 2007a; 2007b; 2008a; García-Molina et al., 2012). En los estudios iniciales sobre tirosinasa se puso de manifiesto claramente, en todas las fuentes biológicas, la actividad difenolasa. Respecto a la actividad monofenolasa, al ser la reacción de hidroxilación más específica y complicada, ésta no se detectó en todas las fuentes biológicas lo que llevó a la conclusión errónea de que estas enzimas serían catecol oxidasas (EC 1.14.18.1) (de Jesus Rivas y Whitaker, 1973; Vámos-Vigyázó, 1981; Wesche-Ebeling y Montgomery, 1990a; 1990b; Leoni et al., 1990). La detección y cuantificación de la actividad monofenolasa requiere un conocimiento profundo del mecanismo de acción de la enzima. Los estudios cinéticos de nuestro grupo de investigación han permitido identificar y caracterizar correctamente, por primera vez, la actividad monofenolasa de la enzima obtenida de diferentes frutas y hortalizas (Espín et al., 1995; 1996; 1998a; 1998b; 1998c). Por otra parte, como se ha descrito anteriormente, el sitio activo está localizado muy cerca de la superficie de la proteína y esto lleva consigo que moléculas análogas a los sustratos fundamentales de la enzima (monofenoles y *o*-difenoles) puedan llegar al sitio activo. Esta situación da lugar a que la tirosinasa presente muchas actividades como son: actividad ascorbato oxidasa, oxidando ácido ascórbico a dehidroascórbico (Ros et al., 1995; 1996; Espín et al., 2000a; Muñoz-Muñoz et al., 2009a), actividad catalasa, descomponiendo el peróxido de hidrógeno (Yamazaki et al., 2004; García-Molina et al., 2005a), oxidación de tetrahidropterinas (García-Molina et al., 2009; 2010a), oxidación de NADH (García-Molina et al., 2010b) y oxidación del ácido tetrahidrofólico (García-Molina et al., 2011). Además, con peróxido de hidrógeno la enzima muestra una actividad peroxidasa (Jiménez y García-Carmona., 1996; 2000). La actividad que

muestra tirosinasa en presencia de peróxido de hidrógeno se ha utilizado para demostrar que determinados monofenoles eran sustratos de la enzima y no inhibidores como se había descrito hasta ese momento; así, se ha confirmado que umbeliferona, guayacol, eugenol, isoeugenol, hidroquinona, 4-*terc*-butilfenol, α -naftol, β -naftol, carvacrol y timol son sustratos de la enzima (García-Molina et al., 2012; 2013a). La utilización de peróxido de hidrogeno también ha permitido caracterizar a hidroquinona como un sustrato de tirosinasa (García-Molina et al., 2014a).

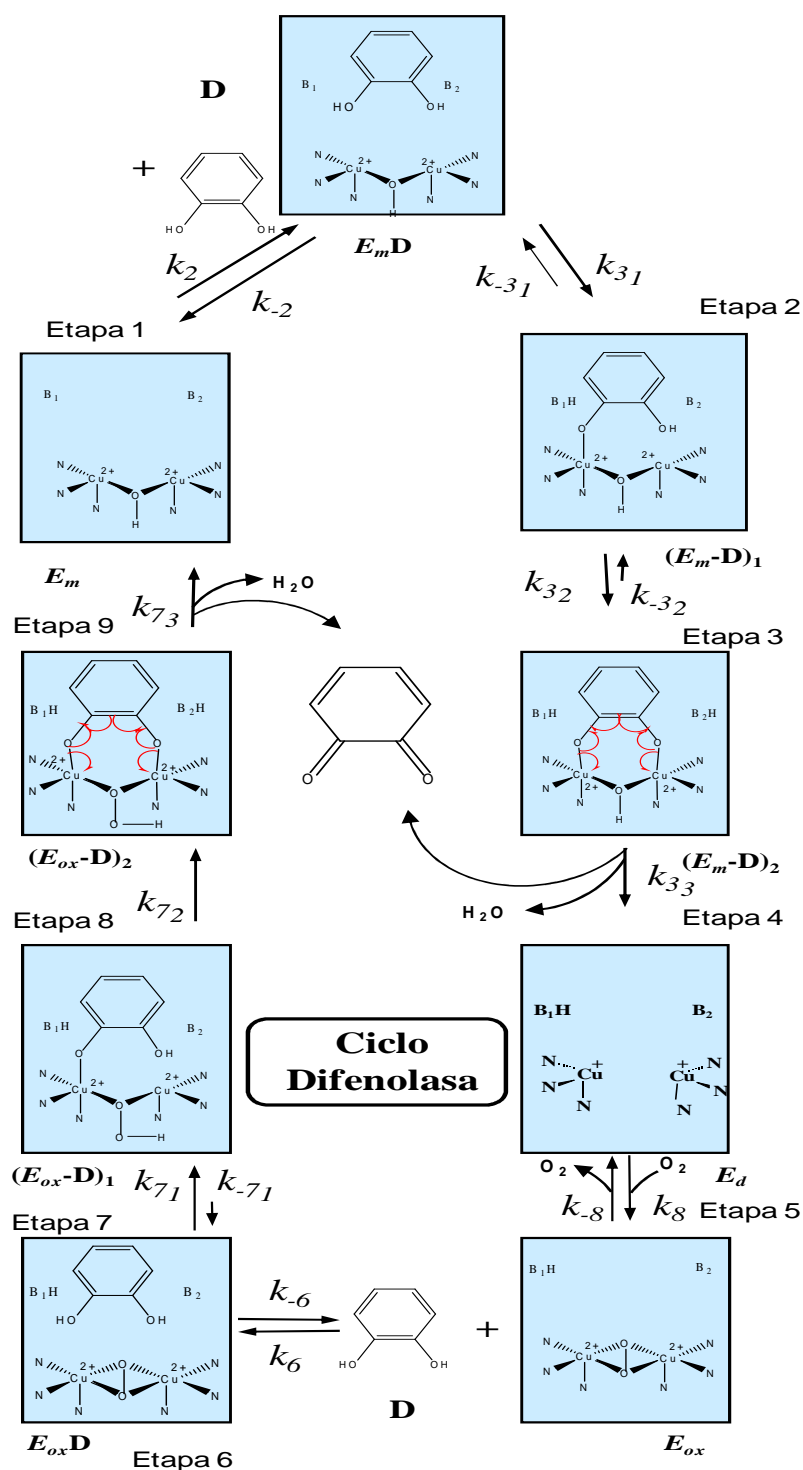
La determinación de estas actividades catalíticas ha sido difícil debido a la alta inestabilidad que tiene el producto de reacción quinónico de cada sustrato. Esta caracterización se ha podido llevar a cabo gracias a la puesta a punto de distintos métodos de medida para cada tipo de producto quinónico (García-Molina et al., 2007a). A continuación se profundizará en cada tipo de actividad catalítica de tirosinasa: difenolasa, monofenolasa, ascorbato oxidasa, catalasa, tetrahidropterina oxidasa, NADH oxidasa, tetrahidrofólico oxidasa y peroxidasa.

1.4.1. Actividad difenolasa

La actividad difenolasa consiste en la oxidación, en un *turnover*, de dos moléculas de *o*-difenol utilizando una molécula de oxígeno. A partir de medidas de velocidad de estado estacionario, el mecanismo cinético que se propone para esta enzima corresponde a un mecanismo Uni Uni Bi Uni Ping Pong; es un mecanismo trisustrato con dos sustratos y dos productos iguales (Galindo et al., 1983). También se han realizado estudios de flujo detenido (*stopped-flow*), en los que se demuestra que oxtirosinasa es un intermedio del ciclo catalítico (Makino y Mason, 1973; Rodríguez-López et al., 2000a). El esquema cinético del mecanismo se muestra en el Esquema 4.1, mientras que el estructural se representa en el Esquema 4.2.



Esquema 4.1. Mecanismo cinético propuesto para explicar la actividad difenolasa de tirosinasa. E_m = metatirosinasa, E_d = desoxitirosinasa, E_{ox} = oxtirosinasa, D = *o*-difenol, Q = *o*-quinona (Galindo et al., 1983).



Esquema 4.2. Mecanismo estructural propuesto para la actividad difenolasa de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Muñoz-Muñoz et al., 2012a).

En el mecanismo propuesto en el Esquema 4.1, la forma metatirosinasa une una molécula de *o*-difenol, probablemente enlazado en primer lugar al Cu_A (Goldfeder

et al., 2014), lo oxida reduciéndose el cobre de Cu^{2+} a Cu^{1+} y originando desoxitirosinasa, esta última reacciona con el oxígeno molecular y forma oxitirosinasa, volviendo los cobres del centro activo al estado de oxidación +2. En una etapa posterior oxitirosinasa une otra molécula de *o*-difenol, el peróxido se reduce a agua y la enzima se regenera como metatirosinasa (Esquema 4.1).

Los *o*-difenoles son mejores nucleófilos que los monofenoles, lo que repercute en una mayor rapidez de reacción para los *o*-difenoles. La etapa determinante del proceso catalítico (Esquema 4.1) es la controlada por k_7 (k_{7_1} , k_{7_2} y k_{7_3}), como se ha demostrado por estudios de efecto isotópico (Peñalver et al., 2003; Fenoll et al., 2004a). La dependencia de los valores de las constantes de Michaelis de distintos monofenoles y *o*-difenoles es más compleja, pues intervienen etapas de enlace y transformación.

A partir de estudios cinéticos en estado estacionario de la acción de tirosinasa sobre una serie de *o*-difenoles, se puso de manifiesto la importancia de la cadena lateral y la hidrofobia o hidrofilia del sustrato objeto de estudio, mediante la determinación de k_6 (Rodríguez-López et al., 2000a).

Los datos obtenidos, mediante el análisis cinético de la acción de la enzima sobre *o*-difenoles en estado estacionario y en fase de transición, permiten el cálculo de k_2 , la constante de unión a la forma metatirosinasa, resultando ($k_2 \gg k_6$) (Rodríguez-López et al., 2000a). Una posible explicación podría ser que en la forma meta (E_m) existe una base desprotonada que capta un protón del hidroxilo del sustrato. Se ha propuesto que podría ser un resto de ácido glutámico en *Manduca sexta* y en *Vitis vinífera* (Li et al., 2009; Virador et al., 2010a; 2010b). Esto también explicaría la mayor rapidez en la unión a la forma meta (E_m) respecto a la forma oxi (E_{ox}), ya que en esta última debe transferirse el protón al grupo peróxido de la enzima (Tyeklar y Karlin, 1989; Casella et al., 1996; Karlin et al., 1998; Klabunde et al., 1998; Rodríguez-López et al., 2000a; Mirica et al., 2002; Peñalver et al., 2003; Piquemal et al., 2003; Fenoll et al., 2004a). Además, los átomos de cobre de metatirosinasa tienen una carga neta de +2 y, por lo tanto, son más positivos que la forma oxi (Etapas 2 y 7 del Esquema 4.2).

El *o*-difenol a través de las Etapas 2 y 3 y las Etapas 7 y 8 se enlaza de forma bidentada a la enzima y es oxidado a *o*-quinona, esto explicaría que la enzima oxide los *o*-difenoles y no a los *p*-difenoles. Sin embargo, existen grupos de investigación que proponen una coordinación monodentada (Klabunde et al., 1998; Eicken et al., 1999).

Estudios cristalográficos con tirosinasas de distintas fuentes han demostrado que las histidinas axiales se encuentran en posición *cis* (Decker et al., 2006; Deeth y Diedrich, 2010; Sendovski et al., 2011), en contra de lo propuesto por otros autores (Matoba et al., 2006). Así, las histidinas unidas a los átomos de cobre son rígidas y, por lo tanto, se postula la existencia de dos bases en el centro activo de la enzima, capaces de aceptar los protones del sustrato (Etapas 3 y 8 del Esquema 4.2). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado la existencia de dos *pK*_as cinéticamente significativos en el sitio activo de la enzima (Muñoz-Muñoz et al., 2010a; 2012a).

La constante catalítica de tirosinasa con respecto a sus sustratos *o*-difenólicos es variable (Solomon et al., 1996; Espín et al., 2000b; Rodríguez-López et al., 2000a). A partir de estos datos se pone de manifiesto que sustratos sin cadena lateral como catecol y pirogalol tienen la constante catalítica más alta, seguidos por los *o*-difenoles con cadena lateral hidrofóbica y, posteriormente, por los de cadena lateral hidrofílica.

El Esquema 4.2 muestra el mecanismo estructural actual propuesto por nuestro grupo de investigación. En este Esquema, el *o*-difenoel se une a la forma meta (E_m), en la Etapa 1, posiblemente formando un enlace de puente de hidrógeno con la base B₁. Posteriormente, el sustrato se une en posición axial a uno de los átomos de cobre de la forma E_m , quizás a Cu_A (Goldfeder et al., 2014) (Etapa 2); esta coordinación va acompañada de la transferencia del protón a un residuo proteico B₁ (posiblemente una histidina) (Etapa 2). La coordinación bidentada del *o*-difenoel (Etapa 3) está acompañada de una segunda transferencia de protón, probablemente a una segunda base B₂ próxima al Cu_B. La transferencia electrónica a partir del *o*-difenoel conduce a la formación de la *o*-quinona y a la especie desoxitirosinasa (E_d), (Etapa 4). A continuación, tiene lugar la unión del oxígeno en el plano ecuatorial de los cobres (Etapa 5), generando la forma oxitirosinasa, en la cual el peróxido está coordinado a los dos iones de cobre oxidados, Cu²⁺. En la reacción de la forma oxi (E_{ox}) con una segunda molécula de *o*-difenoel (Etapa 6), la coordinación de *o*-difenoel a uno de los iones de cobre del sitio activo está acompañada de la transferencia de un protón al grupo peróxido (Etapa 7), lo que está de acuerdo con trabajos anteriores (Tyeklar y Karlin, 1989; Casella et al., 1996; Karlin et al., 1998; Klabunde et al., 1998; Rodríguez-López et al., 2000a; Mirica et al., 2002; Peñalver et al., 2003; Piquemal et al., 2003; Fenoll et al., 2004a). La coordinación de *o*-difenoel se ha propuesto que se produzca de manera diaxial, ya que el plano ecuatorial estaría ocupado por el peróxido (Etapa 9). Para la coordinación bidentada del *o*-difenoel se transfiere un segundo protón,

probablemente al igual que en la forma meta, por transferencia a una segunda base B₂ próxima al Cu_A, lo que está de acuerdo con la flexibilidad del sitio activo (Matoba et al., 2006; Sendovski et al., 2011; Ismaya et al., 2011a; 2011b) y con la existencia de dos *pK*s en la enzima (Muñoz-Muñoz et al., 2010a; 2012a). La transferencia electrónica del *o*-difenoal al grupo peróxido origina la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno, la formación de una molécula de agua y la correspondiente *o*-quinona, regenerándose metatirosinasa (Etapa 10). En esta última etapa, los residuos proteicos B₁ y B₂ actúan como ácidos proporcionando los protones necesarios para la liberación de la molécula de agua. A altas concentraciones de *o*-difenoal surgen desviaciones de la cinética michaeliana (Muñoz-Muñoz et al., 2010d; 2011c).

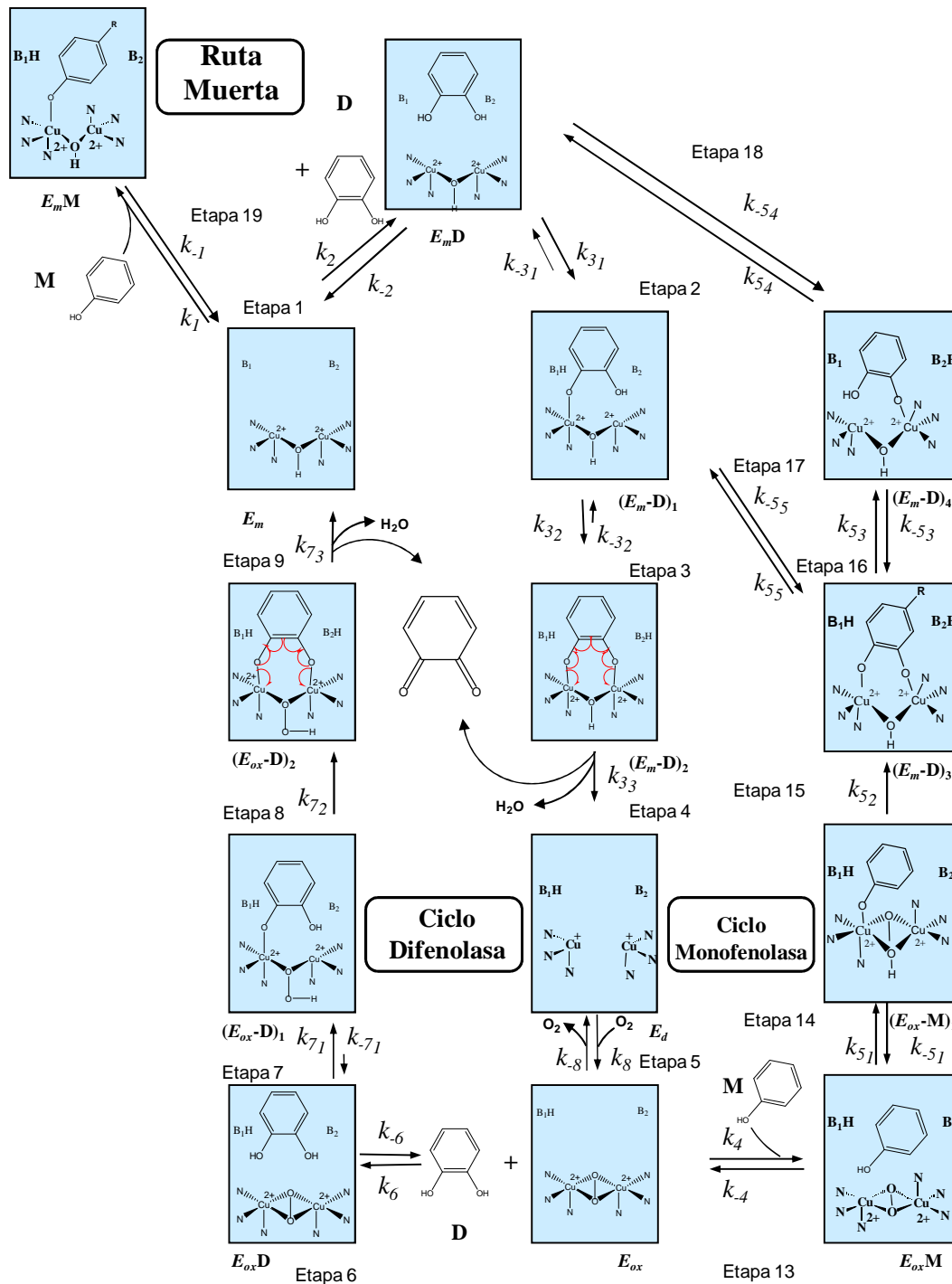
1.4.2. Actividad monofenolasa

Como se comentó anteriormente, tirosinasa muestra varias actividades enzimáticas y una de ellas es la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoal. La secuencia de reacciones se muestra en el Esquema 4.3. El estudio de esta actividad ha atraído la atención de muchos investigadores (Mason, 1956; Osaki, 1963; Vanneste y Zuberbühler, 1974; Cabanes et al., 1987a; Naish-Byfield y Riley, 1992; Rodríguez-López et al., 1992b; Ros et al., 1994a; 1994b; Fenoll et al., 2000a; 2000b; 2000c; 2002b; Peñalver et al., 2002b; Fenoll et al., 2004b). Las características más ampliamente descritas de la actividad monofenolasa son:

- (a) La actividad monofenolasa siempre se expresa junto con la actividad difenolasa, puesto que el producto de la primera actividad es el *o*-difenoal, que es sustrato de la segunda actividad.
- (b) Las etapas no enzimáticas que se originan a partir de *o*-dopaquinona son iguales en las dos actividades.
- (c) La actividad monofenolasa muestra un período de retardo en la acumulación del producto dopacromo antes de llegar al estado estacionario. El período de retardo depende de la naturaleza de la enzima, de su concentración y de la naturaleza y concentración del sustrato. Los estudios sobre el período de retardo de tirosinasa son numerosos (Pomerantz, 1966; Duckworth y Coleman, 1970; García-Molina et al., 2005b; 2005d). El período de retardo puede ser eliminado en presencia de *o*-difenoal y de otros agentes reductores como ácido ascórbico (Ros et al., 1993a), tetrahidropterinas (García-Molina et al., 2007b; 2009; 2010a), NADH (García-Molina et al., 2010b) o con ácido tetrahidrofólico (García-Molina et al., 2011). Nuestro grupo de investigación ha establecido el significado del período de retardo y, además, ha

obtenido una expresión analítica aproximada para cuantificarlo (Rodríguez-López et al., 1992b; Fenoll et al., 2001; García-Molina et al., 2007a). En el Esquema 4.3 se muestra el mecanismo cinético propuesto para las dos actividades de tirosinasa que se superponen en la actuación de la enzima. Según el mecanismo descrito en el Esquema 4.3, la especie oxirosinasa reacciona con el monofenol, forma un complejo ternario ($E_{ox}M$) que permite la hidroxilación del monofenol a *o*-difeno (E_mD), a partir de este intermedio puede ocurrir la oxidación del *o*-difeno a *o*-quinona originando la forma desoxitirosinasa o bien la liberación del *o*-difeno, liberando la forma E_m (Mason, 1956; Fenoll et al., 2001; Muñoz-Muñoz et al., 2012b). Para cerrar el ciclo catalítico tirosinasa debe reaccionar con una molécula de oxígeno, caso de desoxitirosinasa, o bien con una molécula de *o*-difeno en el caso de la forma E_m y, por lo tanto, el *o*-difeno actúa como un cosustrato en lugar de un activador (Cabanes et al., 1987a; Rodríguez-López et al., 1992b; Ros et al., 1994a; 1994b). En el estado estacionario la enzima debe acumular una cantidad de *o*-difeno tal que debe cumplir la relación $R = [D]_{ss} / [M]_{ss}$ (Rodríguez-López et al., 1992b; Ros et al., 1993a; 1993b; 1994a; Rodríguez-López et al., 2001). Para que la concentración de *o*-difeno no varíe, en el estado estacionario la enzima debe realizar dos ciclos en la ruta monofenolasa por una en la difenolasa (Fenoll et al., 2001; Peñalver et al., 2005).

En el Esquema 4.4 se incluyen todas las etapas del mecanismo propuesto para explicar la hidroxilación de monofenoles, que incluyen las etapas de la actividad difenolasa. En este esquema existen puntos críticos como son la desprotonación del monofenol, que ocurre en la Etapa 13 donde el monofenol se enlaza a la forma E_{ox} transfiriendo el protón del grupo hidroxilo de C-4 al peróxido y posteriormente, mediante la Etapa 14, se une en axial al átomo de cobre, probablemente al Cu_A (Goldefer et al., 2014). A continuación, se lleva a cabo un ataque electrofílico al anillo en C-3, por parte del oxígeno del peróxido, originando un intermedio $(E_m - D)_3$ en el cual el *o*-difeno está unido en axial/ecuatorial. En esta situación, debido a la falta de coplanariedad de los orbitales, no puede darse la oxidación/reducción concertada y el *o*-difeno puede romper el enlace con el cobre Cu_A (Etapa 16) originando la especie $(E_m - D)_4$ y, por otra parte, a través de la Etapa 18 se puede originar la especie $(E_m - D)$, un intermedio de la actividad difenolasa. A su vez, la especie $(E_m - D)_3$ puede romper el enlace con el cobre Cu_B (Etapa 17) originando el intermedio $(E_m - D)$, que conecta con el ciclo difenolasa (Esquemas 4.2 y 4.4). Un punto muy



Esquema 4.4. Mecanismo estructural propuesto para explicar la hidroxilación de sustratos monofenólicos y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas catalizada por tirosinasa de *Agaricus bisporus* en presencia de oxígeno (Muñoz-Muñoz et al., 2012a).

1.4.3. Estereoespecificidad de las actividades monofenolasa y difenolasa

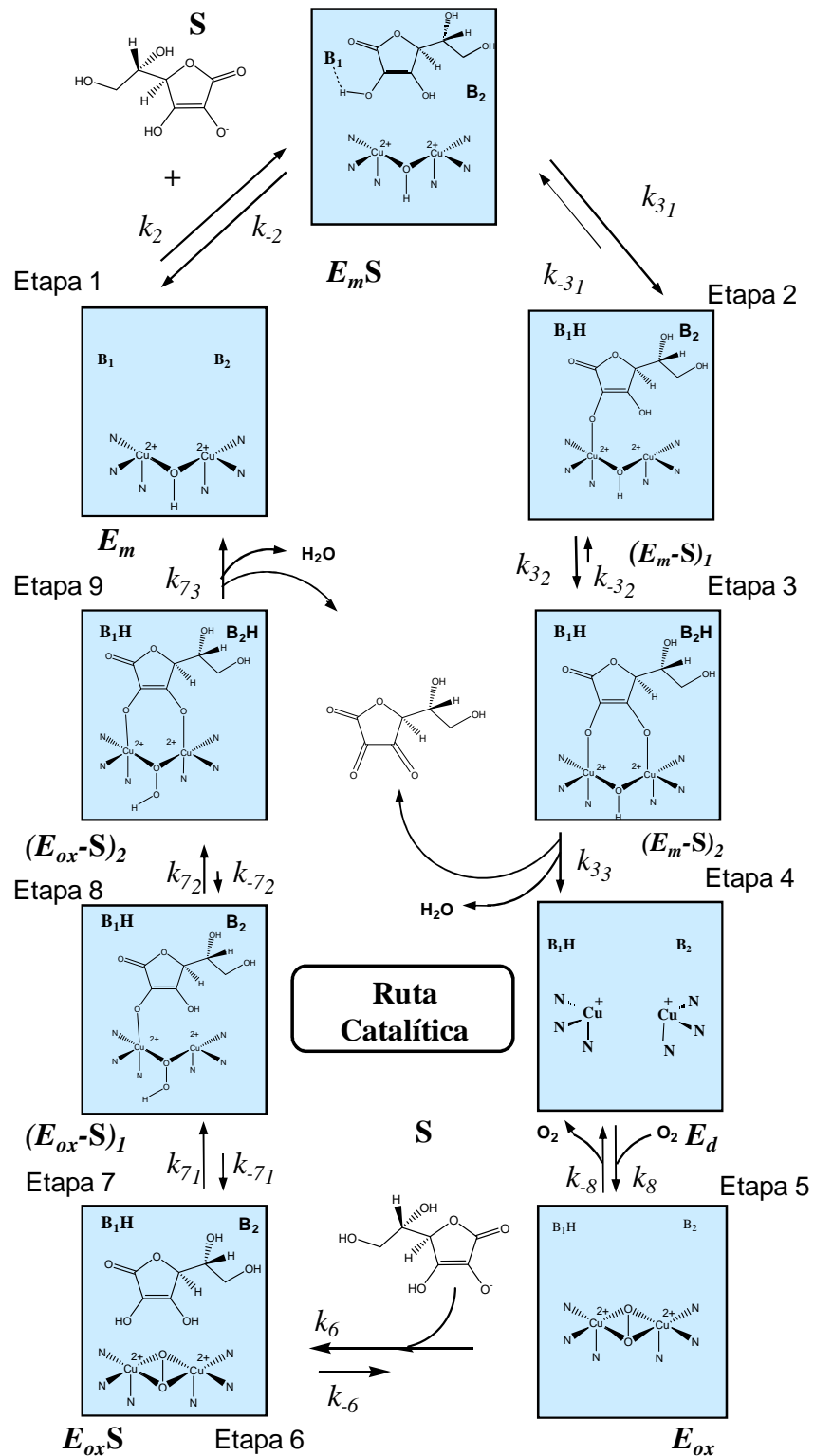
Tirosinasa es una enzima que muestra estereoespecificidad de enlace. Los isómeros L tienen una constante de Michaelis menor que los isómeros D; sin embargo, la rapidez de catálisis es la misma. Por otra parte los valores de los desplazamientos químicos de los carbonos 3 y 4 del sustrato son los mismos para los dos isómeros, lo que apunta a que ambos centros poseen una densidad electrónica similar. Este hecho lleva consigo que la etapa de ataque nucleofílico sea la misma para los dos isómeros (Espín et al., 1998a; 1998b). Respecto a la inactivación suicida la enzima muestra el mismo tipo de estereoespecificidad, siendo más afín por los isómeros L y mostrando la misma rapidez de catálisis para ambos isómeros (Muñoz-Muñoz et al., 2009a; 2010b).

1.4.4. Actividad ascorbato oxidasa

El ácido ascórbico, o vitamina C, es un reductor muy potente en la naturaleza, tirosinasa es capaz de oxidarlo. Los parámetros cinéticos obtenidos para esta oxidación mostraron una constante catalítica baja ($0.97 \pm 0.05\text{s}^{-1}$) y una constante de Michaelis alta ($2.79 \pm 0.11\text{ mM}$) (Muñoz-Muñoz et al., 2009a).

La actividad ascorbato oxidasa de tirosinasa se puso de manifiesto para la enzima de champiñón hace tiempo (Ros et al., 1995). Los estudios sobre la estructura de la enzima y la demostración de que el sitio activo está en la superficie de la proteína (Ismaya et al., 2011a; 2011b), pueden explicar el acceso y la oxidación del ácido ascórbico como sustrato de la enzima.

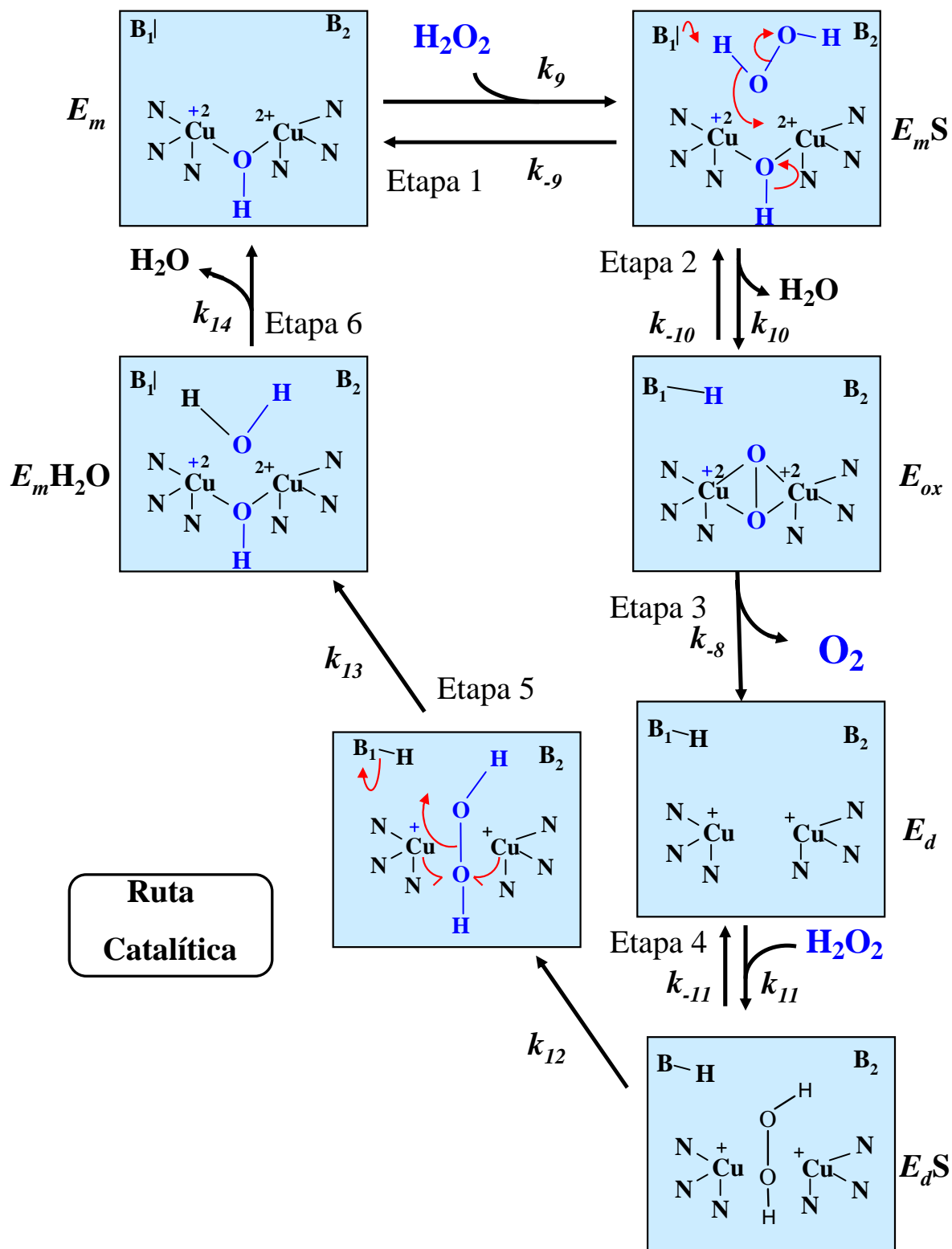
El mecanismo cinético sería análogo al mostrado en el Esquema 4.1 para los α -difenoles, en cuanto al mecanismo estructural se detalla en el Esquema 4.5. En la Etapa 1 el ácido ascórbico protonado (**S**) interacciona con E_m formando el complejo $E_m\text{S}$, a través de la base B_1 . Posteriormente, se cede el protón a la base B_1 y ataca el oxígeno al átomo de cobre A, Cu_A (Goldfeder et al., 2014). Seguidamente se transfiere otro protón a la base B_2 , posiblemente cercana al Cu_B , y el sustrato se une diaxialmente a la enzima (Etapa 3). Debe indicarse que en este proceso se presentan dos bases en el centro activo de la enzima y además que las histidinas unidas a los átomos de cobre se consideran fijas, como se indicó anteriormente. En la Etapa 4 ocurre el proceso de oxidación/reducción concertado, la enzima se reduce a la forma E_d y se libera el ácido dehidroascórbico. A continuación, en la Etapa 5 se une una molécula de oxígeno, pasando la enzima a la forma E_{ox} . En la Etapa 6 se une otra molécula de sustrato a la forma E_{ox} y se transfiere un protón al puente peróxido (Etapa 7). La base B_2 acepta un protón del sustrato y éste se une de forma diaxial (Etapa 8). Finalmente, el sustrato se oxida (Etapa 9), liberándose ácido dehidroascórbico y la forma E_m (Muñoz- Muñoz et al., 2009a).



Esquema 4.5. Mecanismo estructural propuesto para la oxidación del ácido ascórbico (S) por tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Muñoz-Muñoz et al., 2009a).

1.4.5. Actividad catalasa

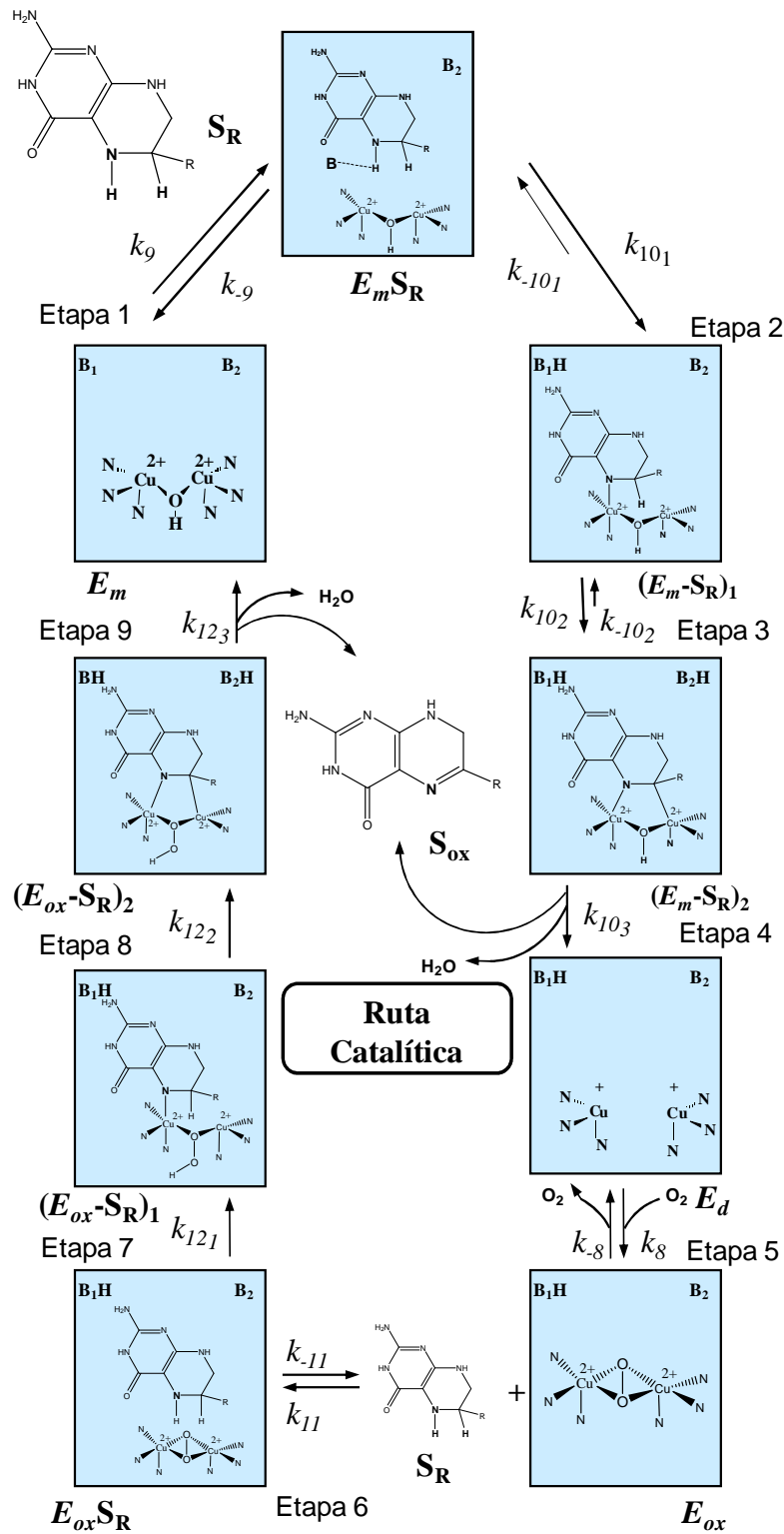
Se ha puesto de manifiesto que tirosinasa muestra actividad catalasa cuando se encuentra con H_2O_2 como único sustrato disponible (Yamazaki et al., 2004; García-Molina et al., 2005a). La descomposición del H_2O_2 por tirosinasa se muestra en el Esquema 4.6. En la Etapa 1, el H_2O_2 reacciona con E_m originando el complejo E_mS , que libera una molécula de agua (Etapa 2), transformándose en la especie enzimática E_{ox} . En condiciones anaerobias, se libera oxígeno (Etapa 3) y la enzima se transforma en E_d . En la Etapa 4 y mediante otra molécula de H_2O_2 se origina el complejo E_dS , el cual mediante las Etapas 5 y 6 libera H_2O y E_m . Además, durante esta actividad catalítica de tirosinasa, la enzima sufre un proceso de inactivación suicida (García-Molina et al., 2005a).



Esquema 4.6. Mecanismo estructural descrito para la descomposición del H_2O_2 por tirosinasa de *Agaricus bisporus* gracias a su actividad catalasa (García-Molina et al., 2005a).

1.4.6. Actividad tetrahydropterina oxidasa

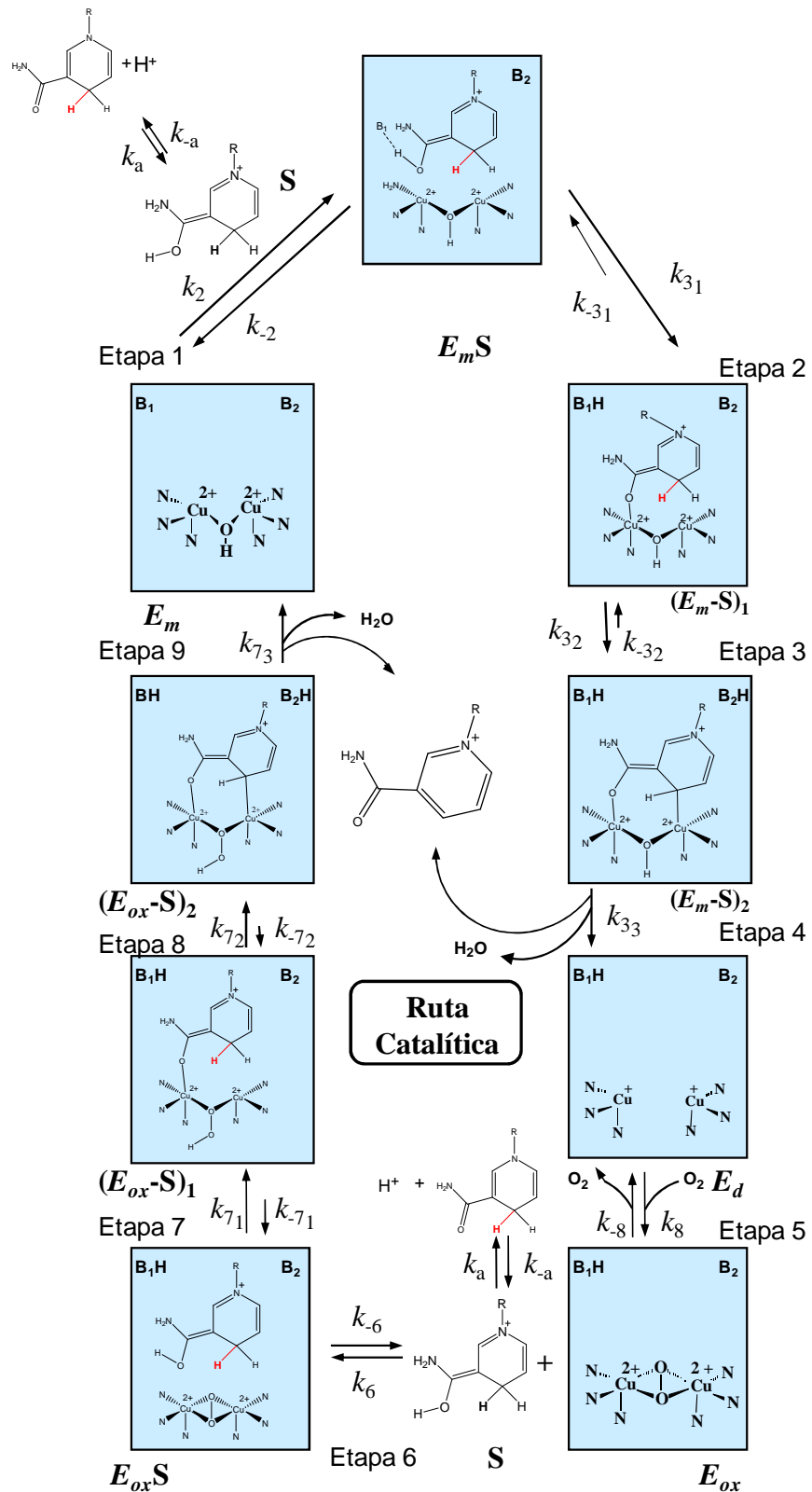
Tirosinasa es capaz de oxidar a las tetrahydropterinas mediante la actividad que nuestro grupo de investigación denominó tetrahydropterin oxidasa. En trabajos publicados recientemente (García-Molina et al., 2007b; 2009; 2010a; Muñoz-Muñoz et al., 2011a) se puso de manifiesto que tirosinasa es capaz de oxidar a la 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina y a sus derivados metilados 6-metil-5,6,7,8-tetrahydropterina y el 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahydropterina (Esquema 4.7). El mecanismo estructural propuesto en el Esquema 4.7, indica las posibles etapas que tienen lugar en esta oxidación. El ataque a los átomos de cobre ocurriría a través de los átomos de nitrógeno y carbono del sustrato. En la unión a la forma E_{ox} , nuevamente atacaría el sustrato transfiriendo un protón al peróxido y el otro a la base B_2 . En ambos casos una oxidación/reducción llevaría a la formación del sustrato oxidado y las formas E_d y E_m respectivamente.



Esquema 4.7. Mecanismo estructural propuesto para la oxidación de las tetrahydropterinas (S_R) por tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Muñoz-Muñoz et al., 2011a).

1.4.7. Actividad NADH oxidasa

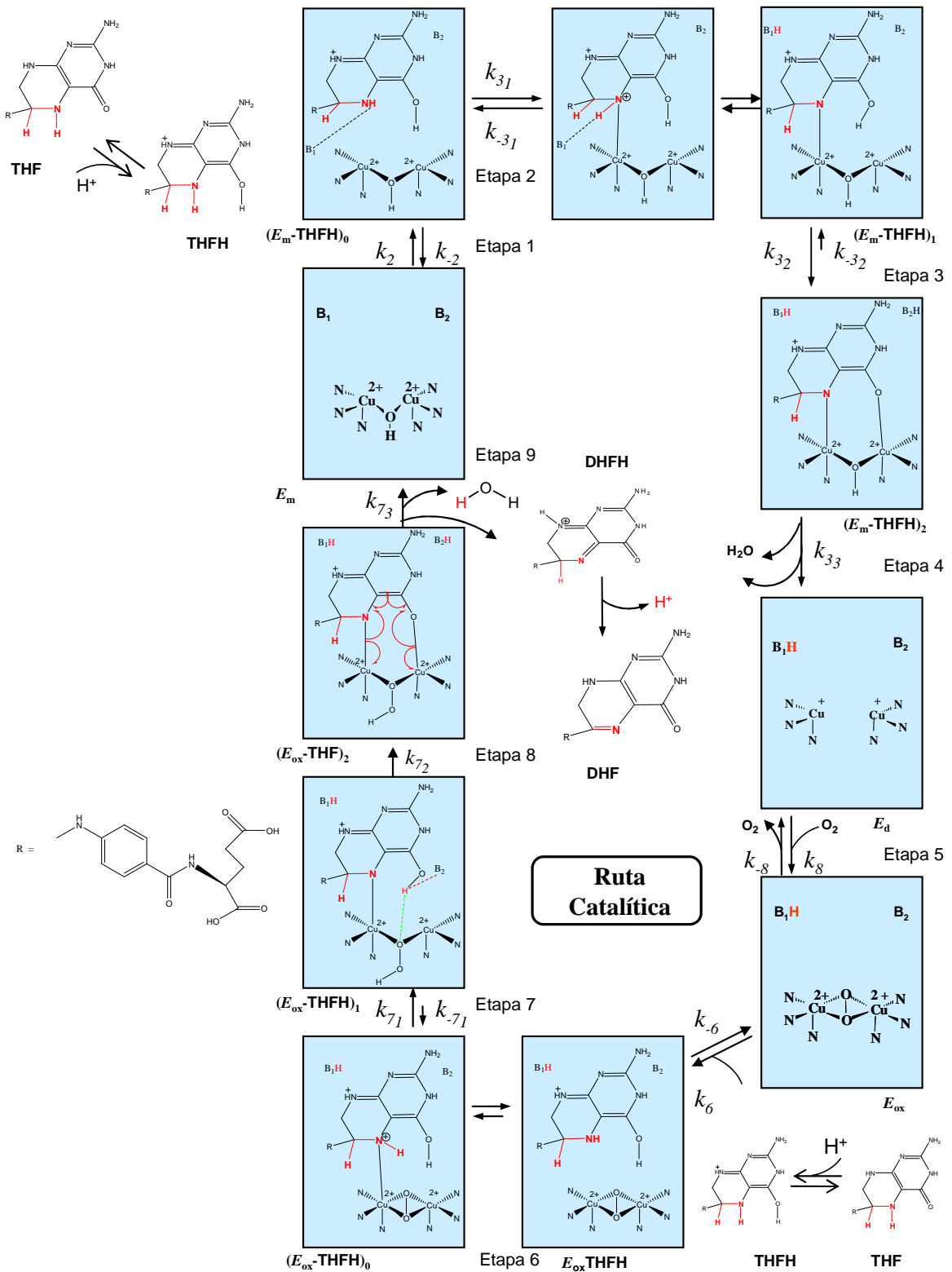
Se sabía que el coenzima NADH acortaba el período de retardo en la actividad monofenolasa de tirosinasa (Pomerantz, 1966). Nuestro grupo de investigación consiguió demostrar que el NADH es sustrato de tirosinasa, por lo tanto tirosinasa de *Agaricus bisporus* tiene una actividad NADH oxidasa. El Esquema 4.8 muestra las distintas etapas del mecanismo propuesto.



Esquema 4.8. Mecanismo estructural propuesto para explicar la oxidación del NADH (S) por tirosinasa de *Agaricus bisporus* (García-Molina et al., 2010b).

1.4.8. Actividad tetrahidrofólico oxidasa

Recientemente nuestro grupo de investigación demostró la oxidación del ácido tetrahidrofólico por tirosinasa de *Agaricus bisporus* (García-Molina et al., 2011). El Esquema 4.9 muestra detalladas las posibles etapas del mecanismo estructural propuesto. En la oxidación del ácido tetrahidrofólico intervienen un átomo de nitrógeno protonado y un grupo hidroxilo. La reacción según se muestra en el Esquema 4.9 se iniciaría con la forma protonada del sustrato.



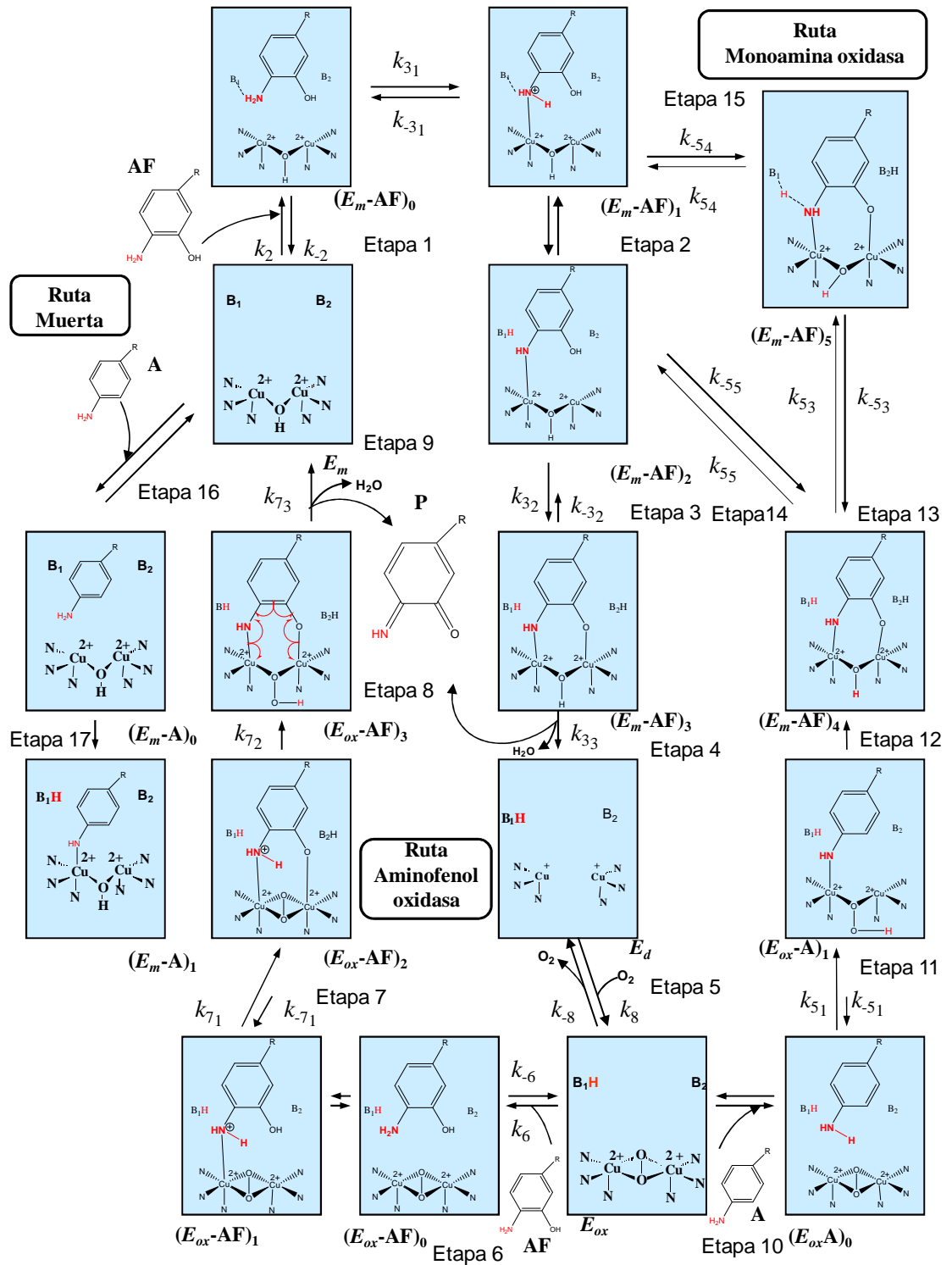
Esquema 4.9. Mecanismo estructural propuesto para la oxidación del ácido tetrahidrofólico (THF) por tirosinasa de *Agaricus bisporus* (García-Molina et al., 2011).

1.4.9. Oxidación de *o*-aminofenoles y *o*-aminas aromáticas

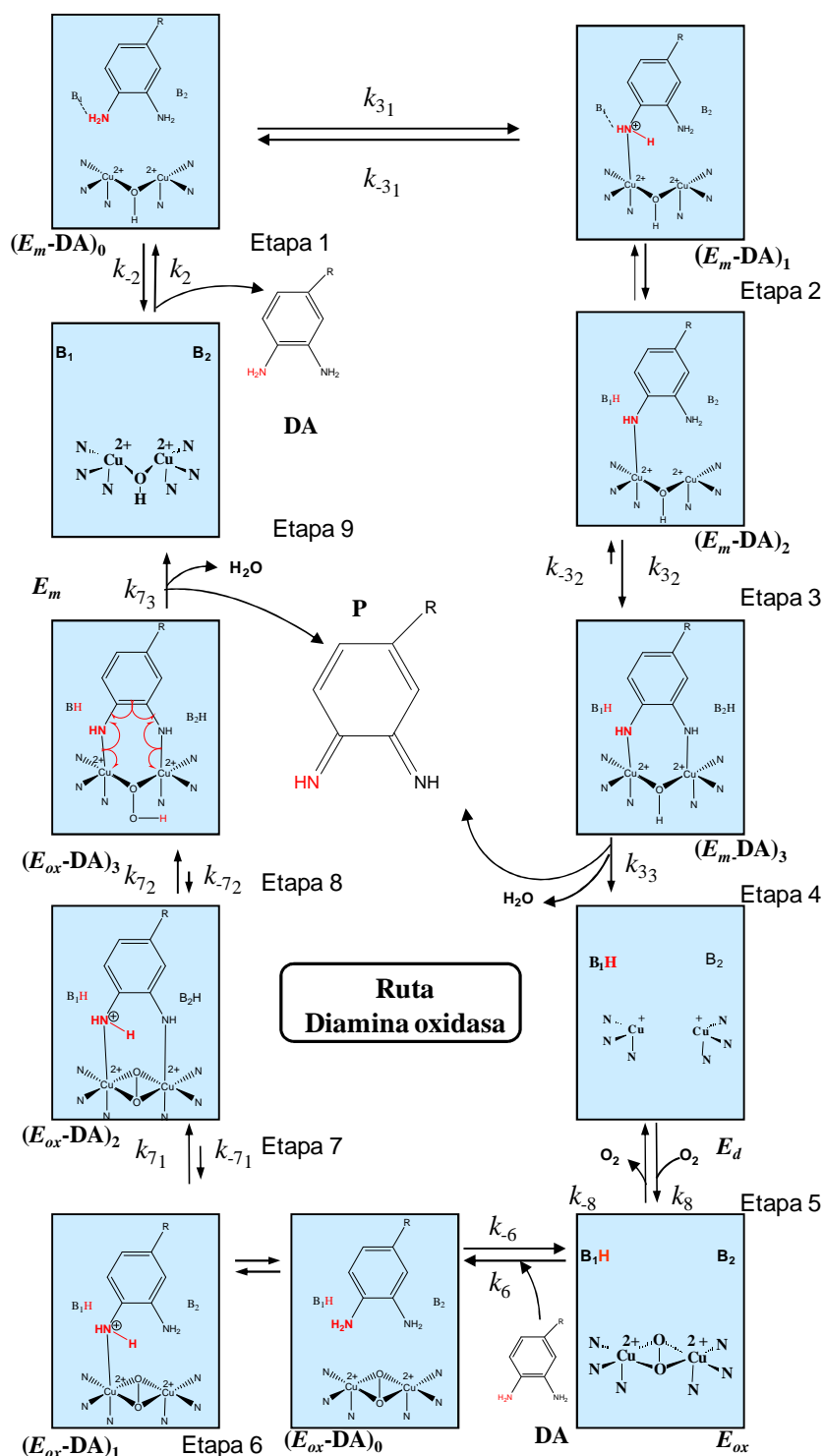
La hidroxilación de monoaminas aromáticas, la oxidación de *o*-aminofenoles y *o*-diaminas, se describió hace tiempo (Toussaint y Lerch, 1987). Posteriormente se publicaron algunos trabajos aislados (Rescigno et al., 1998; Sanjust et al., 2003; Gasowska et al., 2004; Rescigno et al., 2011a). Y recientemente se ha llevado a cabo un estudio sistemático de estos procesos (Muñoz-Muñoz et al., 2011d; 2012c).

Los mecanismos estructurales propuestos para explicar la hidroxilación de monoaminas aromáticas y la oxidación de *o*-aminofenoles se muestran en el Esquema 4.10. El mecanismo propuesto para la oxidación de los *o*-diaminas se muestra en el Esquema 4.11.

En general, se cumple que la constante catalítica de la acción de la enzima sobre monofenoles es mucho mayor que sobre monoaminas, ya que la etapa limitante es la transferencia del protón del nitrógeno al peróxido de la forma oxitirosinasa. En cuanto a las *o*-diaminas, su constante catalítica es mucho menor que la de los *o*-difenoles, puesto que deben ocurrir dos transferencias de protones desde átomos de nitrógeno.



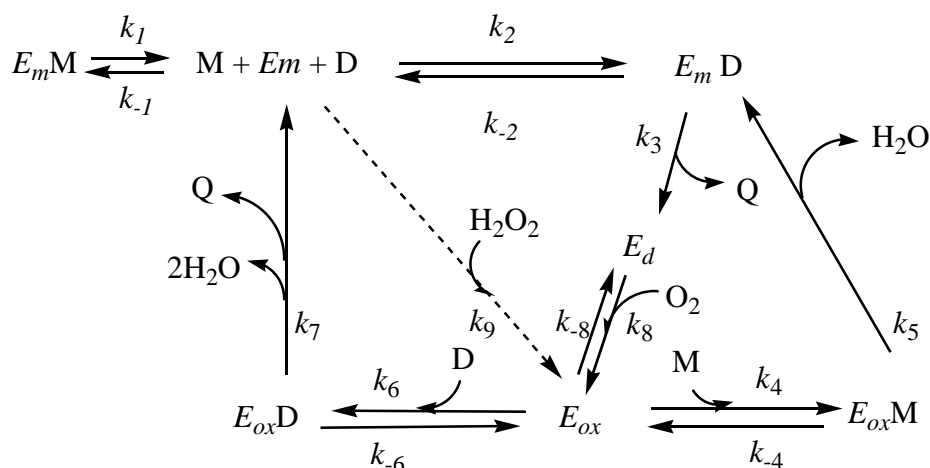
Esquema 4.10. Mecanismo estructural propuesto para la hidroxilación y oxidación de monoaminas aromáticas y o-aminofenoles por tirosinasa de *Agaricus bisporus*. A = monoamina, AF = o-aminofenol y P = producto o-quinonaimina (Muñoz-Muñoz et al., 2011d).



Esquema 4.11. Mecanismo estructural propuesto para la oxidación de α -diaminas aromáticas por tirosinasa de *Agaricus bisporus*. DA = α -diamina aromática, P = producto α -diimina (Muñoz-Muñoz et al., 2011d).

1.4.10. Actividad monofenolasa de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrógeno

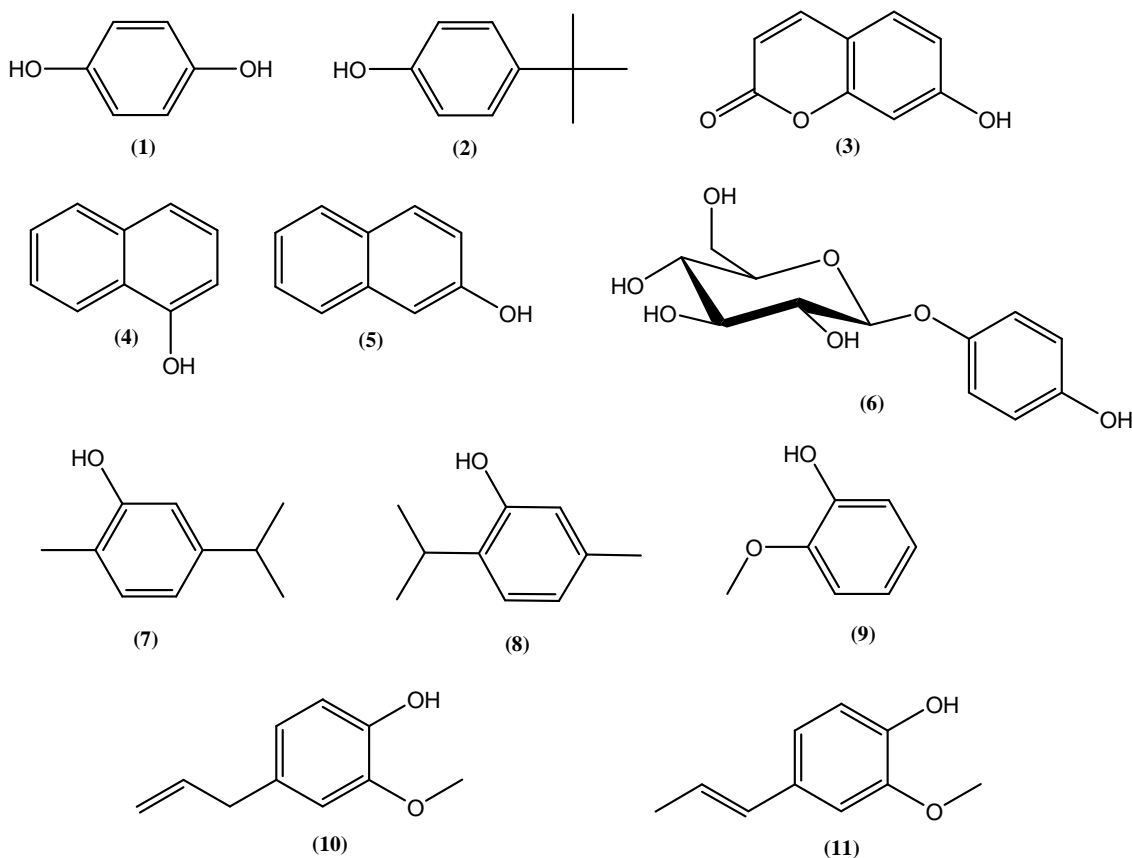
La forma E_{ox} de tirosinasa es la única capaz de hidroxilar monofenoles a *o*-difenoles. Aunque en la forma nativa de la enzima existe una mezcla de meta y oxitirosinasa, es necesario que en el medio de reacción se genere un reductor para pasar la enzima de meta a desoxi y en presencia de oxígeno a oxi (Sánchez-Ferrer et al., 1995). Esta situación ocurre cuando se estudia la pareja de sustratos fisiológica L-tirosinasa/L-dopa (Rodríguez-López et al., 1992b). Sin embargo, cuando se estudia la actividad de la enzima sobre 4-*terc*-butilfenol o bien sobre *N,N*-dimetiltiramina al no generarse *o*-difenol en el medio debido a la estabilidad de la *o-terc*-butilquinona y a la formación de *N,N*-dimetilindololinolato respectivamente, la actividad hidroxilasa de la enzima se muestra dependiente de peróxido de hidrógeno (Jiménez y García-Carmona, 1996; 2000). La secuencia de reacciones en el caso del 4-*terc*-butilfenol se muestra en el Esquema 4.12.



Esquema 4.12. Acción de tirosinasa sobre 4-*terc*-butilfenol en presencia de peróxido de hidrógeno. M = 4-*terc*-butilfenol, D = 4-*terc*-butilcatecol, Q = *o-terc*-butilquinona (Jiménez y García-Carmona, 1996).

1.4.11. Aplicación de la actividad hidroxilasa de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrógeno para investigar a distintos monofenoles como sustratos de tirosinasa

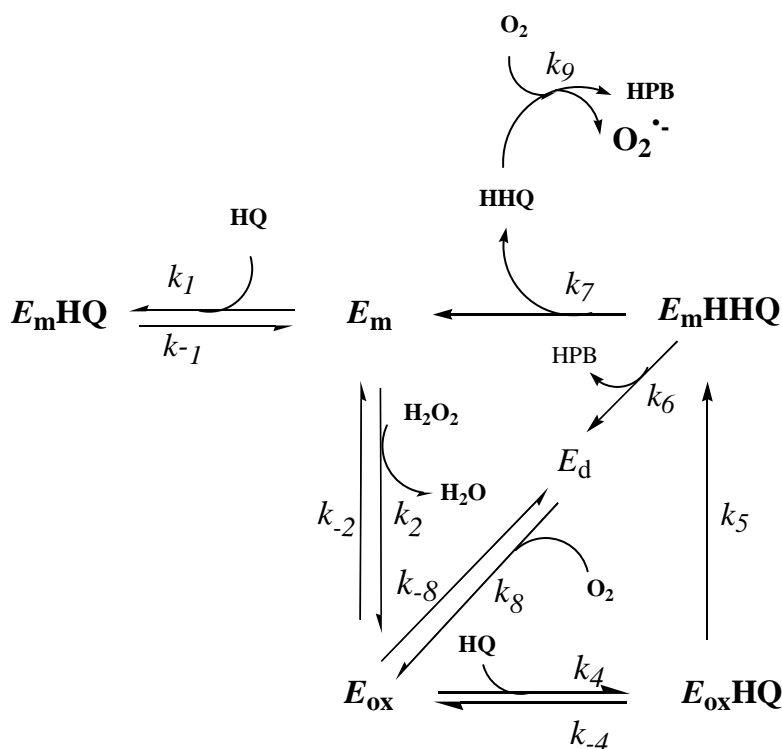
En la bibliografía hay publicados distintos trabajos en los que se propone que algunos monofenoles son inhibidores de tirosinasa (Ros et al., 1994b; Sollai et al., 2008; Lin et al., 2012; Stratford et al., 2012). Este grupo de moléculas se caracterizan por el hecho de que sus *o*-quinonas no evolucionan con estequiometrias definidas generando *o*-difenoles en el medio. Sin embargo, en presencia de H₂O₂, que pasa la forma E_m a E_{ox} , es posible demostrar actividad enzimática de tirosinasa sobre estos compuestos (García-Molina et al., 2012; 2013a; 2013b; Ortíz-Ruiz et al., 2015), lo que ha permitido revisar una serie de moléculas como las descritas en el Esquema 4.13.



Esquema 4.13. Estructuras químicas: (1) Hidroquinona, (2) 4-*terc*-butilfenol, (3) umbeliferona, (4) α -naftol, (5) β -naftol, (6) arbutina, (7) carvacrol, (8) timol, (9) guayacol, (10) eugenol e (11) isoeugenol (García-Molina et al., 2013b).

1.4.12. Acción de tirosinasa sobre hidroquinona

La posibilidad que tiene tirosinasa de hidroxilar monofenoles, en presencia de peróxido de hidrógeno se ha utilizado para estudiar una molécula importante como hidroquinona (García-Molina et al., 2014a). La catálisis de la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno se muestra en el Esquema 4.14 (García-Molina et al., 2014a), resolviendo de esta manera un problema antiguo en el área (Stratford et al., 2012).



Esquema 4.14. Mecanismo cinético propuesto para explicar la acción de tirosinasa sobre HQ en presencia de H₂O₂. E_m , E_{ox} and E_d son met-, oxi- y desoxi-tirosinasa, respectivamente. HQ, HHQ y HPB representan a hidroquinona, 2-hidroxihidroquinona and 2-hidroxi-*p*-benzoquinona, respectivamente. Se muestran los complejos enzimáticos E_mHQ , E_mHHQ y $E_{ox}HQ$ (García-Molina et al., 2014a).

1.5. Tirosinasa: regulación enzimática

La actividad de tirosinasa está regulada en el melanosoma. En este capítulo se describirán diferentes tipos de regulación que tiene esta enzima: externamente con la acción de inhibidores o inactivadores e internamente mediante una inactivación particular de la misma basada en su mecanismo (inactivación suicida).

1.5.1. Inhibidores

La definición de inhibidor de tirosinasa es a veces confusa, ya que algunos autores usan este término para definir como inhibidores moléculas que desvían la ruta de biosíntesis de melaninas generando otras *o*-quinonas distintas a *o*-dopaquinona en lugar de que ocurra una interacción inhibidor/enzima directa. Se han aislado e identificado un gran número de inhibidores tanto de fuentes naturales (Parvez et al., 2007) como sintéticos (Rescigno et al., 2002; Solano et al., 2006; Chang, 2009). Muchos de estos inhibidores se estudian utilizando tirosina/dopa como sustratos y la actividad enzimática se sigue midiendo la formación de dopacromo. Así pues, la inhibición de tirosinasa puede ser clasificada, desde un punto de vista experimental, en diferentes tipos:

1. Agentes reductores que producen la reducción de *o*-dopaquinona a L-dopa. En este tipo se encuentran inhibidores clásicos como ácido ascórbico, que se utiliza como inhibidor de la melanogénesis ya que, al reducir la *o*-dopaquinona, impide la formación de dopacromo y, por tanto, la formación de melaninas.
2. Eliminadores de *o*-dopaquinona, que reaccionan también con ésta y forman compuestos coloreados. En este tipo destacan los compuestos tiólicos como la cisteína, que forma un aducto con la *o*-quinona y ralentiza el proceso de formación de eumelaninas hasta que el compuesto tiólico es consumido.
3. Sustratos enzimáticos alternativos. En este tipo están los compuestos fenólicos cuyo producto quinónico absorbe en una longitud de onda del espectro electromagnético diferente a la del dopacromo. Cuando la enzima tiene una buena afinidad por estos compuestos la formación de dopacromo disminuye y, por tanto, son clasificados erróneamente como inhibidores de la enzima.

4. Inactivadores enzimáticos no específicos. En este tipo se encuadran los ácidos y bases, los cuales desnaturalizan inespecíficamente a la enzima inactivándola.
5. Inactivadores específicos de tirosinasa. Estos son los inhibidores basados en el mecanismo de la enzima, entre los que destacan los sustratos suicidas. Estos compuestos actúan irreversiblemente sobre la enzima induciendo su inactivación suicida.
6. Inhibidores específicos de tirosinasa. Son aquellos inhibidores que se unen reversiblemente a la enzima reduciendo su actividad catalítica.

De todas estas clases, sólo (los del tipo 5 y 6) se pueden considerar como verdaderos inhibidores, ya que son los que se unen a la enzima e inhiben su actividad. Estos verdaderos inhibidores se pueden clasificar en cuatro subtipos: (a) inhibidores competitivos, (b) inhibidores acompetitivos, (c) inhibidores mezcla y (d) inhibidores no competitivos. En cualquier caso, debido a la inespecificidad de tirosinasa, el grado de inhibición de la enzima por cualquier inhibidor nuevo se compara con el del ácido kójico, que es el inhibidor clásico de tirosinasa (Cabanés et al., 1994; Chen et al., 1991) (Figura 5.1). Recientemente se han identificado y caracterizado los genes implicados en la síntesis de las enzimas que catalizan la biosíntesis del ácido kójico a partir de glucosa en *Aspergillus oryzae* (Terabayashi et al., 2010).

Otros inhibidores clásicos de referencia de la tirosinasa son la tropolona (Espín y Wichers, 1999b) y la L-mimosina (Cabanés et al., 1987b) (Figura 5.1).

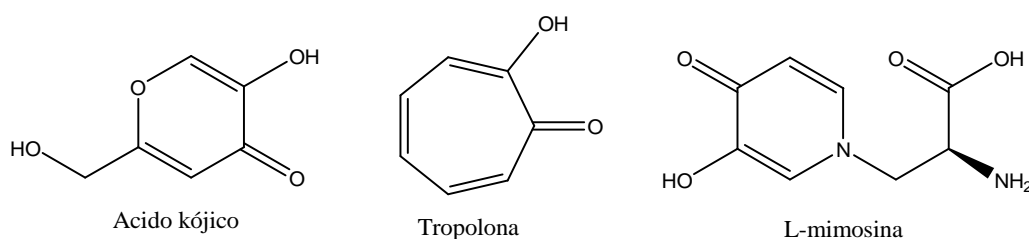


Figura 5.1. Estructuras químicas de los inhibidores de referencia de la tirosinasa: ácido kójico, tropolona y L-mimosina.

El estudio de agentes que causan hipopigmentación, sobre todo en la piel humana, ha atraído la atención de muchos investigadores. Los mecanismos de actuación de estos compuestos son múltiples y comprenden aspectos como: a) inhibición de tirosinasa, maduración y aumento de su degradación; b) inhibición de Mitf

(factor de inducción de la transcripción de la melanogénesis); c) disminución de la actividad de MC1R; d) interferencia en la maduración y transferencia de melanosomas; e) pérdida de melanocitos y f) descamación. La aproximación más estudiada corresponde a la inhibición de tirosinasa, ya que esta enzima cataliza la etapa limitante de la melanogénesis. Aunque el número de inhibidores de tirosinasa estudiados *in vitro* es muy alto, únicamente unos pocos tienen aplicación clínica. Actualmente, se están desarrollando estrategias que suponen el uso de dos o más agentes que actúen por distintos mecanismos para conseguir un efecto sinérgico. Además, en estos compuestos se deben considerar aparte de la inhibición de tirosinasa otros aspectos como: citotoxicidad, solubilidad, absorción cutánea, penetración y estabilidad.

En la Tabla 5.1 se muestran una serie de efectores que pueden reducir la pigmentación en mamíferos a través de distintos mecanismos, los cuales comprenden desde el control de la bioquímica de la melanogénesis hasta la destrucción de melanocitos (Solano et al., 2006).

Tabla 5.1. Efectores biológicos que causan hipopigmentación (Solano et al., 2006).

Mecanismo	Efactor Biológico/ Compuesto	Referencia
Inhibidores de tirosinasa, TRP1, TRP2, principalmente a través de la regulación negativa de MITF	TGF- β 1	Kim et al., 2004a
	TNF α	Martínez-Esparza et al., 1998
	IL1 α , β , IL-6	Choi et al., 2005
	Ácido lisofosfatídico	Kim et al., 2004b
	C2 ceramidas	Kim et al., 2002
	Esfingosilfosforilcolina	Kim et al., 2005
	Simian virus 40 (SV-40)	Prince et al., 2001
	Vitamina E	Funasaka et al., 1999
	Dkk1	Yamaguchi et al., 2004
	Inhibidores de calpaina	Ohguchi et al., 2005
Incrementando la ubiquitinación de tirosinasa	Fosfolipasa D2	Kageyama et al., 2004
	Ácidos grasos	Ando et al., 2004, 2006
Inhibición de la maduración de tirosinasa	Antisentidos a la cadena ligera de la ferritina	Maresca et al., 2006
	Glucoesfingolípidos	Sprong et al., 2001
Disminución de la actividad de MC1R	Proteína agouti	Wolff, 2003
Inhibición cAMP (agentes anti-inflamatorios)	Corticoesteroides	Nanda et al., 2006

Interferencia con la transferencia y maduración de melanosomas.

TGF- β 1	Martínez-Esparza et al., 2001
Inhibidores de serin proteasas	Seiberg et al., 2000a, 2000b
Niacinamida (Vitamina B3)	Hakozaki et al., 2002
Neoglicoproteínas, lectinas	Minwalla et al., 2001

Efecto secundario de la medicación (pérdida de melanocitos):

-Liberación de intermedios tóxicos de síntesis de melanina
-Metabolitos fúngicos tóxicos

Activador del receptor de melatonina	Slominski et al., 1989
Levaduras <i>malessezia</i> (Pityriasis Versicolor)	Carlson et al., 2002
Líquenes	Thoma et al., 2005

Autoimmune:

-Activación de la vía del receptor-7/8-Toll

-Muerte de melanocitos mediada por células dendríticas/T

-Desconocidos

Imiquimod	Brown et al., 2005
Antígenos asociados a melanoma	Luiten et al., 2005
4- <i>terc</i> -butilfenol	Kroll et al., 2005
Triglicidil- <i>p</i> -aminofenol	Jappe et al., 2005
IFN- γ	Carroll et al., 1997
Agentes alquilantes bisulfan	Raanani et al., 2002
Imatinib mesilato	Legros et al., 2005
	Tsao et al., 2003

Los trabajos experimentales de esta Tesis Doctoral se han realizado con tirosinasa de champiñón y, por lo tanto, desarrollaremos fundamentalmente la descripción de los inhibidores de esta enzima. El mecanismo de acción de la mayoría de inhibidores no está completamente explicado. Esto se debe fundamentalmente a la complejidad del mecanismo de tirosinasa, el cual implica tres formas enzimáticas distintas y dos ciclos interpenetrados para explicar su acción sobre monofenoles y *o*-difenoles. Hay descritos un gran número de inhibidores de tirosinasa, estos son de fuentes naturales o sintéticas y son capaces de inhibir la actividad difenolasa o monofenolasa, o bien ambas. Generalmente muchos inhibidores competitivos se parecen estructuralmente al sustrato y su modo de acción implica bien la quelatación de cobre o la inhibición estructural competitiva.

A continuación se describen los inhibidores más importantes descritos en la bibliografía, comenzamos por los inhibidores diseñados a partir de productos naturales para pasar posteriormente a los inhibidores de origen sintético (Chang, 2012; Reddy et al., 2012; Kwak et al., 2013a; 2013b; Peng et al., 2013; Mendes et al., 2014; Lee et al., 2015).

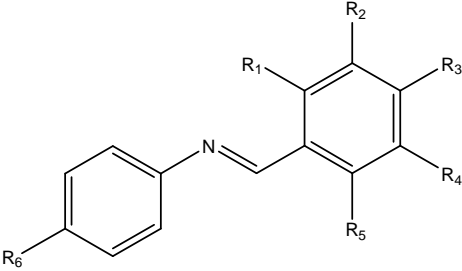
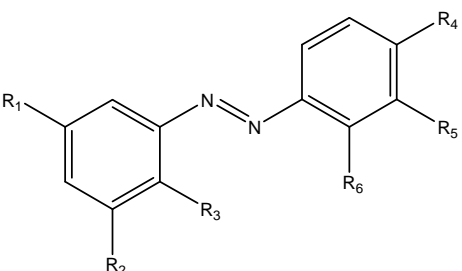
1.5.1.1. Diseño de inhibidores a partir de productos naturales

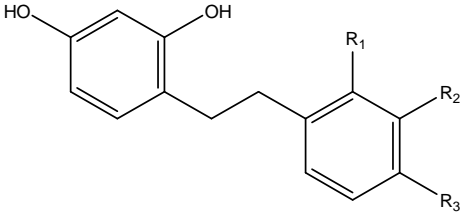
1.5.1.1.1. Derivados del resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-*trans*-estilbeno) y oxiresveratrol (2,3',4,5'-tetrahidroxiestilbeno) son fitoalexinas de origen natural y exhiben un efecto inhibitorio sobre tirosinasa, así como una inhibición de la melanogénesis, además de otras actividades biológicas. El mecanismo de inhibición de resveratrol ha sido demostrado recientemente como tipo k_{cat} (sustrato suicida), pero la eficacia de este compuesto natural no es demasiado buena, por lo que se aconseja su uso como coadyuvante en tratamientos de hiperpigmentación (Satooka y Kubo, 2012; Franco et al., 2012).

Con el fin de mejorar la actividad inhibitoria, se ha desarrollado la síntesis de análogos del resveratrol sustituyendo el grupo CH por un átomo de nitrógeno (Franco et al., 2012) (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Derivados del resveratrol.

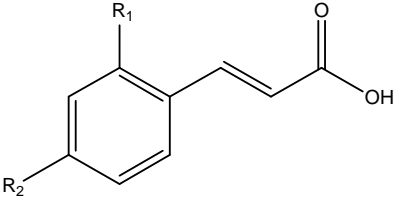
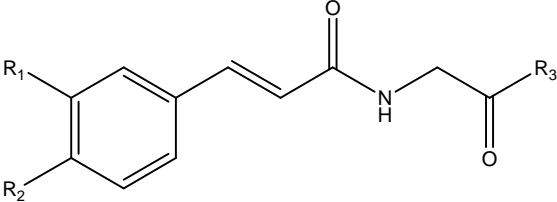
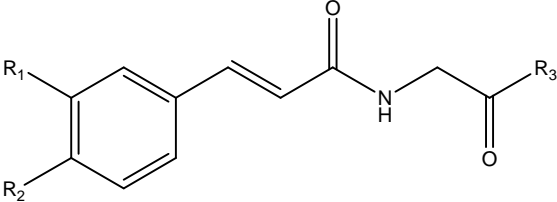
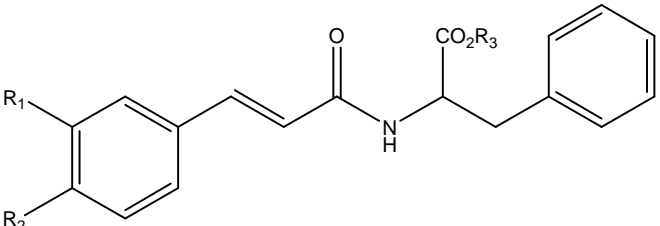
Estructura química	R	IC ₅₀ (μM)	Referencia
	R ₁ , R ₂ , R ₄ , R ₅ , R ₆ = H R ₃ = NO ₂	160.1 (μg/ml)	Franco et al., 2012
	R ₁ , R ₂ , R ₅ = H R ₃ , R ₄ = OH R ₆ = OH	17.22 ± 0.38	Bae et al., 2012
Análogos aza-resveratrol			
	R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = H R ₃ = OpTs (pTs = <i>p</i> -toluenosulfonilo) R ₄ = OH	200.77 ± 2.75	Bae et al., 2013
			
Derivados de azo-resveratrol	R ₁ , R ₂ , R ₅ = H R ₃ = OpTs R ₄ , R ₆ = OH	17.85 ± 0.17	

	$R_1, R_2 = H$	49.58 ± 9.95	Vontzalidou et
	$R_3 = F$		al., 2012
Dihidroestilbenos	$R_1, R_2 = H$	8.44 ± 0.88	
	$R_3 = OH$		

1.5.1.1.2. Derivados del ácido cinámico

El ácido cinámico es un compuesto que existe en la naturaleza y tiene baja toxicidad. Es un inhibidor moderado de la enzima y su estructura da lugar a derivados más potentes (Tabla 5.3).

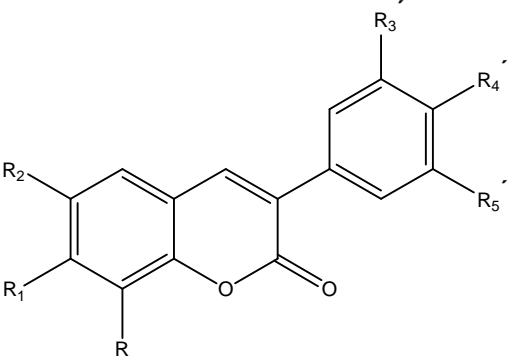
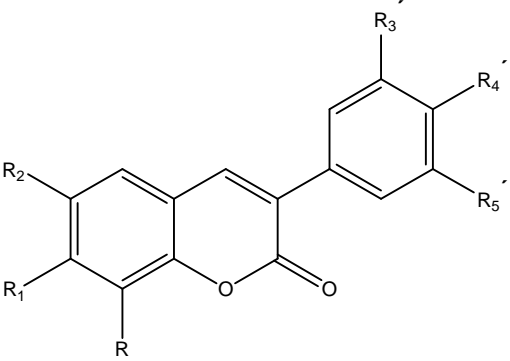
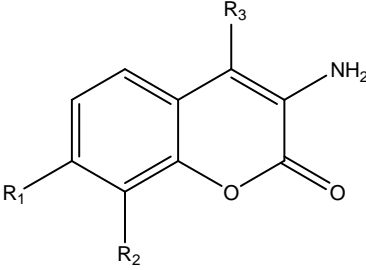
Tabla 5.3. Derivados del ácido cinámico.

Estructura química	R	IC ₅₀ (μM)	Referencia
	R ₁ , R ₂ = H	2.1 x 10 ³	Shi et al., 2005
	R ₁ , R ₂ = H R ₃ = OBU (Bu = butilo)	1.8	Fan et al., 2012
	R ₁ , R ₂ = OH R ₃ = NHOH	4.9	Kwak et al., 2013b
	R ₁ , R ₂ = OH R ₃ = Et (Et = etilo)	0.185	Fan et al., 2012

Derivados de cumarinas

Las cumarinas son una familia de compuestos que presentan diferentes actividades farmacológicas, químicamente son lactonas del ácido cinámico. Por una parte, se han sintetizado híbridos de cumarina y resveratrol (Jones et al., 2002; Fais et al., 2009) y, por otra parte, se ha incorporado a la estructura de la cumarina un fragmento de tirosina (Matos et al., 2012) (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Derivados de cumarinas.

Estructura Química	R	IC ₅₀ (μM)	Referencia
	R, R ₂ , R ₄ ' = H R ₁ , R ₃ ', R ₅ ' = OH	3.68 X 10 ³	Fais et al., 2009
	R, R ₂ , R ₃ ', R ₄ ', R ₅ ' = H R ₁ = OH	>0.1 X 10 ³	Jones et al., 2002
	R ₁ , R ₂ , R ₃ = H R ₁ = OH R ₂ , R ₃ = H	>5.0 X 10 ³ 0.05 X 10 ³	Matos et al., 2012

1.5.1.1.3. Derivados polifenólicos

Este grupo de inhibidores representa un gran conjunto de compuestos que contienen uno o más grupos funcionales fenólicos. Muchos son derivados de productos naturales de plantas como la chalcona o el *trans*-estilbeno. En general, están constituidas por dos subunidades, un resorcinol 4-sustituido o un catecol unido por un enlace éster o amida con el otro grupo. Normalmente, este tipo de derivados son inhibidores competitivos (Tabla 5.5).

Benzilbenzoatos

Se han sintetizado una serie de ésteres basados en la estructura de la floretina (Fang et al., 2011). Estos compuestos muestran valores bajos de IC₅₀ (Tabla 5.5).

N-benzylbenzamidias

Estos compuestos tienen semejanzas estructurales con tres tipos de compuestos que se dan en la naturaleza y son inhibidores conocidos de tirosinasa: estilbenos (tienen dos anillos aromáticos), chalconas (tienen una separación de tres átomos de carbono) y *N*-(*p*-cumaroil) serotonina (conectados a través de un enlace amida). Estos compuestos son inhibidores potentes, siendo uno muy importante el que lleva la estructura del resorcinol en ambos anillos, IC₅₀ de 2.2 μM (Roh et al., 2004; Cho et al., 2006).

Tabla 5.5. Derivados polifenólicos.

Estructura química	R	IC ₅₀ (μM)	Referencia
	$R_1 = 3,5\text{-OH}$ $R_2 = 2',4'\text{-OH}$	4.95	Fang et al., 2011
	$R_1 = 3,5\text{-OH}$ $R_2 = 2',4'\text{-OH}$	2.2	Cho et al., 2006
	$R = \text{Glu}$ (phlorizin)	110.0	Fang et al., 2011

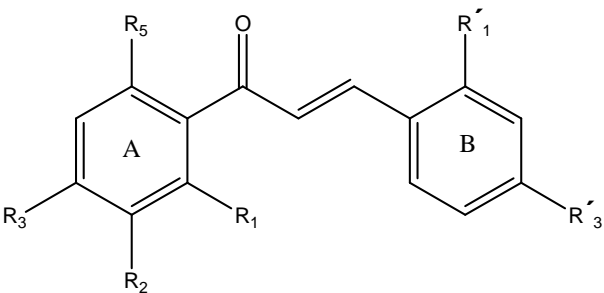
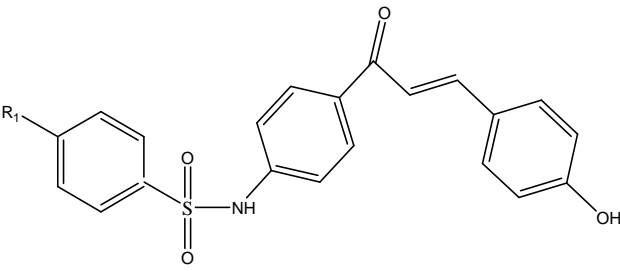
1.5.1.1.4. Chalconas

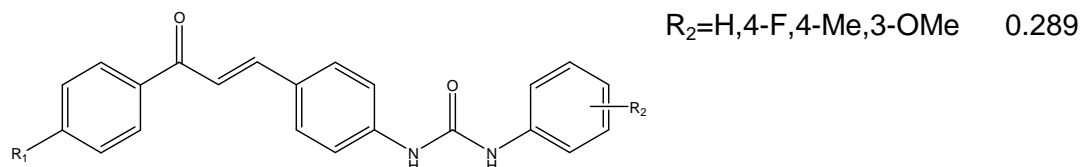
La actividad de tirsosinasa puede disminuir por la acción directa de un inhibidor sobre la enzima y también mediante la acción indirecta, a través de la inhibición de las enzimas de la glicosilación. Esto reduce el procesado de la enzima y disminuye su actividad, puesto que la enzima no puede alcanzar su madurez, y, por lo tanto, permanece inactiva. Las sulfonilamino chalconas son inhibidores potentes de la alfa-

glicosidasa con una IC_{50} del orden de nanomolar. Además, este compuesto controla las actividades glicosidasa y tirosinasa. Por otra parte, el derivado sulfonílico es un buen agente despigmentante, porque además de inhibir a tirosinasa inhibe a TRP1 y TRP2.

La actividad de las 4-(fenilurenil) chalconas, sobre la actividad difenolasa de la enzima de banana, han demostrado un potente efecto inhibitor (Sonmez et al., 2011) (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Chalconas.

Estructura química	R	IC_{50} (μM)	Referencia
	$R_2 = H$ $R_1, R_3, R_5, R'1,$ $R'3 = OH$	1.0	Liu et al., 2013
	$R_1, R_2, R'3 = H;$ $R_3 = OMe$ (Me = metilo)	141.8	
	$R_1 = Me$ (TSAHC=(4'-(p-toluensulfonilamino)-4-hidroxicalcona))	23.3	Seo et al., 2010
	$R_1 = H, Me, Cl, OMe$	Desde 0.133 a	Sonmez et al., 2011



1.5.1.1.5. Derivados del bifenílo

Del estudio de estos compuestos, como inhibidores de tirosinasa, se desprende que la presencia de un grupo hidroxilo en C-4 del anillo B contribuye a mejorar su potencia como inhibidor. El compuesto de la serie II con $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{COOH}$; $R_4 = \text{H}$, que se comporta como un inhibidor competitivo, mostró la mayor potencia inhibidora, (Bao et al., 2010) (Tabla 5.7).

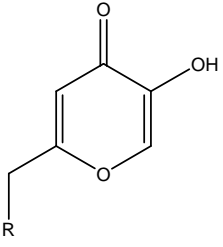
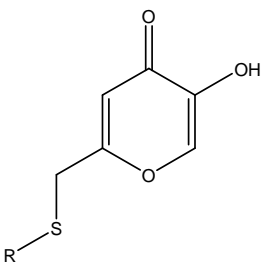
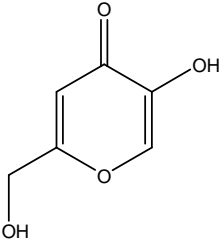
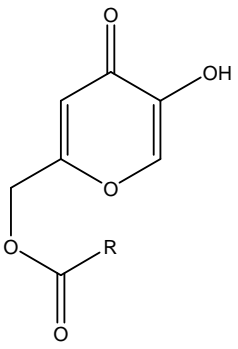
Tabla 5.7. Derivados del bifenílo.

Estructura química	R	IC_{50} (μM)	Referencia
	Serie II- $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OGlc}$ $R_3 = \text{OH}$ $R_4 = \text{H}$	0.14×10^3	Bao et al., 2010
Serie I X = Me Serie II X = H	Serie II- $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{COOH}$ $R_4 = \text{H}$	0.02×10^3	

1.5.1.1.6. Derivados del ácido kójico

Dentro de los inhibidores clásicos de tirosinasa se encuentra el ácido kójico, 5-hidroxi-2(hidroximetil)-4H-piran-4-ona, el cual ha sido ampliamente estudiado, mostrando un efecto de inhibidor competitivo sobre la actividad monofenolasa y una inhibición tipo mezcla respecto a la actividad difenolasa. El ácido kójico actúa como un buen quelante de los metales de transición, Cu^{2+} y Fe^{3+} , y un atrapador de radicales libres. La estructura del ácido kójico se ha modificado mediante su unión a aminoácidos (Noh et al., 2009). También se han desarrollado derivados con azufre y un complejo con trolox (Ahn et al., 2011). A partir de ácido kójico se han diseñado otros inhibidores con modificaciones en el grupo hidroxilo en C-2, entre los que se encuentran derivados que contienen funciones tioéter y éster, los cuales tienen mayor actividad inhibidora (Choi et al., 2014) (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Ácido kójico y derivados.

Estructura química	R	IC ₅₀ (μM)	Referencia
	R=OH	87.38	Noh et al., 2009
			Choi et al., 2014
	2a , R = hexilo	0.87	
	2b , R = ciclohexilo	0.25	
	2c , R = adamantilo	1.39	
	2d , R = fenilo	1.59	
	2e , R = 2-naftilo	1.10	
			
1 Ácido kójico			
			
	3a , R = hexilo	2.55	
	3b , R = ciclohexilo	2.74	
	3c , R = adamantilo	3.26	
	3d , R = fenilo	5.90	
	3e , R = 2-naftilo	21.01	

Se han llevado a cabo estudios de derivados del ácido kójico usando asociación computacional (docking) y dinámica de simulación. Los resultados sobre las energías de enlace se corresponden con las constantes de inhibición obtenidas experimentalmente (Lima et al., 2014).

1.5.1.2. Diseño de inhibidores sintéticos

1.5.1.2.1. Derivados de feniltioureas

El inhibidor clásico de este grupo es la feniltiourea (PTU). Este compuesto inhibe a tirosinasa, mediante la interacción del azufre con los átomos de cobre del centro activo, con un valor de $IC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$, y cuando el grupo amino y el azufre de la PTU se reemplazaron por *N*-hidroxilamina y oxígeno, respectivamente, el compuesto resultante fue seis veces más potente ($IC_{50} = 0.29 \mu\text{M}$). Estos estudios ponen de manifiesto que el grupo NHOH es importante para mostrar la inhibición en la actividad de tirosinasa, sugiriendo que la actividad quelante de la *N*-hidroxiurea debe tener un papel clave para la potente inhibición de la enzima. Los derivados *N*-tiólicos de la hidroxitiourea no muestran efecto inhibidor hacia tirosinasa (Criton y Le Mellay-Hamon, 2008).

Una serie de derivados de la feniltiourea se han evaluado como inhibidores de la melanogénesis en células de melanoma B16, y puede concluirse que el tamaño o la lipofobicidad de los sustituyentes en posición *para* del anillo bencénico del PTU afectan poco a la inhibición. Cuando los sustituyentes se encuentran en posición *meta*, el efecto es similar a los de posición *para*. La sustitución en posición *orto* es más efectiva en relación a la inhibición de la melanogénesis. Se ha demostrado que la conexión del plano del fenilo es crítica para mostrar inhibición (Thanigaimalai et al., 2010)

Se han sintetizado una serie de compuestos derivados de urea y tiourea conteniendo sacarina (1,2 benzisotiazole-3-one-1,1 dióxido). Todos estos compuestos se comportaron como inhibidores de la tirosinasa del plátano con valores de K_i en el rango de 3.95 a 40.18 μM . El comportamiento cinético de estos inhibidores es de tipo competitivo (Gençer et al., 2012), (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Derivados de la feniltiourea.

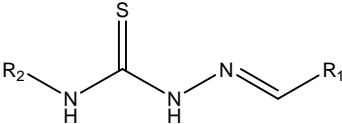
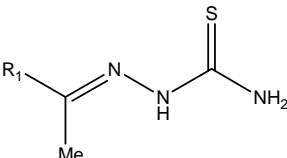

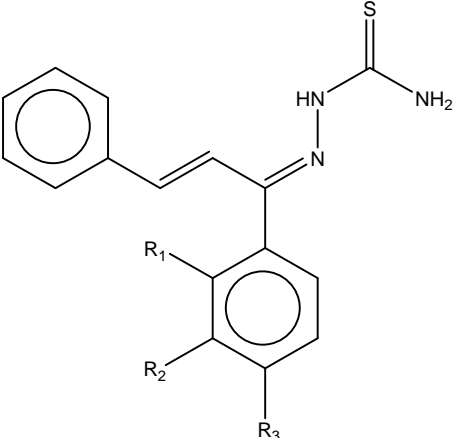
Estructura química	R	IC ₅₀ (μM)	Referencia
	X = S R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₄ = H (PTU)	1.8	Criton y Le Mellay-Hamon, 2008
	X=O R ₂ , R ₃ , R ₄ = H R ₁ = OH	0.29	Thanigaimalai et al., 2010
	n=0 R=3-Me	0.6	Gençer et al., 2012

1.5.1.2.2. Derivados de tipo tiosemicarbazonas

Se diseñaron derivados de semicarbazonas, con objeto de optimizar su carácter inhibitor, consiguiendo inhibidores más potentes que el ácido kójico (Yi et al., 2011). El efecto de anillos heterocíclicos, tal como 2-piridil, 2-pirrolinil o furanil en lugar del grupo fenilo, revela la importancia de evitar la presencia de sustituyentes cargados en el grupo fenilo, puesto que la protonación del núcleo piridina a pH= 7 da lugar a una pérdida de actividad. Otro factor crítico para la actividad inhibitora es el tamaño del anillo aromático, cuando los sustituyentes son grandes decrece la actividad inhibitora. Estos autores han diseñado compuestos que llevan el ácido kójico unido a una tiosemicarbazona, aumentando el poder inhibitor nueve veces respecto del ácido kójico.

Se han sintetizado dos clases de derivados: 4-dimetilaminobenzaldehido-tiosemicarbazona (DABT) y 4-dimetilaminobenzaldehido-*N*-fenil-tiosemicarbazona (DABPT), y se estudió la acción sobre las dos actividades de tirosinasa (Yang et al., 2013). Estos inhibidores son más potentes que el ácido kójico. Otras tiosemicarbazonas sustituidas, con sustituyentes alquilo, muestran un potente efecto inhibitorio sobre la actividad difenolasa. Estudios de estructura /función indican que el aumento de la longitud de los sustituyentes disminuye el efecto inhibitorio debido a su impedimento estérico (Liu et al., 2009), (Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Derivados de tipo tiosemicarbazonas.

Estructura química	R	IC ₅₀ (μM)	Referencia
	R ₁ =17a (KA) R ₂ =H KA = ácido kójico	11.0	Yi et al., 2011
	R ₁ =Me	0.086 (act. difenolasa)	
	R ₁ =cumarina	3.44 (act. difenolasa)	Liu et al., 2012
	R ₁ = H,OH R ₂ = H,Br,OH,Cl R ₃ = H,OH,OMe,F	Desde 0.274 a 148.41	Liu et al., 2013

1.5.1.2.3. Derivados pirazólicos

Se han sintetizado distintos compuestos derivados del 3,5-diarilpirazol que se comportan como inhibidores potentes de las actividades de tirosinasa. Todos se han caracterizado como inhibidores competitivos y se pueden deducir los aspectos relacionados con la estructura/función. En primer lugar, la presencia de grupos metoxilo, donadores de electrones, en las posiciones 2 y 4 son importantes para la inhibición y, en segundo lugar, se pone de manifiesto que la sustitución de metoxilos por halógenos multiplica por diez los valores de IC_{50} (Tepper et al., 2002; Bandgar et al., 2010) (Tabla 5.11).

Tabla 5.11. Derivados pirazólicos.

Estructura química	R	IC_{50} (μ M)	Referencia
	R=2'-Cl	22.8 (act. monofenolasa) 29.4 (act. difenolasa)	Bandgar et al., 2010
	R=2',4'-OMe	1.75 (act. monofenolasa) 2.84 (act. difenolasa)	

1.5.1.2.4. Tiadiazoles, triazoles y oxadiazoles.

Las estructuras básicas se muestran en la Figura 5.2. Tiadiazol (1,5), triazol (2) y oxadiazol (3,4). La información para el diseño de estos inhibidores tiene su origen en los estudios de la estructura cristalográfica del sitio activo de la enzima y su interacción con feniltiourea (Klabunde et al., 1998). Para estos compuestos las constantes de inhibición están en el rango de μ M (Ghani y Ullah, 2010; Lam et al., 2010).

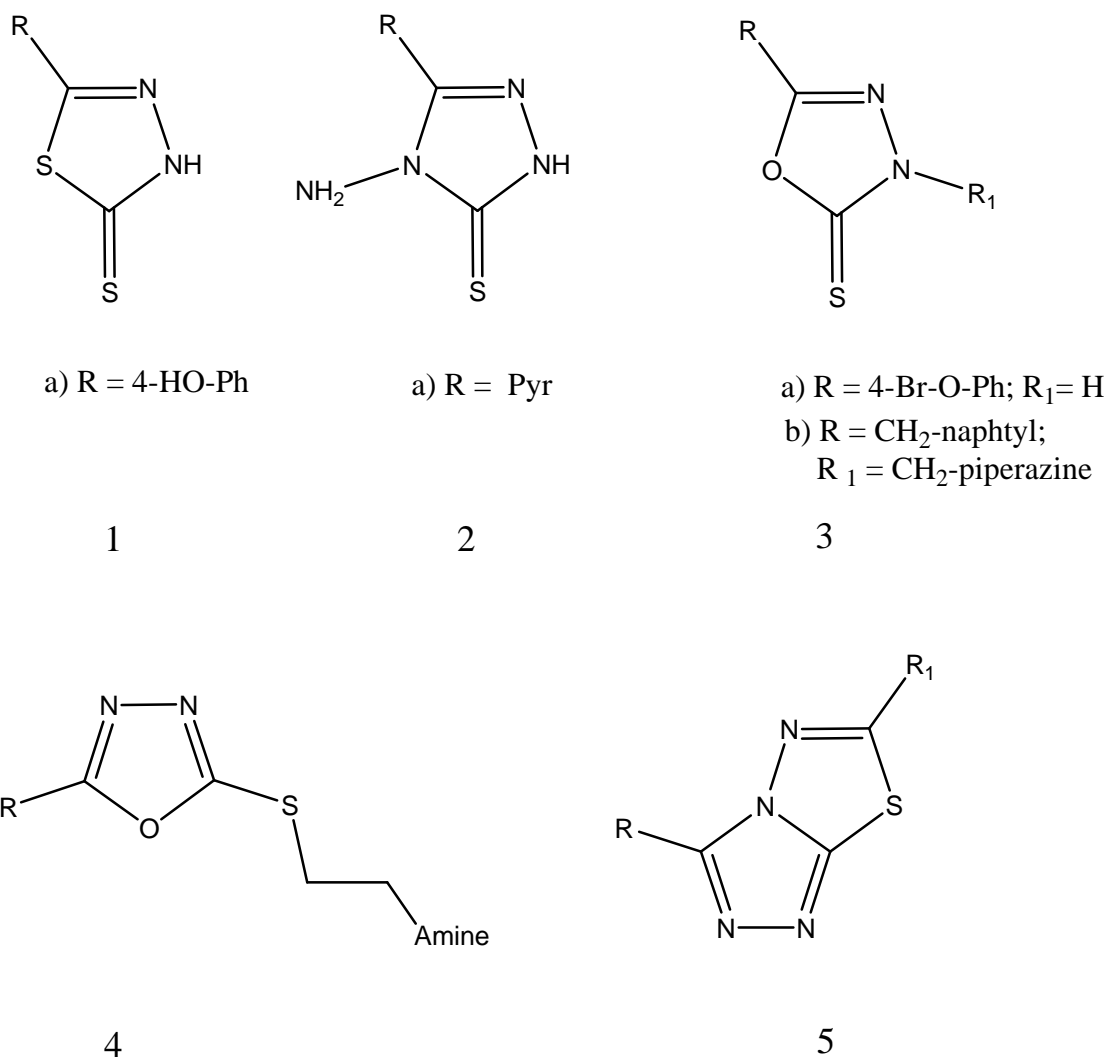


Figura 5.2. Estructuras químicas de tiadiazoles (1 y 5), triazoles (2) y oxadiazoles (3 y 4) (Mendes et al., 2014).

1.5.1.2.5. Captopril

Captopril, ([2S]-N-[3-mercapto-2metilpropionil]-L-prolina), (Figura 5.3), es un compuesto utilizado contra la hipertensión y puede influir en la biosíntesis de melaninas. Captopril interacciona en el centro activo de tirosinasa con los átomos de cobre. Se ha descrito a este compuesto como un inhibidor tiempo-dependiente (Espín y Wichers, 2001). Además, se ha descrito una disminución de los niveles de ARNm que codifica a tirosinasa (Chu et al., 2012). Los estudios cinéticos muestran una inhibición competitiva por captopril con un valor de K_i de 294 μM (Kuo y Ho, 2013).

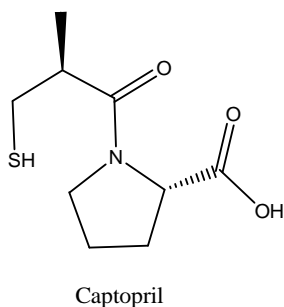


Figura 5.3. Estructura química del captopril como ejemplo de inhibidor irreversible de tirosinasa de *Agaricus bisporus*.

1.5.1.2.6. Péptidos con actividad inhibidora de tirosinasa.

Actualmente se están utilizando oligopéptidos como candidatos para el tratamiento de ciertos desórdenes de la piel (Abu Ubeid et al., 2009). Dos oligopéptidos, un octapéptido (Arg-Ala-Asp-ser-Arg-Ala-Asp-Cys) y un decapeptido (Tyr-Arg-ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr) muestran inhibición sobre la tirosinasa del champiñón y la tirosinasa humana con valores de IC_{50} de 123 y 40 μ M, respectivamente. Además estos oligopéptidos no muestran ningún efecto citotóxico (Abu Ubeid et al., 2009).

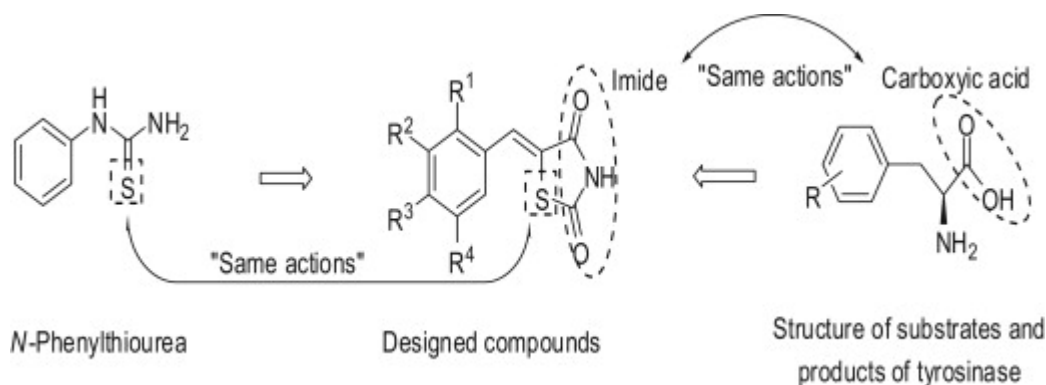
1.5.2. Aplicaciones terapéuticas

La pigmentación de la piel tiene interés desde el punto de vista terapéutico y cosmético. La principal aplicación terapéutica de los inhibidores de tirosinasa es en el tratamiento de desórdenes de hiperpigmentación tales como melasma, manchas por la edad e hiperpigmentación post-inflamatoria. Estos desórdenes son difíciles de tratar sin causar despigmentaciones o irritación. Hasta el presente los agentes hipopigmentantes más efectivos son los inhibidores de tirosinasa. Las formulaciones empleadas incluyen en su composición uno o más inhibidores de la enzima. Aunque se han descrito cientos de inhibidores, solamente unos pocos se usan actualmente. Los más utilizados son: ácido azelaico, ácido kójico y algunos compuestos de origen vegetal. Actualmente, el empleo de hidroquinona como despigmentante está siendo reconsiderado y, como se demuestra en esta Memoria, es un sustrato de la enzima (Gillbro y Olsson, 2011; Chandra et al., 2012; Kolbe et al., 2013; García-Molina et al., 2014a; 2014b).

1.5.3. Diseño de inhibidores de tirosinasa

Como ya hemos indicado anteriormente, tirosinasa es la enzima clave en la regulación de la melanogénesis por lo que su inhibición ha atraído mucha atención desde el punto de vista médico y cosmético, sobre todo en relación al tratamiento de la hiperpigmentación (Kubo et al., 2000). Hasta la fecha se han identificado numerosos tipos de inhibidores de tirosinasa (ya sean naturales o sintéticos) (Kim y Uyama, 2005), pero sólo unos pocos han mostrado eficacia en la reducción de la biosíntesis de melaninas (Briganti et al., 2003). Por tanto, el descubrimiento de nuevos inhibidores mucho más potentes que los actuales es importante para las industrias farmacéutica y cosmética.

Actualmente, con la ayuda de métodos de simulación por ordenador, se estudia la relación estructura/actividad de numerosos compuestos y se ensayan experimentalmente los más prometedores (Xue et al., 2008; Casañola-Martín et al., 2008; 2010; Marrero-Ponce et al., 2010; Buitrago et al., 2014; Bukhari et al., 2014). Además, recientemente se están diseñando compuestos sintéticos con estructura química similar a la de derivados bifenilos (Bao et al., 2010), a derivados de las vanillinas (Rescigno et al., 2011b) y a derivados del ácido benzoico (Ha et al., 2012a; 2012b) (Esquema 5.1). Durante la síntesis de nuevos inhibidores de tirosinasa se han llevado a cabo estudios comparativos entre los distintos métodos de simulación por ordenador (Le-Thi-Thu et al., 2014).



Esquema 5.1. Diseño de inhibidores de tirosinasa basados en el ácido benzoico (Ha et al., 2012a; 2012b).

Muchos inhibidores de tirosinasa tienen efectos adversos (Penney et al., 1984; deCaprio, 1999; Taïeb et al., 2011; Stratford et al., 2012), por este motivo continúa la investigación de estas moléculas intentando evitar dichos efectos adversos (Abu Ubeid

et al., 2009; Rendon y Horwitz, 2012; Ubeid y Hantash, 2014; Wu, 2014; Le-Thi-Thu et al., 2014; Orhan y Khan, 2014; Casanola-Martín et al., 2014; Xu et al., 2014).

Se han llevado a cabo las cristalizaciones de distintas tirosinasas: en primer lugar, la de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006) y posteriormente se publicó la de *Bacillus megaterium* (Sendovski et al., 2011). Recientemente se dilucidó la estructura de la enzima de hongo *Agaricus bisporus*, que es la enzima tipo en los estudios experimentales de tirosinasa (Ismaya et al., 2011a; 2011b; Mauracher et al., 2014a; Ai et al., 2014). Por último, también se ha publicado la estructura de la enzima de hoja de nogal *Juglans regia* (Zekiri et al., 2014). Estos estudios posibilitan la profundización en la caracterización de inhibidores, utilizando docking molecular y el diseño computacional de fármacos (Hsiao et al., 2014). Estas técnicas, por ejemplo, se han utilizado para identificar productos naturales como inhibidores potentes de tirosinasa. Recientemente, Hsiao y colaboradores han investigado 47263 compuestos naturales mediante la metodología anteriormente descrita, encontrando que dos de los inhibidores más potentes tienen estructuras similares a la del dipéptido (WY), (triptófano-tirosina) y al tripéptido (KFY), (lisina-fenilalanina-tirosina). Estas dos moléculas ponen de manifiesto que la tirosina C-terminal juega un papel importante en la inhibición de tirosinasa. Los tripéptidos RCY (arginina-cisteína-tirosina) y CRY (cisteína-arginina-tirosina) muestran una gran potencia como inhibidores; en estas estructuras se pone de manifiesto la potencia de cisteína en el extremo N-terminal. El grupo tiol de estos tripéptidos interacciona con los cobres del centro activo. La potencia inhibidora de CRY es evidente si se considera el valor de $IC_{50} = 6.16 \mu\text{M}$ frente a tirosinasa de champiñón, de forma comparativa este tripéptido es más potente que los oligopéptidos descritos en la bibliografía (Mendes et al., 2014) y comparable a los conjugados de ácido kójico-tripéptidos (Kim et al., 2004; Noh et al., 2007) y otros derivados del ácido kójico (Choi et al., 2014).

Entre las distintas moléculas estudiadas destaca el inhibidor A5 (N-[3-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-1-benzopirano-3-il)-1-oxopropil]-L-tirosina) y el B16 (L-lisina-L-fenilalanina-L-tirosina) cuyas estructuras se muestran en el Figura 5.4.

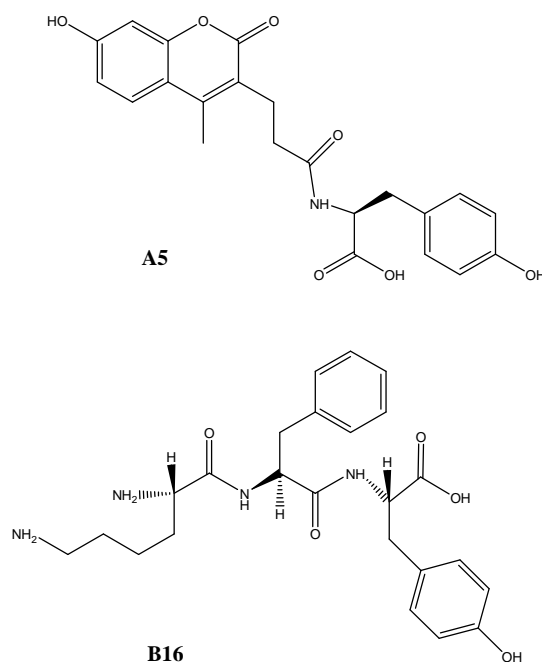


Figura 5.4. Estructuras químicas de los inhibidores A5 (N-[3-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-1-benzopirano-3-il)-1-oxopropil]-L-tirosina) y el B16 (L-lisina-L-fenilalanina-L-tirosina) (Hsiao et al., 2014).

En la Figura 5.5 se muestra la interacción del inhibidor cloroforina (Compuesto 1) y β -arbutina con tirosinasa de champiñón. En la Figura 5.6 se puede observar la interacción de dos tripéptidos RCY y CRY con esta enzima. Los resultados descritos con los tripéptidos del tipo CRY se espera que sean la base del diseño de otros inhibidores de tirosinasa.

Este diseño experimental se ha ampliado a tetrapéptidos (Lee et al., 2015) y a otros inhibidores potentes de tirosinasa (Bagherzadeh et al., 2015; Chen et al., 2015).

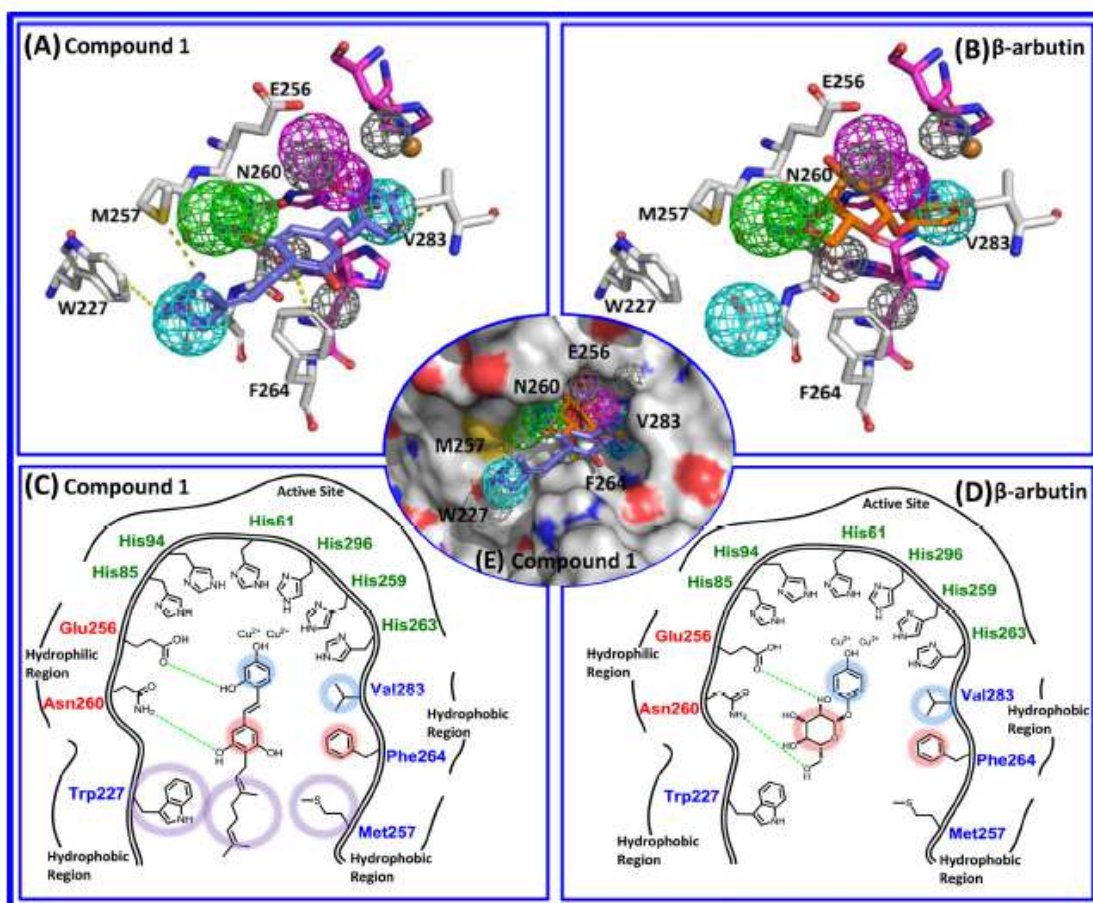


Figura 5.5. Ilustraciones bi- y tridimensionales de las interacciones estructurales de tirosinasa de champiñón y el compuesto 1 y β -arbutina. (A) Docking del compuesto 1 en el sitio activo de tirosinasa de champiñón. (B) Docking de β -arbutina en el sitio activo. (C) Representación bidimensional de la interacción entre el compuesto 1 y los residuos del sitio activo de la enzima. (D) Representación bidimensional de la interacción entre β -arbutina y los residuos del sitio activo de la enzima. (En los esquemas bidimensionales, las líneas discontinuas en verde indican las interacciones mediante enlaces de puente de hidrógeno, los círculos en diferentes colores representan la hidrofobicidad relativa y/o las interacciones π - π entre los compuestos y los residuos del sitio activo. En los esquemas tridimensionales, el compuesto 1 y β -arbutina se muestran mapeados sobre un modelo computacional de farmacóforo representado por un conjunto de esferas) (Hsiao et al., 2014).

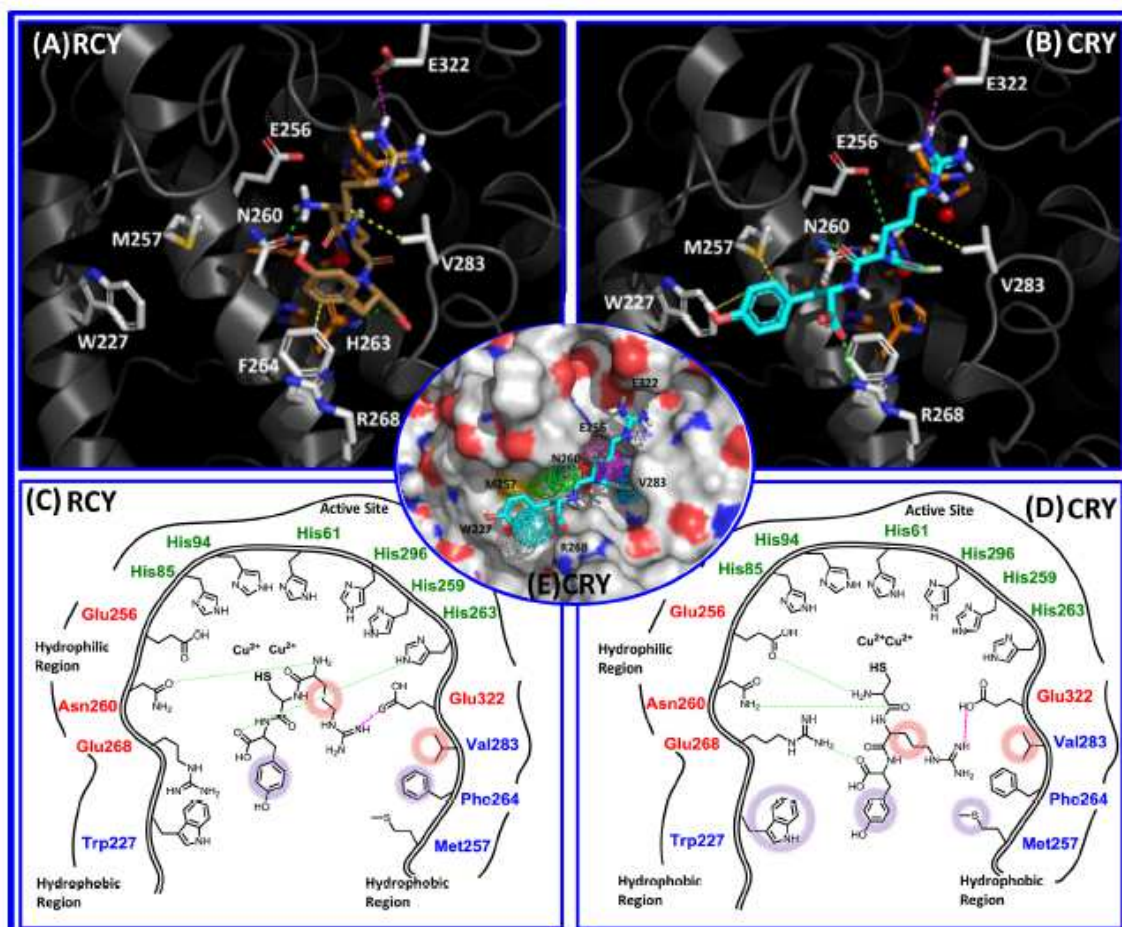


Figura 5.6. Ilustraciones bi- y tridimensionales de las interacciones estructurales entre tirosinasa de champiñón y los tripéptidos RCY y CRY. (A) Docking del compuesto RCY en el sitio activo de tirosinasa de champiñón. (B) Docking del compuesto CRY en el sitio activo de la enzima. (C) Representación bidimensional de las interacciones entre el tripéptido RCY y los residuos del sitio activo de tirosinasa de champiñón. (D) Representación bidimensional del conjunto de las interacciones entre el tripéptido CRY y los residuos del sitio activo de la enzima. (En los esquemas bidimensionales, las líneas discontinuas en verde indican las interacciones mediante enlaces de puente de hidrógeno, los círculos en diferentes colores representan la hidrofobicidad relativa y/o las interacciones π - π entre los compuestos y los residuos del sitio activo) (Hsiao et al., 2014).

1.5.4. Aplicaciones de los inhibidores

La inhibición de tirosinasa puede ser aplicada en varios campos entre los que destacan la agricultura e industria alimentaria, la industria cosmética y en la medicina.

Agricultura e industria alimentaria: El pardeamiento de frutas y hortalizas es un problema de gran interés ya que produce unas pérdidas económicas muy elevadas anualmente. La velocidad del pardeamiento enzimático depende de la concentración de tirosinasa y compuestos fenólicos, de la disponibilidad de oxígeno, del pH y de las condiciones de temperatura del tejido (Martínez y Whitaker, 1995). Las técnicas convencionales actuales para disminuir el pardeamiento incluyen el uso del autoclave y el blanqueado, pero estos procesos causan pérdidas importantes de peso y nutrientes en el producto (Konanayakam y Sastry, 1988). Otro método utilizado es el uso de microondas, pero tiene el inconveniente de que se forma un gradiente de temperatura en el producto (Decareau, 1985) lo que causa que en las regiones más calientes se produzca una inactivación enzimática total mientras que en las regiones más frías esta inactivación sólo ocurra de manera parcial.

Otra posible técnica es el uso de reactivos químicos como son las sales de haluros, ácidos carboxílicos aromáticos (Rouet-Mayer y Philippon, 1986) y otros compuestos que actúan como reductores, como el ácido cítrico, ácido ascórbico y sus derivados (Santerre et al., 1988; Hsu et al., 1988) y compuestos tiólicos como la cisteína (Dudley y Hotchkiss, 1989). Actualmente, se suele utilizar 4-hexilresorcinol como inhibidor de tirosinasa ya que, hasta la fecha, no se han descrito efectos secundarios perjudiciales para la salud (McEvelly et al., 1991). A esto debemos añadir que este derivado de resorcinol es muy efectivo en el control del pardeamiento enzimático (Frankos et al., 1991). Sin embargo, la seguridad alimentaria requiere una búsqueda continua de nuevos reactivos químicos menos perjudiciales y más potentes.

La regulación de tirosinasa también abarca el uso de altas temperaturas, elevada acidez, eliminación de sustratos fenólicos dentro del producto o la eliminación de oxígeno en éste. La eliminación de sustratos fenólicos se realiza con absorbentes como carragenatos, ciclodextrinas o quitosanos, mientras que la eliminación del oxígeno en el producto es inaplicable experimentalmente ya que, en tejidos vivos, el riesgo de desviaciones metabólicas causadas por las condiciones anaerobias es muy alto. Una alternativa es la limitación de su disponibilidad con tecnologías post-cosecha basadas en atmósferas controladas o modificadas.

Industria cosmética: El uso de inhibidores de tirosinasa tiene un creciente interés en la industria cosmética, debido a los efectos de prevención y de

blanqueamiento de la piel que ocasionan. De todos los inhibidores de tirosinasa descritos hasta hoy, sólo unos cuantos han sido utilizados como agentes despigmentantes, debido principalmente a riesgos de toxicidad para uso humano. Entre estos agentes destacan el ácido linoléico, el hinokitiol, el ácido kójico, la arbutina o la hidroquinona, que inhiben eficazmente a tirosinasa. Sin embargo, la hidroquinona también ha mostrado efectos secundarios (Maeda y Fukuda, 1991; Parvez et al., 2007). Actualmente la arbutina y la aloesina se utilizan en cosmética. Ambos compuestos se usan conjuntamente ya que se ha comprobado que el co-tratamiento de tirosinasa con arbutina y aloesina producía una inhibición sinérgica de esta enzima (Jin et al., 1999). La aloesina actúa mediante una inhibición no-competitiva mientras que la arbutina se comporta como inhibidor competitivo.

En el campo de la medicina, también se utilizan los inhibidores de tirosinasa en ensayos clínicos. Por ejemplo, recientemente se ha investigado el efecto de 8-hidroxiidazeína como sustrato suicida de la enzima, en células de melanoma B16 y en voluntarios humanos (Tai et al., 2009). Estos estudios mostraron que este sustrato suicida es diez veces más potente que el ácido kójico, al actuar tanto sobre células de melanoma y directamente, como crema despigmentante, sobre la piel humana.

1.5.5. Activadores

Se han realizado pocos estudios acerca de la acción de activadores sobre tirosinasa. Se ha discutido mucho acerca de la acción de iones metálicos divalentes sobre la enzima como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} o Cd^{2+} (Palumbo et al., 1985; Ros et al., 1993b). Los metales: Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Ni^{2+} se han descrito como activadores (Gheibi et al., 2006; 2011).

1.5.6. Inactivación suicida

El estudio de la inactivación por sustratos suicidas, también llamados inhibidores basados en el mecanismo, ha aumentado recientemente gracias a las aplicaciones farmacológicas que pueden tener y esto ha llevado al diseño de nuevos inhibidores de tirosinasa (Silverman, 1995; Zhong y Groutas, 2004; Ghanbari et al., 2006). Por ejemplo, se han diseñado inactivadores irreversibles (insecticidas) contra acetilcolinesterasa o sustratos suicidas de β -lactamasas (ácido clavulánico) que ayudan a la acción de antibióticos (Walsh, 1984). El refinamiento de los métodos espectrofotométricos ha permitido el estudio sistemático de la cinética de inactivación suicida de la enzima por *o*-difenoles o trifenoles (García-Molina et al., 2007a).

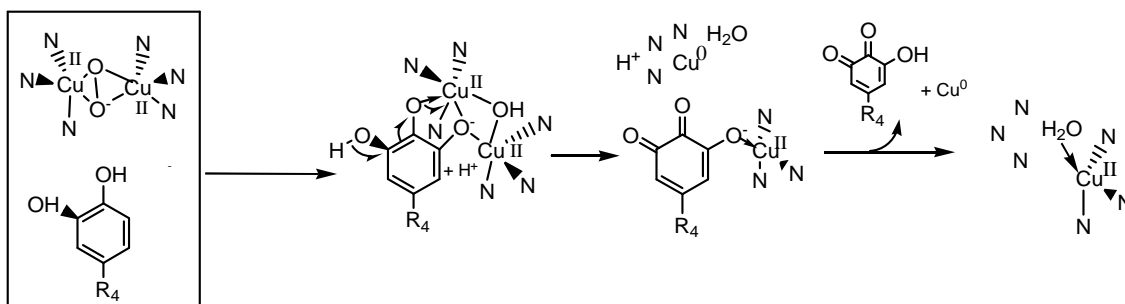
Tirosinasa sufre un proceso de inactivación cuando reacciona con sus sustratos, un fenómeno que ha sido muy estudiado y caracterizado en la enzima de una gran variedad de fuentes naturales como hongos, plantas y animales (Ingraham et al., 1952; Lerch, 1981; 1983).

Hasta la fecha de hoy, se han propuesto tres tipos de mecanismos para explicar el proceso de inactivación suicida en tirosinasa:

1. Un ataque del producto de la reacción, *o*-quinona, sobre un grupo del sitio activo (Ingraham et al., 1952).
2. Un ataque mediante radicales libres sobre el sitio activo de la enzima. Este ataque es por ROS (especies reactivas del oxígeno) que se generarían durante el ciclo catalítico de la enzima (Seiji et al., 1978).
3. La presentación y oxidación de un *o*-difenoil como si fuera un monofenol (presentación tipo cresolasa) (Land et al., 2007; 2008; Ramsden et al., 2009).

Actualmente, los dos primeros tipos de mecanismos se encuentran descartados, ya que esta inactivación también ocurre incluso en presencia de NADH o ácido ascórbico, lo que provoca que se reduzcan las *o*-quinonas a los *o*-difenoles iniciales. Además, al proteger a la enzima con eliminadores de radicales libres, la inactivación suicida también seguía ocurriendo (Dietler y Lerch, 1982).

Con respecto al tercer mecanismo, el cual implica la hidroxilación de un *o*-difenoil como si fuera un monofenol (presentación tipo cresolasa), los autores sugieren que se origina un producto intermedio de la reacción que provoca una desprotonación y una eliminación reductiva en el mecanismo de la enzima (Land et al., 2007; 2008; Ramsden et al., 2009; Ramsden y Riley 2010a; 2010b) (Esquema 5.2).



Esquema 5.2. Mecanismo propuesto para explicar la inactivación suicida de tirosinasa durante su actividad monofenolasa cuando actúa sobre o-difenoles (Land et al., 2007).

El mecanismo descrito en el Esquema 5.2 resalta la importancia de la estructura química de los sustratos en el mecanismo de inactivación suicida de tirosinasa. Según este mecanismo, cuando el sustrato es un trihidroxibenceno (por ejemplo pirogalol), la enzima no sufriría inactivación suicida al igual que ocurre en el caso de los sustratos que tuvieran sustituyentes en C3 y C6 del anillo fenólico. Por último, este mecanismo propuesto en el Esquema 5.2 tampoco explicaría la inactivación suicida ocasionada por otras moléculas no fenólicas. Así, no explica la inactivación suicida de tirosinasa cuando actúa sobre el peróxido de hidrógeno (García-Molina et al., 2005a), sobre el ácido ascórbico (Muñoz-Muñoz et al., 2009a), sobre el NADH (García-Molina et al., 2010b), sobre las tetrahydropterinas (Muñoz-Muñoz et al., 2011a) o sobre el ácido tetrahydrofólico (García-Molina et al., 2011).

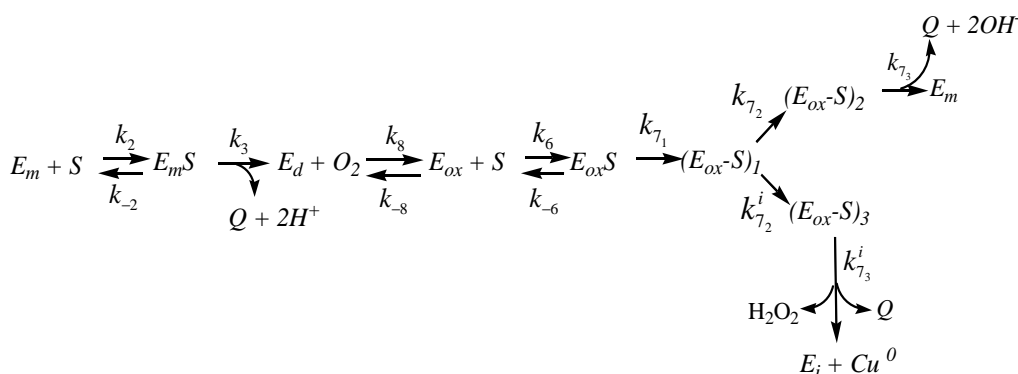
Nuestro grupo de investigación GENZ ha realizado numerosos estudios sobre el mecanismo de inactivación suicida de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (García-Cánovas et al., 1987), de epidermis de rana (Tudela et al., 1986; 1987a; 1987b; 1988), sobre la ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) sintasa (Casas et al., 1993) y sobre peroxidasa de diferentes fuentes (Arnao et al., 1990; Hiner et al., 1996). Además, se ha estudiado la inactivación suicida de una enzima que puede ser medida a través de reacciones acopladas (Teruel et al., 1986; 1987; Escribano et al., 1989) y hemos publicado un diseño experimental válido para caracterizar de forma sistemática la inactivación suicida de una enzima (García-Cánovas et al., 1989).

La cinética de inactivación suicida de tirosinasa se describe por una serie de parámetros que caracterizan al sustrato suicida: λ_{\max} (constante aparente de inactivación máxima), r (razón de partición o número de *turnovers* que realiza un mol

de enzima antes de su inactivación), K_m^S (constante de Michaelis para el sustrato) y k_{cat} (constante catalítica).

Se ha avanzado en el estudio y la comprensión del mecanismo de inactivación suicida de tirosinasa. Se han identificado potentes inactivadores suicidas de la enzima, ya que son sustratos con un bajo valor de r y un alto valor de λ_{max} . Entre estos destacan una serie de isoflavonas: 6,7,4'-trihydroxyisoflavona; 7,8,4'-trihydroxyisoflavona; 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavona y la 8-hidroxinaringenina (Chang et al., 2005; Chang, 2007; Chang et al., 2010). Estos compuestos han dado lugar a una patente como sustratos suicidas de la enzima (Chang y Wu, 2008).

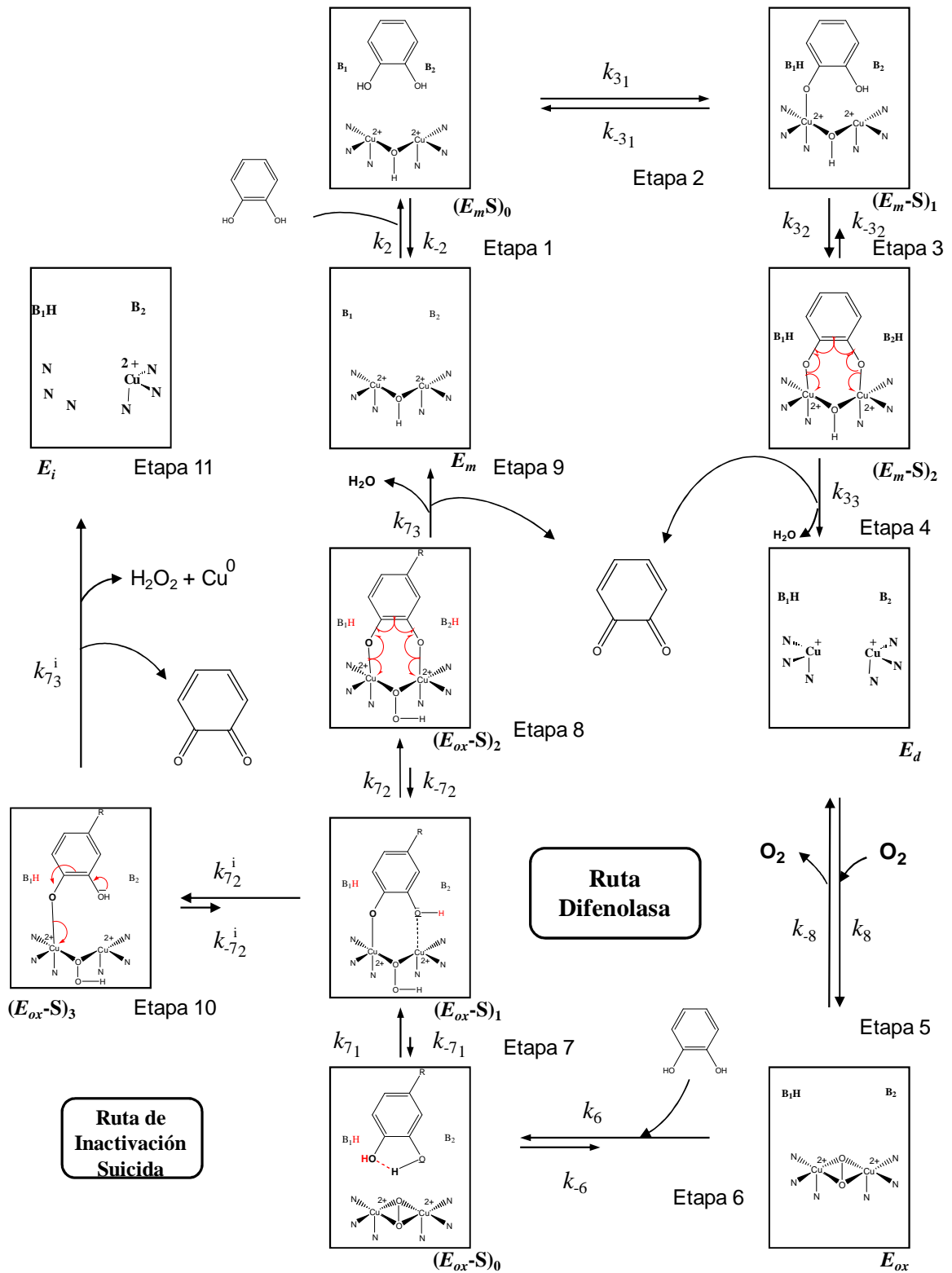
Gracias a los numerosos estudios publicados sobre cinética enzimática de tirosinasa, nuestro grupo ha publicado un mecanismo cinético y estructural que explica la inactivación suicida de tirosinasa cuando actúa sobre todos sus sustratos, ya sean fenólicos o no. También se tienen en cuenta los nuevos avances en la estructura de la enzima, en la rigidez de las uniones de las histidinas del sitio activo y la existencia de dos $pKas$ cinéticamente significativos en el mecanismo (Muñoz-Muñoz et al., 2010a; 2010c; 2012a; 2014; García-Molina et al., 2014b). El mecanismo cinético se describe en el Esquema 5.3.



Esquema 5.3. Mecanismo cinético para explicar la ruta catalítica y la de inactivación suicida de tirosinasa de *Agaricus bisporus*. E_m = metatirosinasa, E_d = desoxitirosinasa, E_{ox} = oxitirosinasa, S = sustrato, Q = o-quinona (Muñoz-Muñoz et al., 2012a).

El mecanismo estructural se describe en el Esquema 5.4 cuando se trata de o-difenoles (Muñoz-Muñoz et al., 2012a). El mecanismo comienza con la bifurcación entre la ruta catalítica y la ruta de inactivación suicida a partir del complejo enzima-sustrato ($E_{ox} - S$)₁, que es el complejo donde el sustrato se encuentra unido a un átomo de cobre del sitio activo de la enzima (Cu_A) (Goldfeder et al., 2014). A continuación, se pueden producir dos posibilidades: (i) que el segundo protón del sustrato se transfiera a la base B₂ produciéndose la ruta difenolasa de la enzima (Etapas 8 y 9 del Esquema 5.4) o (ii) que este protón sea transferido de nuevo al grupo peróxido y se produzca la inactivación suicida (Etapas 10 y 11). Como se observa en el Esquema 5.4, la inactivación suicida provoca que se libere Cu⁰ del sitio activo de la enzima y se genere H₂O₂. El estudio del efecto isotópico en el proceso de inactivación suicida ha puesto de manifiesto que existe una etapa lenta, que podría corresponder a la transferencia del protón por parte del sustrato al peróxido de la forma oxirosinasa (Muñoz-Muñoz et al., 2013a; 2013b).

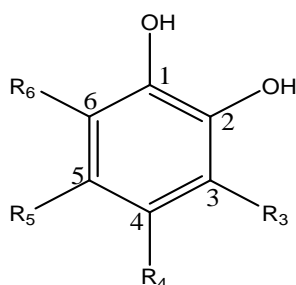
En la actuación de la enzima sobre monofenoles, no ocurre la transferencia del protón al puente peróxido en la forma oxirosinasa y, por lo tanto, los monofenoles no inactivan a la enzima (Muñoz-Muñoz et al., 2011b; 2014).



Esquema 5.4. Mecanismo estructural propuesto para explicar la inactivación suicida de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Muñoz-Muñoz et al., 2012a).

Un estudio sistemático de la inactivación suicida de los distintos sustratos (Tabla 5.12) de tirosinasa de champiñón se ha llevado a cabo, caracterizando cinéticamente estos compuestos (Muñoz-Muñoz et al., 2008b). En la Tabla 5.12 se muestran las estructuras de los sustratos fenólicos estudiados y en la Tabla 5.13 sus constantes cinéticas.

Tabla 5.12. Estructuras de los o-difenoles (Muñoz-Muñoz et al., 2008b; 2012a).



o-Difenol	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Pirogalol	H	H	H	OH
Catecol	H	H	H	H
4-Clorocatecol	H	-Cl	H	H
4-Metilcatecol	H	-CH ₃	H	H
4-Etilcatecol	H	-CH ₂ -CH ₃	H	H
4- <i>terc</i> -Butil-catecol	H	-C-(CH ₃) ₃	H	H
DHPPA	H	-(CH ₂) ₂ -COOH	H	H
DHPAA	H	-CH ₂ -COOH	H	H
Ácido gálico metil ester	H	-COOCH ₃	H	OH
Ácido gálico	H	-COOH	H	OH
Ácido protocatéquico	H	-COOH	H	H
Aldehído protocatéquico	H	-CHO	H	H
4-Nitrocatecol	H	-NO ₂	H	H
3,6-Difluorocatecol	F	H	H	F

DHPPA: ácido 3,4 dihidroxifenilpropiónico

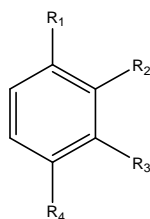
DHPAA: ácido 3,4 dihidroxifenilacético

Tabla 5.13. Constantes cinéticas que caracterizan la inactivación suicida de tirosinasa de champiñón en su acción sobre diferentes sustratos (Muñoz-Muñoz et al., 2008b; *2012a).

o-Difenol	$\lambda_{\max} \times 10^3$ (s ⁻¹)	r	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m^S (mM)	$\lambda_{\max} / K_m^S \times 10^3$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} / K_m^S (mM ⁻¹ s ⁻¹)	$K_m^{O_2}$ (mM)
Pirogalol	12.01 ± 0.31	122093 ± 2740	1280 ± 47	1.96 ± 0.03	6 ± 0.16	653 ± 26	55.6 ± 2.8
Catecol	8.92 ± 0.27	99994 ± 1604	874 ± 30	0.16 ± 0.01	71 ± 1.68	7316 ± 384	38.0 ± 2.6
4-Clorocatecol	8.54 ± 0.25	99356 ± 1788	859 ± 28	0.60 ± 0.03	13 ± 0.41	1431 ± 85	37.3 ± 1.6
4-Metilcatecol	8.21 ± 0.25	98366 ± 1377	842 ± 26	0.10 ± 0.01	78 ± 2.50	5613 ± 881	36.6 ± 2.7
4-Etilcatecol	7.95 ± 0.23	97562 ± 1951	802 ± 26	0.17 ± 0.01	42 ± 1.35	4717 ± 316	34.8 ± 2.6
4- <i>terc</i> -Butil-catecol	7.28 ± 0.28	88788 ± 1864	640 ± 28	1.45 ± 0.12	5 ± 0.19	441 ± 41	27.8 ± 2.5
DHPPA	6.93 ± 0.27	87646 ± 1315	635 ± 25	0.70 ± 0.09	1 ± 0.38	123 ± 12	27.6 ± 2.1
DHPAA	6.67 ± 0.37	64838 ± 1187	433 ± 26	1.30 ± 0.10	4 ± 0.28	296 ± 32	18.8 ± 1.3
Galato de metilo	1.70 ± 0.09	47444 ± 501	80 ± 4	0.12 ± 0.01	13 ± 0.75	358 ± 60	3.4 ± 0.1
Ácido gálico	1.57 ± 0.07	18666 ± 466	28 ± 1	0.18 ± 0.01	9 ± 0.46	186 ± 14	1 ± 0.1
Ácido protocatéquico	0.85 ± 0.03	10186 ± 224	8 ± 0.3	0.07 ± 0.01	11 ± 0.42	114 ± 15	0.34 ± 0.02
Aldehído protocatéquico	0.61 ± 0.02	2554 ± 40	1.5 ± 0.05	0.15 ± 0.02	4 ± 0.13	10 ± 1	0.065 ± 0.005
4-Nitrocatecol	0.45 ± 0.02	2254 ± 41	0.9 ± 0.04	0.10 ± 0.01	4 ± 0.20	9 ± 1	0.039 ± 0.002
3,6-Difluorocatecol*	0.58 ± 0.03	198744 ± 8902	115 ± 11	1.66 ± 0.18	350 ± 39	69000 ± 8000	50.3 ± 2.6

De forma análoga, la inactivación suicida de tirosinasa se ha caracterizado en su acción sobre *o*-aminofenoles y *o*-diaminas, y se ha propuesto un esquema cinético y estructural semejante a los Esquemas 5.3 y 5.4 (Muñoz-Muñoz et al., 2012c). En la Tabla 5.14 se muestran las estructuras de los sustratos *o*-aminofenólicos y las *o*-diaminas estudiadas. Las constantes cinéticas que caracterizan la inactivación suicida de estos compuestos se muestran en la Tabla 5.15 (Muñoz-Muñoz et al., 2012c).

Table 5.14. Estructuras de los o-aminofenoles y o-diaminas considerados (Muñoz-Muñoz et al., 2012c).



Sustrato	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido 2,3-diaminobenzoico	COOH	NH ₂	NH ₂	H
Ácido 3,4-diaminobenzoico	COOH	H	NH ₂	NH ₂
3,4-Diaminotolueno	CH ₃	H	NH ₂	NH ₂
4-Fluor-1,2-fenilendiamina	NH ₂	NH ₂	H	-F
4-Cloro-1,2-fenilendiamina	NH ₂	NH ₂	H	-Cl
4-Bromo-1,2-fenilendiamina	NH ₂	NH ₂	H	-Br
4-Metoxi-1,2-fenilendiamina	NH ₂	NH ₂	H	-OCH ₃
1,2-Diaminobenceno	NH ₂	NH ₂	H	H
Ácido 2-amino-3-hidroxibenzoico	COOH	NH ₂	OH	H
Ácido 3-amino-2-hidroxibenzoico	COOH	OH	NH ₂	H
Ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico	COOH	H	NH ₂	OH
Ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico	COOH	H	OH	NH ₂
3-Amino-4-hidroxitolueno	CH ₃	H	NH ₂	OH
4-Amino-3-hidroxitolueno	CH ₃	H	OH	NH ₂
3-Amino-L-tirosina	CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH	H	NH ₂	OH

Tabla 5.15. Constantes cinéticas que caracterizan la inactivación suicida de tirosinasa de champiñón en su acción sobre α -aminofenoles y α -diaminas aromáticas (Muñoz-Muñoz et al., 2012c).

Aminofenoles y diaminas aromáticas	$\lambda_{E_{ox}(\max)} \times 10^3$ (s ⁻¹)	r	k_{cat}^S (s ⁻¹)	K_m^S (mM)
1,2-diaminobenceno	1.55 ± 0.11	360 ± 31	0.56 ± 0.06	0.51 ± 0.04
3-amino-4-hidroxitolueno	5.54 ± 0.41	5884 ± 510	32.32 ± 4.02	2.99 ± 0.31
3-hidroxi-4-aminotolueno	4.52 ± 0.37	5503 ± 502	24.71 ± 2.98	2.52 ± 0.26
3,4-diaminetolueno	1.22 ± 0.10	599 ± 51	0.71 ± 0.08	0.06 ± 0.01
Ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico	0.34 ± 0.01	1230 ± 101	0.41 ± 0.04	0.15 ± 0.01
Ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico	0.65 ± 0.04	810 ± 76	0.52 ± 0.06	0.19 ± 0.02
Ácido 3,4-diaminobenzoico	1.05 ± 0.08	32 ± 4	0.04 ± 0.01*	0.33 ± 0.04
Ácido 3-amino-2-hidroxibenzoico	1.05 ± 0.07	140 ± 8	0.15 ± 0.02	0.37 ± 0.04
Ácido 2-amino-3-hidroxibenzoico	1.33 ± 0.11	94 ± 7	0.12 ± 0.01	2.35 ± 0.25
Ácido 2,3-diaminobenzoico	0.99 ± 0.07	88 ± 7	0.11 ± 0.01	0.21 ± 0.02
3-Amino-L-tirosina	2.02 ± 0.17	701 ± 65	1.41 ± 0.15	0.89 ± 0.09
4-F-1,2-fenilendiamina	3.87 ± 0.32	31 ± 3	0.12 ± 0.01	0.24 ± 0.03
4-Cl-1,2-fenilendiamina	2.57 ± 0.18	35 ± 3	0.09 ± 0.01	0.52 ± 0.07
4-Br-1,2-fenilendiamina	3.75 ± 0.35	16 ± 2	0.06 ± 0.01	0.73 ± 0.10
4-metoxi-1,2-fenilendiamina	1.83 ± 0.14	852 ± 89	1.56 ± 0.17	0.41 ± 0.05

A partir de este mecanismo se han caracterizado otras moléculas no fenólicas como sustratos suicidas de tirosinasa. Así, se han caracterizado como sustratos suicidas al peróxido de hidrogeno (García-Molina et al., 2005a), al ácido ascórbico (Muñoz-Muñoz et al., 2009a), al NADH (García-Molina et al., 2010b), al ácido tetrahidrofólico (García-Molina et al., 2011), las tetrahidropterinas (Muñoz-Muñoz et al., 2011a) y la hidroxihidroquinona (Muñoz-Muñoz et al., 2013a; 2013b; García-Molina et al., 2014b).

1.5.7. Inactivación térmica

Para evitar el pardeamiento enzimático, se han utilizado técnicas convencionales como el escaldado y el calentamiento en autoclave. Actualmente, con objeto de evitar pérdidas de peso y de nutrientes, se empiezan a considerar otras técnicas como son la irradiación con microondas para inactivar a tirosinasa. Nuestro grupo de investigación ha profundizado en este aspecto (Devece et al., 1999; Rodríguez-López et al., 1999; Sánchez-Hernández et al., 1999).

1.6. Tirosinasa y patología

1.6.1. Melanoma

1.6.1.1. Concepto y epidemiología

El melanoma cutáneo es un tumor maligno derivado de melanocitos epidérmicos activados o genéticamente alterados. Es el resultado de complejas interacciones entre constitución genética y factores ambientales (Fitzpatrick et al., 2001).

Según los datos publicados por el Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III), la incidencia anual de melanoma en España se sitúa en una tasa anual ajustada a la población europea de 6.14 en hombres y 7.26 en mujeres por 100.000 habitantes (Cabanes Domenech et al., 2009). Los resultados de los estudios epidemiológicos en España muestran diferencias con la incidencia del melanoma en el Norte de Europa, donde se alcanzan hasta 15 casos nuevos anuales por cada 100.000 habitantes (60.000 nuevos casos en 2013), el doble de lo observado en España (Nieto et al., 2003; de Vries et al., 2003; de Vries y Coebergh, 2004; Sáenz et al., 2005; Cabanes Domenech et al., 2009; Ríos et al., 2013).

1.6.1.2. Factores de riesgo de desarrollo de melanoma

A. Exposición al sol

B. Factores Hereditarios (el 10% de melanomas aparece en grupos familiares)

-*"Melanoma familiar"*. Herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta.

-*"Síndrome del lunar atípico" (SLA) o "síndrome del nevus displásico" (SND)*. Herencia autosómica dominante con expresión y penetrancia incompleta.

C. Nevus: aproximadamente 70% de los melanomas tienen nevus preexistente en el lugar del tumor primario. Los hombres tienen como media de 20 a 40 nevus en la tercera década de la vida. Los nevus continúan formándose durante toda la vida adulta. Sólo uno de cada 500.000 lunares sufrirá transformación neoplásica.

-*Mutaciones en oncogenes y en el gen supresor p53.*

-*Otros factores de riesgo:* Exposición a productos químicos, agentes físicos, inmunosupresión y factores profesionales (Wagner y Casciato, 2001).

1.6.1.3. Diagnóstico

A. El diagnóstico *de visu*.

En el diagnóstico puede ser de ayuda una dermatoscopia hecha por un profesional experimentado y otros métodos de imagen (Rigel et al., 2010).

La dermatoscopia, también llamada microscopía de epiluminiscencia, microscopía de luz refleja o simplemente *epiluminiscencia*, es una técnica no invasiva de diagnóstico en dermatología, la cual mediante un instrumento óptico, llamado dermatoscopio, permite examinar mejor las lesiones por debajo de la superficie cutánea amplificando *in vivo* la imagen sospechosa una vez eliminados los fenómenos de refracción y reflexión de la luz sobre la piel (Duce, 2004).



Figura 6.1. Exámen dermatoscópico de lesiones cutáneas.

En general, clínicamente las lesiones sospechosas se caracterizan por:

Asimetría

Bordes irregulares

Color heterogéneo

Diámetro (6 mm)

Evolución

Este concepto se sintetiza en la **regla ABCDE** (Garbe et al., 2008) Figura 6.2. Es necesario puntualizar que actualmente muchos melanomas se diagnostican con un diámetro menor de 5 mm (Bono et al., 2006).



Figura 6.2. Lesiones que cumplen cada uno de los criterios sospechosos de malignidad de una lesión pigmentada.

B. Diagnóstico microscópico.

Según el Colegio Americano de Patólogos (CAP) un informe anatómico-patológico de una biopsia de melanoma, debe incluir los siguientes ítems:

-Procedimiento (afeitado cutáneo, punch, exéresis...)	-Sitio del tumor
-Lateralidad de la lesión (derecha, izquierda y centro)	-Tamaño del tumor
-Nódulos satélite macroscópico (sólo en escisión)	-Grosor del tumor (Breslow)

-Pigmentación macroscópica	-Nivel de invasión (Clark)
-Tipo histológico (NOS (Not Otherwise Classified, melanoma superficial, melanoma nodular, melanoma dermoaplásico, etc)	-Invasión linfovascular/perineural
-Infiltración en el tumor por linfocitos	-Ulceración
-Márgenes	-Índice mitótico
-Microsatelitosis	-Regresión tumoral
-Fase de crecimiento (tumor-ganglio-metástasis)	-Ganglios linfáticos
-TNM (T depende del grosor, N número de ganglios y M el de metástasis)	-Tumor primario

C. Melanogénesis en el diagnóstico de melanoma

-*Melanina*. La capacidad de sintetizar melanina que tienen los melanomas es utilizada para hacer el diagnóstico diferencial con otros tipos de tumores, Figura 6.3. La melanina puede ser detectada por las tinciones histoquímicas habituales y otras específicas, como la de Fontana-Masson. La concentración y el tipo de melanina (eumelanina o feomelanina) puede ser convenientemente determinada por resonancia de espín electrónico (Sealy et al., 1982). La detección y cuantificación de melaninas proporcionan información útil acerca de las opciones terapéuticas y más todavía, la melanina puede atenuar el efecto de la radioterapia, fototerapia o quimioterapia (Slominski et al., 1998).



Figura 6.3. Ejemplos de melanomas cutáneos. (a). Melanoma superficial. (b). Melanoma lentigo maligno. (c). Melanoma nodular. (d). Melanoma lentiginoso acral (Berrocal et al., 2014).

-Ultraestructura: el marcador específico ultraestructural de melanocitos es la presencia de melanosomas. La estructura del melanosoma es anormal en lesiones malignas (Ortega et al., 1995; David et al., 2013), Figura 6.4.

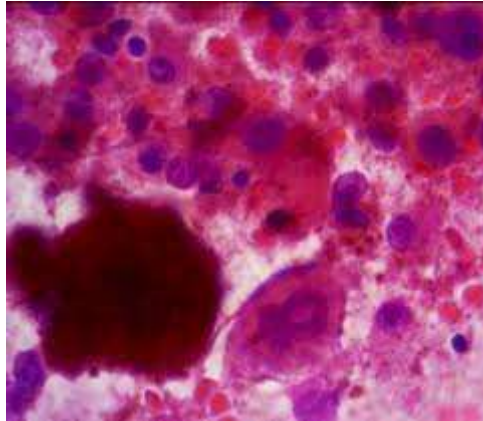


Figura 6.4. Metástasis ganglionar de un melanoma. Nótese el acúmulo de melanina, indicando la procedencia histológica de la metástasis (Ortega et al., 1995).

D. Criterios clínicos y patológicos en el diagnóstico del melanoma

El diagnóstico anatomopatológico del melanoma se hace por la presencia de la proliferación de melanocitos atípicos en la unión dermoepidérmica que desplaza la región basal. La aparición de agregados de melanocitos atípicos en la dermis papilar apunta hacia un melanoma invasivo. El determinante más importante del pronóstico del melanoma es la fase de crecimiento, radial o vertical, RGP (Radial Growth Phase) o VGP (Vertical Growth Phase), Figura 6.5. Clínicamente, el RGP se presenta en placas que pueden medir 2.5 cm y su coloración es variable, roja, azul, blanca, marrón y negra. Después de la escisión del tumor, el melanoma RGP se asocia usualmente con larga supervivencia libre de metástasis. Cuando se inicia la fase de crecimiento vertical se rompe la unión dermoepidérmica pasándose a invadir la dermis papilar, la reticular y el tejido graso (Lejeune et al., 1994; Balch, 1998).

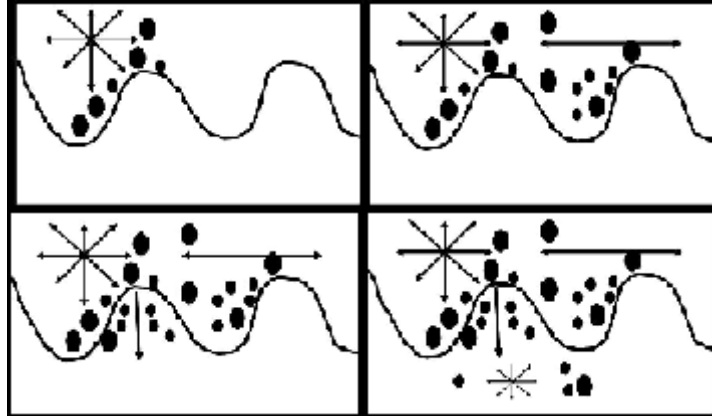


Figura 6.5. Fases de crecimiento horizontal (parte superior) y Fases de crecimiento vertical (parte inferior).

1.6.1.4. Patogenia

El melanoma maligno es la mayor causa de muerte relacionada con cáncer de piel del mundo. La piel blanca, pecosa, la localización, ciertos síndromes hereditarios (nevus atípico familiar y el síndrome del melanoma) y factores del comportamiento, como la exposición al sol, están asociados a un aumento del riesgo. El 90% de los melanomas son esporádicos y de ellos el 50% sufren mutaciones BRAF (gen miembro de la familia RAF: familia de genes que codifican quinasas de serina y treonina) y un 25% mutaciones en NRAS (RAS: proteínas de membrana unidas a proteínas G) (Gray-Schopfer et al., 2007). Es difícil encontrar ambas mutaciones juntas. Además, en los melanosomas mucosos y acrales, se han detectado un 7% de mutaciones en c-kit y un 4% en CDK4.

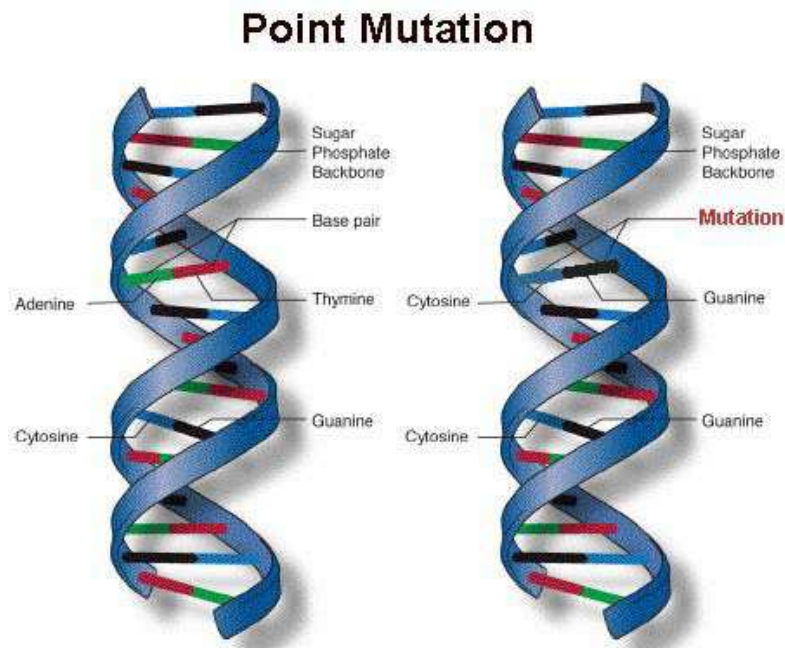


Figura 6.6. Representación de una mutación de una base en la doble hélice de ADN.

Tanto BRAF como NRAS pertenecen a la ruta de transducción de señales MAPK (Mitogen-activated proteín kinase). La señalización MAPK se inicia en la membrana celular, tanto por la unión de un ligando o por adhesión de integrinas al receptor de tirosin quinasa (RTKs), lo cual transmite señales de activación por medio de la RAS-GTPasa de la superficie interna de la membrana celular. El GTP unido a RAS puede unirse a proteínas efectoras, como RAF o fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) (Campbell y Der, 2004; Giehl, 2005) (Figura 6.7).

El gen BRAF (que da lugar a la proteína B-RAF), por sustitución simple de una timina por adenina, puede ser activado permanentemente. Mutaciones de este gen se ven en muchos cánceres: ovario, tiroides, etc., (Kimura et al., 2003), pero en el melanoma es donde se ha encontrado el mayor nivel de mutaciones BRAF (Palmieri et al., 2007). La activación del BRAF induce constitutivamente la señalización MEK-ERK (Mitogen-activated protein kinase-Extracelular signal regulated kinase) en células (Wan et al., 2004). La activación de BRAF conduce a la inducción de la expresión del MITF,

reconocido como el mayor regulador de los melanocitos. El BRAF activado participa en el control de la progresión del ciclo celular (Carreira et al., 2005) (Figura 6.7).

La presencia de mutaciones BRAF en los nevus sugiere que dichas mutaciones son necesarias pero no son suficientes para el desarrollo del melanoma (Patton et al., 2005).

En conclusión, el BRAF activado induce proliferación celular y supervivencia celular, lo que representa dos hechos biológicos que ocurren en la expansión melanocítica de los nevus y en la progresión maligna desde enfermedad superficial a invasiva (Pollock et al., 2003).

Como ya hemos indicado en el apartado 1.2.4.3., en ratones, MC1R es estimulado por α -MSH y activa la vía de las MAPK quinasas (ERK1/ERK2) por medio del AMPc. En humanos, sin embargo, las variantes de MC1R asociadas con pelo rojo y piel clara, que cursan con un incremento de cáncer de piel, MC1R activa el ERKs de forma independiente al AMPc. Esta activación del ERK por α -MSH resulta de la fosforilación mediada por la tirosina quinasa del c-KIT (receptor del stem cell factor), receptor tirosina quinasa esencial para la proliferación y supervivencia de los precursores de los melanocitos (Herráiz et al., 2011b).

El gen CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), también llamado supresor multi-tumor (MTS1), es el mayor gen involucrado en la patogénesis del melanoma y la predisposición al mismo (Stone et al., 1995), y codifica las proteínas p16^{CDKN2A} y p14^{CDKN2A}, que son supresoras de tumores. La inactivación del CDKN2A puede ser por delección, mutación o silenciamiento del promotor. La p16^{CDKN2A} inhibe la actividad de CDK4 (cyclin D-1-cyclin-dependent-kinase 4), encargada de fosforilar la proteína del retinoblastoma. Esta proteína fosforilada libera el factor de transcripción E2F que se une al ADN, estimula la síntesis de proteínas necesarias para la transcripción y promueve la progresión del ciclo celular (Pacífico y Leone, 2007). La p14^{CDKN2A} estabiliza p53 interactuando con la proteína MDM2 (Murine Double Minute-2), que promueve la degradación del producto del gen supresor de tumores p53 por el proteosoma, ubiquitinizándolo (Stott et al., 1998; Fang et al., 2000) (Figura 6.7).

El gen PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) se encuentra mutado en una gran cantidad de melanomas. La proteína codificada por el PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa) es un importante supresor de tumores que controla la división celular, la migración y la apoptosis, preservando a las

células de un crecimiento y división demasiado rápido e incontrolado (Tamura et al., 1998).

MITF (Microphthalmia-associated transcriptor factor) es el factor regulador de melanocitos por excelencia. En humanos las mutaciones en el MITF producen el síndrome de Waardenburg Ila, que cursa con pelo blanco y sordera (Hughes et al., 1994). Altos niveles de MITF exhiben actividad anti-proliferativa en células con melanoma (Wellbrock y Marais, 2005). Se han encontrado bajos niveles de MITF en células invasivas de melanoma (Hoek et al., 2008) y se han asociado con peor pronóstico clínico de la enfermedad (Salti et al., 2000), especulándose que el MITF puede ser un factor pronóstico. En melanomas, el MITF tiene como diana un gran número de genes con comportamientos antagonistas (McGill et al., 2002; Du et al., 2004; Loercher et al., 2005). Además, MITF está al final de dos rutas antiapoptósicas, la del ERK y la del PTEN, sugiriendo que MITF puede integrar las señales extracelulares pro-supervivencia. La expresión y funcionamiento del MITF puede ser regulada por un abanico de factores de transcripción cooperantes: Pax3, CREB, Sox10, Lef1, Brn-2 (Thomson et al., 1995; Goding, 2000) y miembros del MAPK y cAMP (Bertolotto et al., 1996; Bertolotto et al., 1998; Hemesath et al., 1998).

En el 90% de melanomas se encuentra la hiperfosforilación de ERK, con mutaciones de BRAF (50-70%) (Libra et al., 2005) y NRAS (15-25%) (Dahl y Guldborg, 2007). Se puede encontrar una predisposición familiar en el 10% de los individuos diagnosticados de melanoma (Platz et al., 2000). Las dos alteraciones más frecuentes son mutaciones y deleciones del CDKN2A, y mutaciones puntuales en CDK4 (Palmieri et al., 2009).

1.6.1.5. Clasificación

La clasificación de los distintos tipos de melanomas se realiza en base a exámenes físicos con atención especial a otras lesiones sospechosas, tumores satélites, signos y síntomas sugestivos de metástasis de ganglios linfáticos y sistémicas.

Si el melanoma es de bajo riesgo (grosor < 1mm) no es necesario un mayor estudio. En estadio superior es necesario un estudio por imagen de la cuenca ganglionar (abdomen/pelvis/pecho) para poder proceder al estadiaje.

En cuanto a la clasificación del melanoma, la última recomendación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Balch et al., 2009) se basa en tres criterios T, N, M. El valor de T depende del grosor del tumor, el N del número de ganglios metastáticos (micro y macroscópicos) y el de M de las metástasis. Con la combinación de estos ítems se obtienen cuatro grupos de estadiaje para el melanoma cutáneo.

1.6.1.6. Factores pronósticos del melanoma cutáneo

A. Indicadores de progresión del melanoma: Como ya se ha comentado, Clark et al. en 1969, describieron el concepto de “progresión del melanoma maligno”, y posteriores estudios demostraron que las metástasis se asocian exclusivamente con un patrón determinado de crecimiento en la dermis, que ellos denominaron “fase de crecimiento vertical” (Clark et al., 1986). Muchos melanomas crecen en una “fase llamada radial” (*in situ* o microinvasiva) en la cual la probabilidad de curación es del 100% (Byers y Bhawan, 1998).

Clásicamente se han considerado como factores pronóstico:

Tipo de melanoma, nivel de Clark, espesor de Breslow (Figura 6.8), ulceración, regresión, fase de crecimiento, metástasis y mitosis. Los dos primeros no han mostrado la suficiente evidencia, así que hoy día no son considerados como tales.

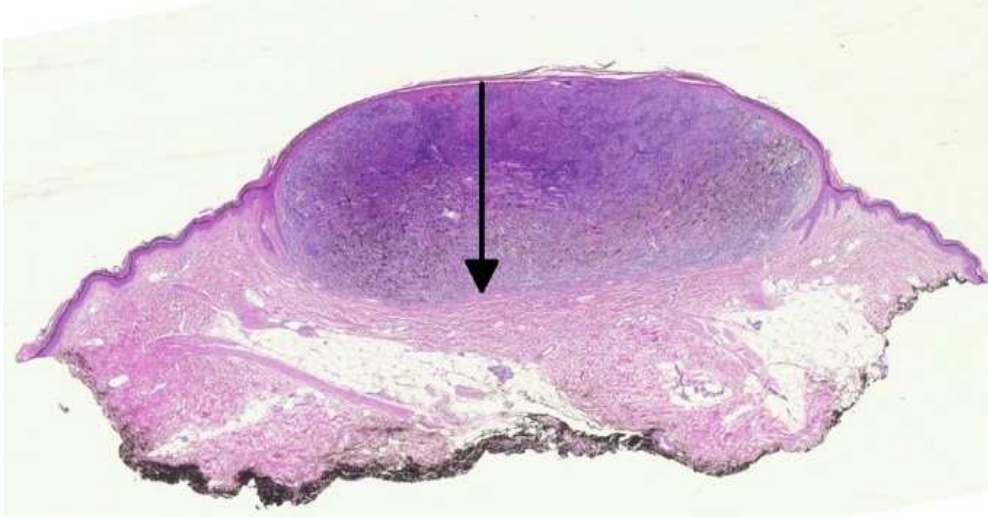


Figura 6.8 El espesor de Breslow va desde la capa granulosa hasta las células melánicas más profundas.

B. Marcadores tisulares

Estudios genéticos identificaron un gran número de genes que sufren un aumento significativo y reproducible en la regulación de las células de melanoma (Hoek, 2007). Por ejemplo, la osteopontina (se sobreexpresa en melanoma) guarda correlación con el grosor del tumor y el nivel de Clark, y posee valor predictivo positivo de afectación del ganglio centinela (Rangel et al., 2008). La información recibida por experimentos *in vitro* con líneas celulares debe ser aceptada con cautela. Estos marcadores necesitan verificación clínica. Li et al. en 2002, dividen los marcadores tisulares en cuatro categorías:

-Marcadores de proliferación celular, oncogenes, genes supresores de tumores.

-Enzimas degradantes de la matriz extracelular.

-Moléculas de la adhesión celular.

-Otros marcadores.

C. Marcadores serológicos

-Láctico deshidrogenasa (LDH). Es un indicador de metástasis (Finck et al., 1983). Pacientes con melanoma y un nivel anormal de LDH tienen una disminución de la supervivencia (Campora et al., 1988).

-*S100B*. El biomarcador de melanoma más estudiado es el S100B. Empezaron a hacerse estudios con el S100B sérico (Guo et al., 1995). También se observó una disminución de S100B sérico como respuesta al tratamiento. Se recomienda la determinación de S100B, cada 3-6 meses, en suero de pacientes con Breslow > 1 mm (Dummer et al., 2005; Garbe et al., 2008). S100 es una proteína ácida intracelular fijadora de calcio. La principal aplicación de S100 es el diagnóstico precoz de la recidiva tumoral y la monitorización terapéutica.

-*Antígeno inhibidor de Melanoma (MIA)*. MIA fue identificada en los años 90 como una proteína soluble, con actividades inhibitoras del crecimiento, secretada por las células del melanoma maligno (Bogdahn et al., 1989; Apfel et al., 1992; Blesch et al., 1994). La principal aplicación de MIA es el seguimiento de los pacientes con melanoma, como complemento a la S100.

-*Enolasa específica de neuronas (NSE) y ácido siálico unido a lípidos (LASA-P)*.

-*Metabolitos derivados de melaninas como el 5-S-Cisteinildopa (5SCD) y el ácido 6-hidroxi-5-metoxiindol-2-carboxílico*.

-*Citoquinas, receptores de las citoquinas y moléculas de adhesión*. Aumento en la producción de citoquinas. Aumentan las células CD4 que producen IL-10 (citoquina).

D. Marcadores moleculares

Se ha demostrado la existencia de células de melanoma circulantes (CMCs) en ciertos estadios de la enfermedad. El significado de estas células no está claro todavía. Alguna de estas células es viable y retiene su capacidad de proliferación *in vitro* (Reinhold et al., 1997), y se asume que <0.01% de estas células tumorales puede originar una metástasis.

La detección de CMCs se puede realizar por el test de la RT-PCR, que pone de manifiesto la presencia de ARNm de enzimas asociadas con melanoma o melanocitos (como tirosinasa). Normalmente detecta de 1-10 células de melanoma en 10^7 linfocitos en sangre periférica (5-10ml) (Hoon et al., 1995; Reinhold et al., 1997; Farthmann et al., 1998). RT-PCR de tirosinasa no da positivo en muestras de sangre de controles (Brossart et al., 1993; Gläser et al., 1997; Palmieri et al., 1999), siendo tirosinasa el marcador más específico para la RT-PCR. La combinación de marcadores para detectar CMCs aumenta la sensibilidad. Los marcadores más usados en combinación

con tirosinasa son MART-1/Melan A (MART-1 es el Melanoma antigen recognized by T-cells 1/ antígeno de melanocitos) se encuentra sobre la superficie del melanocito y aumenta la sensibilidad y especificidad (Curry et al., 1998; 1999; Schittek et al., 1999; Schrader et al., 2000).

Todo esto nos lleva a concluir que una investigación cuidadosa en el campo de los bioamarcadores del melanoma es esencial para proporcionar una clasificación predictiva terapéutica de los melanomas humanos.

1.6.1.7. Tratamiento del melanoma

A lo largo de la historia se han ido desarrollando diferentes técnicas para combatir el melanoma, a continuación se muestra una figura (Figura 6.9) resumiendo la aparición de las diferentes técnicas en el tiempo.

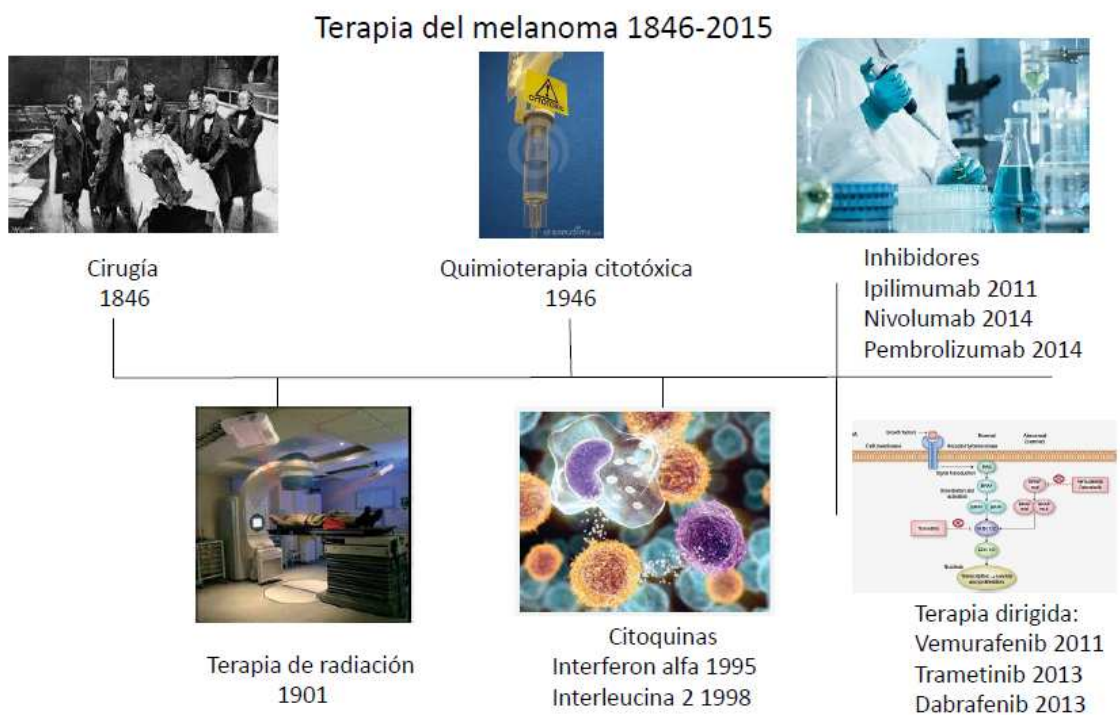


Figura.6.9. Evolución de las diferentes terapias del melanoma desde el año 1846 hasta la actualidad.

A.Cirugía. Tratamiento del tumor primario/ganglios linfáticos/metástasis. En algunos pacientes se lleva a cabo la resección de metástasis si cumplen unos criterios determinados (Figura 6.10).

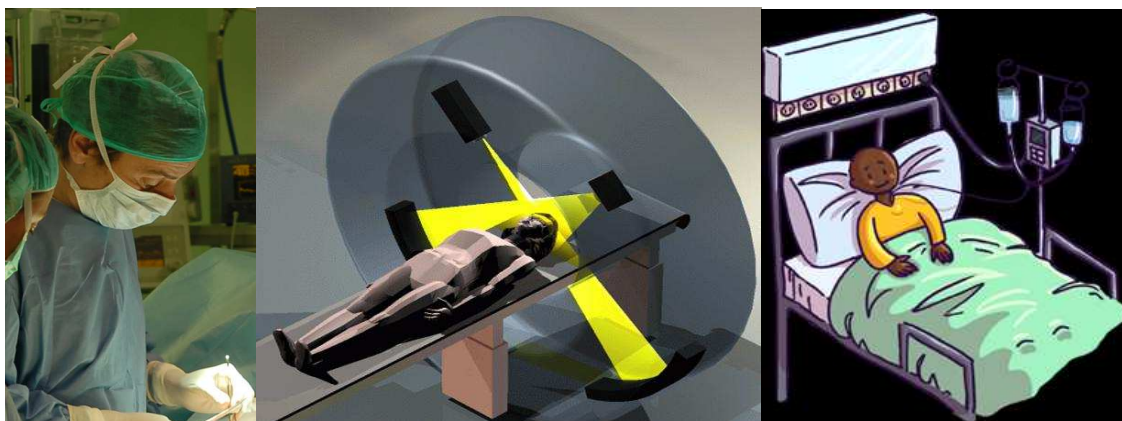


Figura 6.10. En el tratamiento del melanoma el único tratamiento curativo es la cirugía, la radioterapia no es efectiva, mientras que la quimioterapia no mejora la supervivencia.

B.Radioterapia

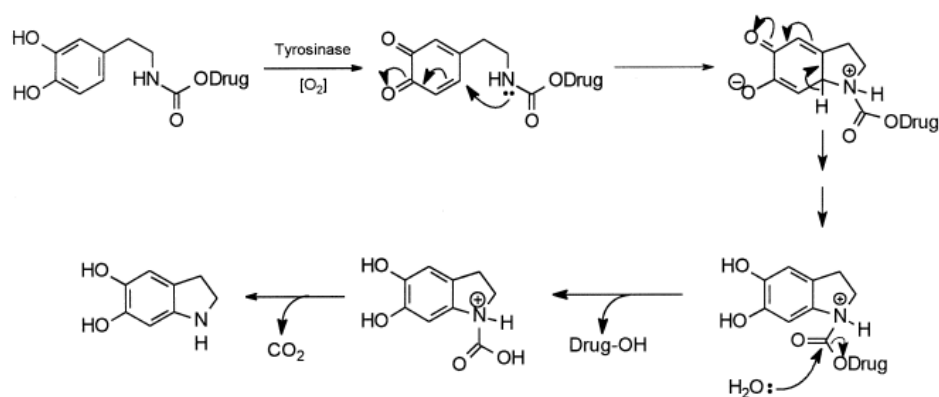
C.Tratamiento sistémico

D.Tratamiento Adyuvante

-La *Quimioterapia* se usaba habitualmente en el tratamiento del melanoma.

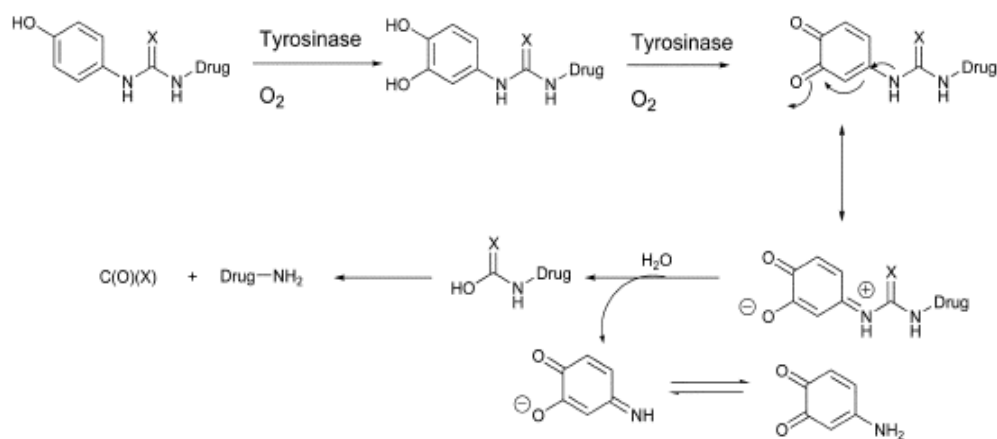
-El *INF- α* ha demostrado claramente su efectividad en melanoma.

-*MEDPT*: Como una estrategia dirigida a la terapia del melanoma maligno, se ha diseñado la técnica denominada MDEPT (Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy) (Jordan et al., 1999). Así, el compuesto debe ser un sustrato de tirosinasa dirigido hacia el tratamiento del melanoma, ya que la liberación del fármaco activo debe ser provocada por la actuación de esta enzima. Para que la activación ocurra el sustrato debe exhibir una parte catecólica o fenólica, para permitir la oxidación por la enzima y de esta manera favorecer la liberación del fármaco. Otro requerimiento que deben cumplir estos compuestos es que el fármaco debe ser estable hasta que ocurra su liberación. Como un ejemplo, en el siguiente esquema se muestra la liberación del agente tóxico mediante la acción de tirosinasa Esquema 6.1:



Esquema 6.1. Mecanismo propuesto para la liberación de un agente tóxico mediante la acción de tirosinasa sobre un compuesto pro-fármaco.

En publicaciones posteriores se han seguido diseñando compuestos con esta finalidad, para conseguir la introducción de fármacos en células diana (melanocitos). Se ha constatado que los productos que se parecen a los sustratos de tirosinasa hacen más fácil su aplicación en MDEPT (Jordan et al., 2001). Así, se han diseñado productos derivados del 4-aminofenol y de la 6-amino dopamina, como se muestra en el siguiente esquema (Knaggs et al., 2005), Esquema 6.2.



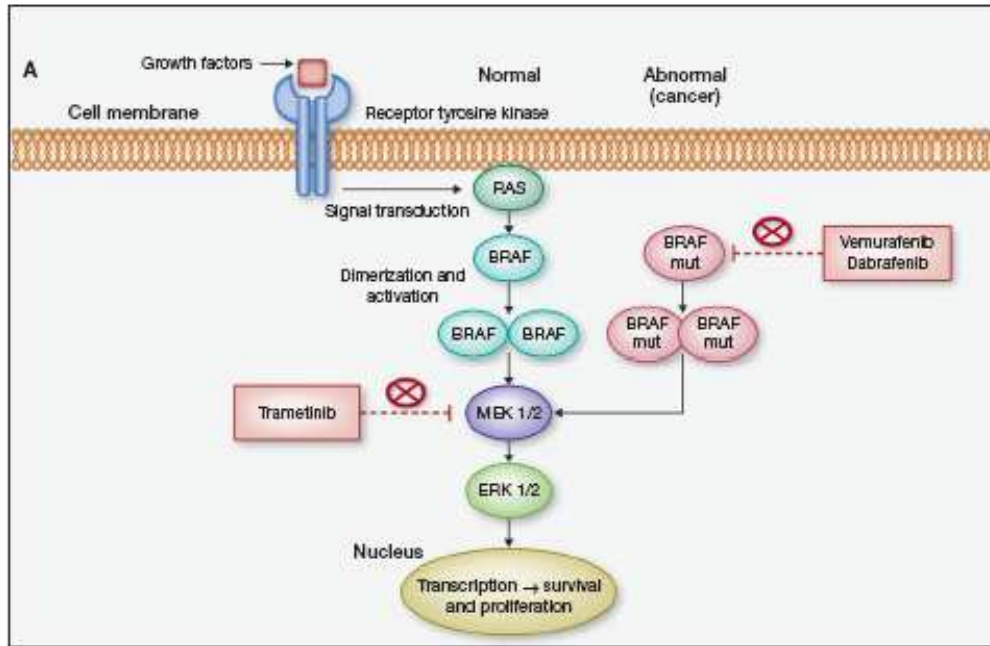
Esquema 6.2. Diseño de productos derivados del 4-aminofenol. Ruta propuesta para la liberación de fármacos (Knaggs et al., 2005).

Recientemente, nuevas terapias moleculares e inmunológicas están mejorando los resultados en los pacientes. Casi el 50% de los melanomas albergan mutaciones activantes en BRAF, que promueven la activación de la ruta RAS-RAF-MEK-ERK y la proliferación del melanoma. Se ha visto que los melanomas que llevan mutado BRAF también pueden haber alterado las respuestas inmunes, y esto sugiere nuevas vías para el tratamiento de estos pacientes.

La inhibición simultánea de MEK y BRAF, especialmente la combinación de inhibidores de BRAF con nuevas inmunoterapias como los anticuerpos de bloqueo de puntos de control, pueden mejorar aún más la activación inmune o contrarrestar las señales inmunosupresoras. La evaluación preclínica y ensayos clínicos en curso deberían proporcionar nuevos conocimientos sobre el papel de la inmunidad del melanoma mutante en BRAF (Llieva et al., 2014).

Uno de los primeros inhibidores de BRAF fue sorafenib, un inhibidor de multiquinasa, el cual no distingue entre mutante y tipo salvaje de BRAF (Eisen et al., 2011; Hauschild et al., 2009). Después de sorafenib, se diseñó una nueva generación de inhibidores selectivos de mutantes de BRAF, como por ejemplo, Vemurafenib para la mutación V600E fue aprobado por la FDA en 2011 y por la Agencia Europea del Medicamento en 2012 (Chapman et al., 2012; da Rocha Dias et al., 2013), Esquema 6.3.

La FDA, en 2013, aprobó dabrafenib, una pequeña molécula inhibidora de la actividad kinasa de BRAF, actuando de una manera similar que vemurafenib (Ballantyne y Garnock-Jones, 2013), pero con algunas diferencias, como la reducción de la fototoxicidad (Hauschild et al., 2012; Llieva et al., 2014).



Esquema 6.3. Inhibidores de la actividad quinasa de BRAF: Vemurafenib y Dabrafenib (Llieva et al., 2014).

1.6.2. Alteraciones de la pigmentación

Las variaciones en el color de la piel, de una persona a otra, vienen determinadas por la madurez de los melanosomas y no por el número de melanocitos. La ratio de melanocitos/células basales es 1:4 a 1:9 dependiendo de la región del cuerpo, pero no dependiendo del origen étnico.

La hipopigmentación resulta de la reducción en el número de los melanocitos y/o melanosomas maduros, y de la transferencia anormal de los melanosomas a los queratinocitos vecinos. La hipopigmentación puede ser difusa o localizada, congénita o adquirida y asociada a un determinado patrón de distribución. La hiperpigmentación es debida a un aumento en la producción de melanina causada por un incremento de los melanocitos y de la actividad tirosinasa, así como el recambio de melanina (Fistarol e Itin, 2010). Los desórdenes de la pigmentación debido a agentes químicos y físicos se llaman leucoderma y melanoderma, respectivamente.

1.6.2.1. Hipopigmentación

Se manifiesta en el nacimiento o en la infancia. Puede afectar a la piel y pelo con/sin afectación de los ojos.

A. Migración anormal de los melanoblastos en la piel (Spritz et al., 2004).

-*Piedalbismo*

-*Síndrome de Waardenburg*

B. Enfermedades debidas a melanogénesis anormal (Rees, 2004).

-*Albinismo*: Enfermedad hereditaria. Defectos en el gen de la tirosinasa. Incidencia de 1:5000-1:40000. Visión pobre y nistagmo. Piel y pelo muy blanco. La distinción entre oculocutáneo y sólo ocular es que en la forma ocular hay discreta despigmentación en el pelo y en la piel. Se han caracterizado de manera directa las mutaciones en el gen de la tirosinasa, responsables de la deficiente actividad de la enzima en diversos tipos de albinismo (Figura 6.11).



Figuras 6.11. Albinismo oculocutáneo.

C. Formación anormal del melanosoma (Herskovitz y Sprecher, 2008).

La formación anormal de los melanosomas conduce al aumento de sensibilidad a la luz UV y predisposición a las lesiones precancerosas de la piel.

D. Enfermedades causadas por una transferencia anormal del melanosoma.

E. Hipomelanosis causadas por varios mecanismos patológicos.

-*Hipomelanosis de Ito*: presente en el nacimiento o en los primeros años de vida. El desorden se considera un síntoma más, en vez de una enfermedad. Se asocia a desórdenes del desarrollo de SNC, ojos, huesos (Figura 6.12).



Figura 6.12. Hipomelanosis de Ito.

-*Vitíligo*. Es una enfermedad adquirida que causa destrucción de los melanocitos, dando lugar a máculas y manchas blancas. Generalmente comienza en las manos y pies y se extiende a los pliegues y la cara. El vitíligo segmentario tiene un pronóstico más favorable que el simétrico, variante difusa. Afecta del 0.5% al 2% de la población general (Taïeb y Picardo, 2009). La edad de inicio de la enfermedad generalmente es en la infancia en un 25-30% de los casos y no está claro la predilección de sexo por la enfermedad (Nicolaidou et al., 2012).

Vitíligo es una enfermedad multifactorial con componentes genéticos y ambientales (Alikhan et al., 2011). La ausencia de funcionalidad melanocítica es probablemente resultado de su destrucción. Hay diferentes teorías para explicar la destrucción de estos melanocitos (Nicolaidou y Katsambas, 2014), Figura 6.13.



Figura 6.13. Vitíligo. Proceso de despigmentación de la piel.

Recientes estudios han demostrado que tirosinasa puede actuar como autoantígeno en varios desórdenes autoinmunes. Se encontraron mayores títulos de anticuerpos IgG antitirosinasa en pacientes con vitíligo difuso comparado con vitíligo localizado. Todos los estudios indican que tirosinasa actúa como un autoantígeno y sirve como marcador de vitíligo (Baharav et al., 1996). Con la finalidad de disminuir y prevenir la destrucción de melanocitos Zehtab et al. en 2001, administraron tirosinasa de *A. bisporus* oralmente en modelos animales, lo cual resultó en una disminución de la respuesta inmune (Zehtab et al., 2001).

-Hipopigmentación en adultos.

- a. Desórdenes de la hipófisis anterior (Pan-hipopituitarismo).
- b. Nevus de Sutton.
- c. Otras etiologías de las despigmentaciones.

1.6.2.2. Hiperpigmentación

Se caracteriza por un aumento en la cantidad de melanina.

A. Hiperpigmentación localizada adquirida.

-El *Melasma*, es una hipermelanosis común adquirida que ocurre exclusivamente sobre las áreas expuestas al sol, sobre todo en la cara y ocasionalmente en cuello y antebrazos. Es más común en mujeres. Los hombres representan el 10 % de los casos (Katsambas et al., 2003).

La causa exacta de la aparición del melasma sigue siendo difícil de saber, pero los dos factores más importantes implicados en su etiopatogenia son la luz solar y la predisposición genética. Otros factores implicados pueden ser el embarazo y las hormonas exógenas, la disfunción tiroidea, cosméticos, y fármacos fototóxicos y anticonvulsivantes (Sheth y Pandya, 2011).

El melasma puede estar clasificado en 4 tipos histológicos (Shet y Pandya, 2011; Katsambas y Antoniou, 1995): epidérmico, dérmico, mixto e indeterminado (Nicolaidou y Katsambas, 2014). Los más comunes son:

-*Tipo epidérmico*: hay un aumento en la deposición de melanina en los estratos basal y suprabasal de la epidermis.

-*Tipo dérmico*: la melanina es depositada en macrófagos perivasculares de los plexos vasculares, Figura 6.14.



Figura 6.14. Aumento de la deposición de melanina en la epidermis.

B. Hiperpigmentación localizada congénita

-*Manchas tipo café con leche*. Son típicas de varias genodermatosis, especialmente de neurofibromatosis (Landau y Krafchilk, 1999). Más de 5 manchas café con leche son sugestivas de neurofibromatosis (Figura 6.15). También están asociados con estos tipos de manchas los síndromes de Albright y de Cowden.



Figura 6.15. Manchas tipo café con leche en un paciente con neurofibromatosis.

C. Otras alteraciones en la pigmentación.

-*Manchas en la piel.* Como ya hemos indicado anteriormente, la aparición de lo que comúnmente se denomina “manchas” se debe a una alteración de la pigmentación de la piel, que ocurre en distintas patologías; léntigos; cloasmas y vitíligo. Además pueden aparecer otras manchas como efélides (Figura 6.16), nevus, manchas de nacimiento, entre otras.



Figura 6.16. Mujer con efélides en el rostro.

Para su prevención, en los casos en que las manchas se produzcan como consecuencia de la exposición a las condiciones ambientales (fotoexposición), la adopción de medidas preventivas y el uso de productos fotoprotectores es fundamental (Badreshia-Banal y Draelos, 2007). Es muy importante utilizar un protector solar que proteja frente a los rayos UV (A y B), ya que existe amplia evidencia de que muchas manchas se desencadenan por la exposición prolongada a este tipo de radiación.

Para su tratamiento, los productos usados son de dos tipos: bien para eliminar manchas o bien para enmascararlas (Grimes, 2009; Smit et al., 2009). En ambos casos se necesita una constancia en su aplicación para lograr obtener los efectos deseados.

Los productos utilizados para enmascarar o corregir están formados por pigmentos que cubren la superficie cutánea y hacen que la pigmentación sea uniforme. Normalmente contienen sustancias como óxido de titanio, óxido de zinc, etc. Estos productos no eliminan las manchas, pero mejoran la apariencia. El uso de maquillajes y bases correctoras permite ocultar imperfecciones y disimular manchas.

Existen en la Oficina de Farmacia una amplia variedad de productos con sustancias despigmentantes encaminados a eliminar las manchas de la piel, entre los que podemos citar, por una parte las especialidades farmacéuticas y por otra los productos cosméticos:

1. Especialidades farmacéuticas

Hidroquinona:

Se ha descrito como un fuerte inhibidor de la melanogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lerner y Fitzpatrick, 1950), y se utiliza como un agente despigmentante en casos de hiperpigmentación (Lerner y Fitzpatrick, 1950; Spencer, 1965; Mills y Kligman, 1978; Chavin et al., 1980). Se han descrito efectos adversos de su uso. Por ejemplo, se ha visto como hidroquinona (HQ) afecta al metabolismo de muchos tipos de células (Penney et al., 1984; Draelos, 2007; Stratford et al., 2012; Fabi y Goldman, 2013; Monteiro et al., 2013). Sin embargo, la aparición de efectos adversos significa que sólo se puede utilizar en dosis cuidadosamente controladas (Draelos, 2007; Fabi y Goldman, 2013; Monteiro et al., 2013). Los productos farmacéuticos (cremas y geles) pueden contener como máximo hasta el 4% de HQ (Tabla 6.1) (Catalogo de

Medicamentos. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid. 2010).

Como efectos adversos de HQ podemos encontrar la pigmentación ocular y, en un pequeño número de casos, daño corneal permanente (deCaprio, 1999). Entre los intentos para inhibir la citotoxicidad de HQ se ha utilizado resveratrol como un componente adicional (O`Donoghue, 2006; Wang et al., 2012). También se han desarrollado tratamientos dermatológicos despigmentantes sin HQ, (O`Donoghue, 2006; Makino et al., 2013).

Debido a los efectos secundarios derivados del uso prolongado de hidroquinona, desde el año 2000 el uso de esta sustancia como despigmentante en productos cosméticos ha sido prohibida, en la Unión Europea, a altas concentraciones, debido a sus potenciales riesgos toxicológicos y a la probabilidad de causar hiperpigmentación postinflamatoria. Su utilización está permitida a una concentración máxima del 4%. Probablemente, los efectos secundarios que origina la hidroquinona derivan del hecho de ser sustrato de tirosinasa y originar la hidroxip-benzoquinona, que puede reaccionar con compuestos nucleofílicos, como cisteína y glutatión.

Aunque HQ siempre ha sido descrita como inhibidora de tirosinasa, nuestro grupo de investigación ha caracterizado por primera vez ésta molécula como sustrato de tirosinasa, la metodología y resultados se incluyen en ésta Tesis (Morpurgo et al., 2011; García-Molina et al., 2014a; 2014b; 2014c).

Tabla 6.1. Especialidades farmacéuticas comercializadas en España:

C.N. (Código Nacional)	Descripción	Hidroquinona
909333	Melanasa crema	2%
762922	Hidroquinona isdin gel	2%
651543	Despigmentasa 4% gel	4%
729152	Pigmentasa crema	4%

668376	Licostrata gel	4%
651542	Licoforte 4% gel	4%

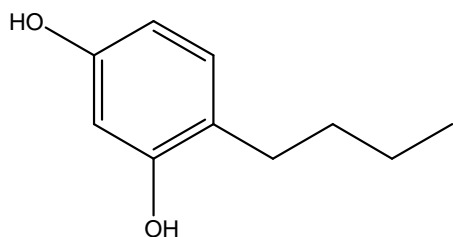
2. Productos cosméticos

En la Tabla 6.2 se han recogido varias marcas comerciales con sus principios activos principales con función despigmentante o coadyuvantes de la despigmentación.

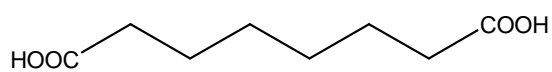
Tabla 6.2. Relación de algunos productos cosméticos disponibles en la Oficina de Farmacia para el tratamiento de las manchas destacando su componente despigmentante principal:

Descripción del producto	Composición
EVEN BRIGHTER (eucerin)	B-resorcinol (4-Butil-resorcinol)
Be + serum corrector	Hexilresorcinol Niacinamida Hidroxitirosol
DSP-Serum iluminador	Genisteína Hexilresorcinol Ácido fítico
DSP-CREMA Renovación	Genisteína Hexilresorcinol Ácido fítico AHA
DSP-MASK	Ácido elágico Ácido kójico Ácido salicílico Arbutina Vitamina C
AVENE D-PIGMENT	Trío de kligman: Melanye de retinaldehido Pre-tocoferil Agua termal de avène

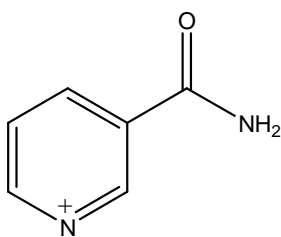
Babe fluido despigmentante SPF 20	Filtros solares csp FPS 20 Proteínas lácticas Péptidos despigmentantes BABÉ Ácidos frutales BABÉ
Sesderma azelac ru serum liposomado	Ácido azelaico 4-butilresorcinol Ácido glicirritinico Retinol Niacinamida encapsulados en liposomas
Sesderma kojicol plus gel despigmentante	Ácido kójico Ácido glicólico Alfa-arbutina Ácido fítico
Sesderma Thiomelan Crema SPF 15	Ácido tióctico Dipalmitato kójico Ácido fítico Vitamina E Vitamina F
Sensilis White silk	Ác glicólico puro al 10%
Tanit fluido	Derivado del ácido láctico Curcumina Protección de amplio espectro SPF 30
Tanit plus	Ácido kójico Filtros solares UV (A y B)



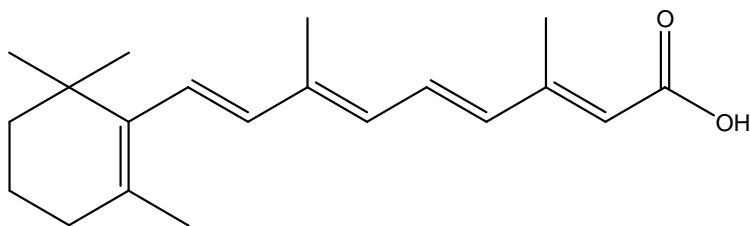
a) 4-Butilresocinol



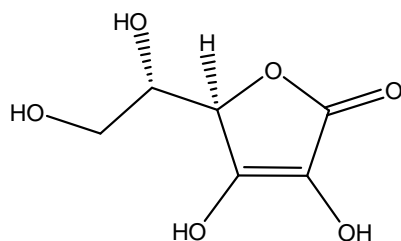
b) Ácido azelaico



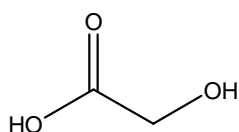
c) Niacinamida



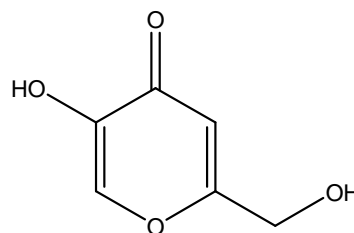
d) Ácido retinóico



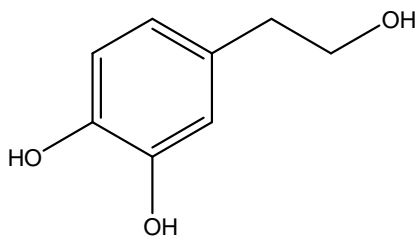
e) Vitamina C



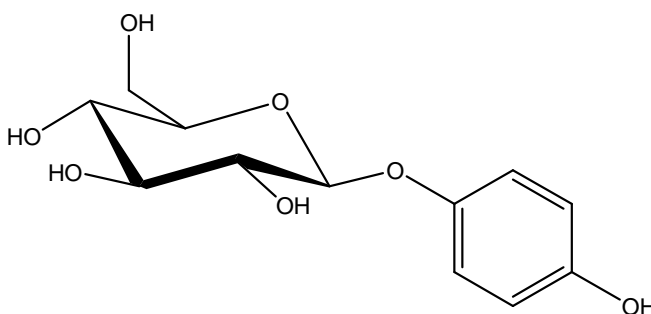
f) Ácido glicólico



g) Ácido kójico



h) Hidroxitirosol



i) Arbutina

Esquema 6.4. Estructuras químicas de diferentes compuestos con propiedades despigmentantes o coadyuvantes de la despigmentación.

4-Butilresorcinol

El 4-butilresorcinol es un componente muy eficaz para reducir la producción de melanina, hasta dos veces más activo que hidroquinona y más de 10 veces más potente que el ácido kójico (Kolbe et al., 2013). Es un inhibidor muy potente de la tirosinasa aplicado tópicamente. No causa irritación cutánea, o muy escasa, y es eficaz frente a los tipos más importantes de hiperpigmentación, como el melasma y las manchas seniles. Clínicamente la reducción de la hiperpigmentación se empieza a apreciar a las 4 semanas de tratamiento: Figura 6.17 y Esquema 6.4 (a).

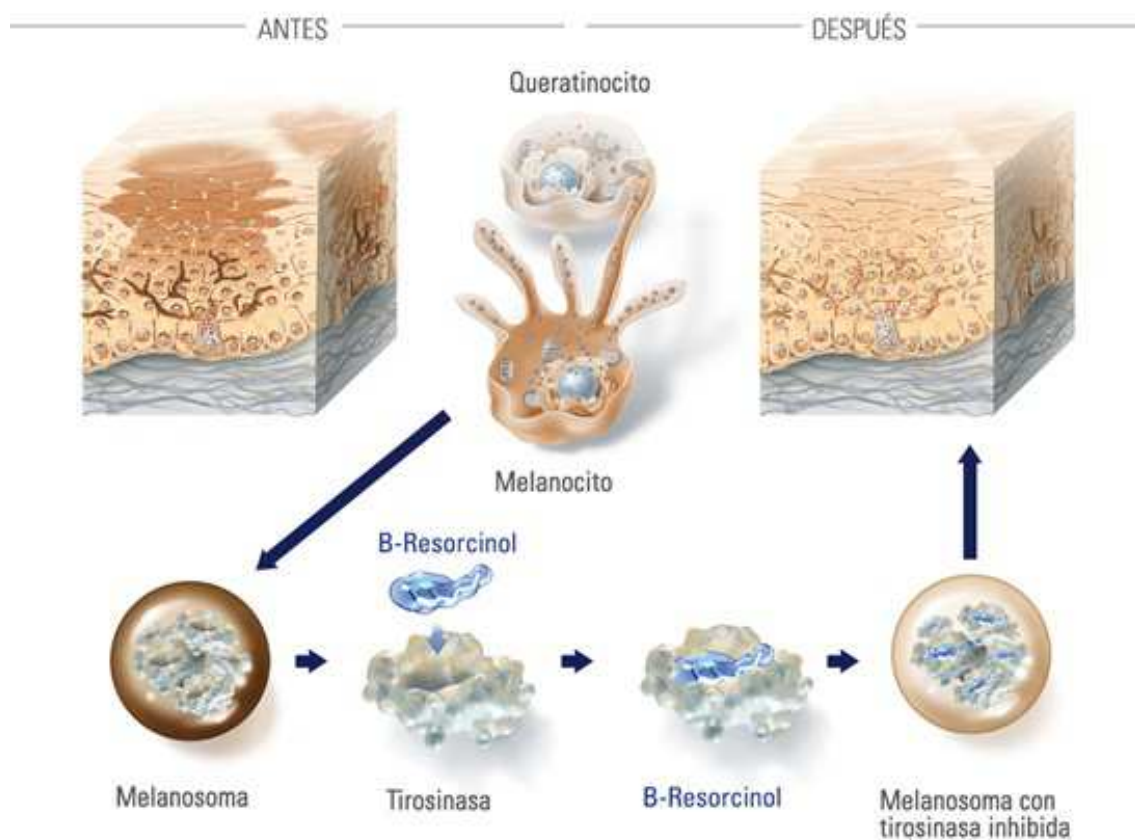


Figura 6.17. Incorporación del 4-Butilresorcinol en el melanosoma e inhibición de tirosinasa (Eucerin®).

Ácido azeláico

Influye indirectamente sobre la producción de melanina y reduce la hiperpigmentación. Su efecto es escaso o nulo sobre las pecas y las manchas seniles y, además, puede irritar e inflamar la piel. Al igual que el ácido kójico tienen poder quelante del cobre y también actúan de manera citotóxica en el melanocito a través de la inhibición de la síntesis de ADN (Nguyen y Bui, 1995; Halder y Richards, 2004; Davis y Callender, 2010), Esquema 6.4 (b).

Niacinamida

La niacinamida o nicotinamida interviene en numerosas reacciones de óxido-reducción en las que actúa fundamentalmente como antioxidante, Esquema 6.4 (c). Dentro de sus acciones por vía tópica, conviene destacar que la niacinamida se está aplicando en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades cutáneas, debido a que la mayor parte de sus acciones se ejercen mediante la inhibición de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Entre estas enfermedades cutáneas, destacan la dermatitis atópica, el acné o las hiperpigmentaciones. Las administraciones tópicas de niacinamida del 2 al 5% ha mostrado eficacia antipigmentante cuando se usa sólo o en combinación con *N*-acetilglucosamina para el tratamiento del melasma. La hiperpigmentación UV-inducida en pacientes de piel clara y asiáticos generalmente se asocia con la *N*-acetilglucosamina, que inhibe la maduración de la tirosinasa, y esta acción sinérgica hace que aumente la eficacia del tratamiento (Hakozaki et al., 2002; Bissett et al., 2004; Kimball et al., 2010; y Davis y Callender, 2010).

Las posibles aplicaciones de la nicotinamida serían: tratamiento de las hiperpigmentaciones faciales, cosméticos que aportan luminosidad al rostro y tratamientos antihiperpigmentantes corporales.

Derivados del ácido retinóico

También se ha demostrado que son relativamente eficaces como tratamiento para la hiperpigmentación, Esquema 6.4 (d). Sin embargo, pueden irritar la piel y hacerla más sensible al sol, lo que, por supuesto, puede empeorar la hiperpigmentación. La relación entre los retinoides y las malformaciones congénitas

también propician que no se recomienden en mujeres embarazadas o lactantes (Fu et al., 2014).

Derivados de la vitamina C

La vitamina C es un medicamento de origen natural con múltiples efectos deseables, con un perfil de seguridad bueno. Su uso se ve aumentado en el fotoenvejecimiento, hiperpigmentación, inflamación de los tejidos y la promoción de la cicatrización del tejido (Matsuda et al., 2008; Draelos, 2007). Existen en la actualidad investigaciones dirigidas hacia la mejora de su penetración en la dermis para estimular la producción de colágeno (Traikovich, 1999, Farris, 2009) y eliminar los radicales libres. La vitamina C, por tanto, es prometedora en el futuro de la práctica dermatológica (Lee et al., 2003; Ebihara et al., 2003; Telang, 2013), Esquema 6.4 (e).

Ácido glicólico

El ácido glicólico o hidroxiacético (ácidos de frutas) (AHA) es de tamaño molecular pequeña, lo que le permite penetrar en la piel más rápidamente a estratos más profundos, Esquema 6.4 (f). Se usan combinaciones con extractos vegetales, colágeno y vitaminas que apoyarán en la reconstrucción celular de este llamado *soft peeling*. El ácido glicólico también permite que otros componentes penetren en la piel con mayor facilidad, por lo que es recomendable acompañarlo en los llamados tratamientos completos (Rizza et al., 2010).

El ácido glicólico, a pesar de su eficacia, necesita ser aplicado bajo la supervisión de un dermatólogo, ya que se pueden generar estragos irreversibles en la dermis del paciente en caso de una mala aplicación o el contacto continuo con la luz solar.

Ácido kójico

Es un producto secundario del proceso de fermentación que se sigue para producir el vino de arroz japonés, sake. Aunque se considera una opción relativamente segura y natural, es un inhibidor bastante débil de la producción de melanina. Su poder despigmentante se deriva de la acción quelante del cobre y de la inhibición de la actividad de la enzima tirosinasa. Se utiliza en una concentración entre el 0.05% y el

4%. Su principal problema es la falta de estabilidad, al oxidarse con facilidad. Por este motivo, últimamente se tiende a utilizar el ácido kójico dipalmitato que es un derivado más estable y es menos irritante que la hidroquinona. Igualmente, se suele utilizar en combinación con otros despigmentantes, como puede ser la hidroquinona o ácido glicólico, para aumentar la eficacia (Davis y Callender, 2010), Esquema 6.4 (g).

Hidroxitirosol

Su alto poder antioxidante se debe a la estructura del anillo de catecol, con dos grupos hidroxilo en posición *orto* adyacente. Además, puede actuar como quelante de metales (Ryan y Robards, 1998). El hidroxitirosol es una molécula estable (Fernández-Bolaños et al., 2002), lo que lo hace idóneo para el uso en preparados cosméticos. También protege la piel del daño producido por los rayos UV (D'Angelo et al., 2005). Ensayos han demostrado que el uso tópico diario del aceite de oliva virgen (que contienen hidroxitirosol), después de la exposición solar puede retrasar y reducir el desarrollo del cáncer de piel inducido por UV (Ichihashi et al., 2000) Esquema 6.4 (h).

Extractos vegetales

Existen extractos vegetales como gayuba, milenrama, kiwi, regaliz, romero, te, manzanilla, etc., que contienen principios activos como luteolina, arbutina, glabridina, hispaglabridina, etc. que se han utilizado tradicionalmente como sustancias despigmentantes. Entre ellos cabe destacar la arbutina.

Arbutina es una sustancia activa natural que se encuentra en las hojas de gayuba, también denominada "uva de oso" (*bearberry*) o *Arctostaphylos uva-ursi*, Esquema 6.4 (i). Muy popular en Japón y en Asia, para atenuar las marcas de embarazo, los melasmas, las marcas asociadas a las quemaduras de sol o para regular la melanogénesis. En aplicación tópica, la arbutina se considera un agente despigmentador de la piel. Se encuentra arbutina también en diversas frutas, como los arándanos, las moras o las peras. Arbutina se usa en una alta variedad de formulaciones cosméticas en Estados Unidos (Davis y Callender, 2010).



Figura 6.18. Gayuba, planta en cuyas hojas se encuentra la arbutina.

Otras sustancias con acción despigmentante utilizadas son la pantenina, ácido caféico, ácido elágico, ácidos grasos insaturados, procisteína, etc.

Los productos despigmentantes comercializados suelen estar formados por la combinación de diferentes compuestos de los mencionados anteriormente, además pueden incorporar hidroxiácidos, que actúan eliminando las células muertas de la piel y favoreciendo de este modo la acción de los agentes despigmentantes. También son frecuentes las asociaciones con sustancias antioxidantes, que neutralizan radicales libres, y la incorporación de filtros solares para proteger la zona a tratar de la radiación solar y evitar la reaparición de manchas.

Se debe tener en cuenta que algunas de las sustancias utilizadas como despigmentantes pueden presentar efectos irritantes sobre la piel, por este motivo se ha prohibido el uso de algunas sustancias con función despigmentante en productos cosméticos, limitándose su utilización en productos de prescripción médica. Los anexos II y III del RD 1599/1997 establecen las sustancias cuyo uso está prohibido en productos cosméticos y las concentraciones y condiciones de uso permitidas.

Además de la utilización de productos despigmentantes tópicos, se puede recurrir al uso de técnicas láser, crioterapia, tratamiento exfoliantes, etc. para eliminar manchas de la piel.

Los datos de eficacia y seguridad en agentes tópicos despigmentantes se muestran en la siguiente Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Resumen de la eficacia y seguridad de agentes tópicos despigmentantes (Shin y Park, 2014b).

Agente tópico	Eficacia	Seguridad	Referencia
Hidroquinona (HQ)	La respuesta es de buena a excelente en el 89.5 % de los pacientes con melasma, en el 75% de los pacientes con hiperpigmentación post-inflamatoria y en el 44.4% de los pacientes con pecas, respectivamente	Se observó irritación local en la mayoría de los pacientes	Amer y Metwalli, 1998
	El 76.9% de los pacientes con melasma mostró mejoría	El 25% de los pacientes experimentaron efectos adversos	Haddad et al., 2003
	El 38.1% de los pacientes con melasma mostro mejoría total mientras que el 57.2% sólo la mostro parcial.	El 28.6% de los pacientes tuvieron efectos adversos	Ennes et al., 2000
Tretinoína	Mejoría o mucha mejoría en el 68% de los pacientes con melasma	En el 88% de los pacientes ocurrieron efectos adversos cutáneos de una gravedad moderada	Griffiths et al., 1993
	Mejoría en el 32% de los pacientes con melasma	En el 67 % de los pacientes ocurrió dermatitis retinoide leve	Kimbrough-Green et al., 1994
Crema de triple combinación (TCC)*	Reducción del 75% en más de 70% de los pacientes con melasma	El 63% de los pacientes experimentaron efectos adversos tales como eritema y descamación	Taylor et al., 2003
	Casi completamente claro en > 90% de los pacientes con melasma	El 57% pacientes experimentaron reacciones adversas	Torok et al., 2005

	Se registró una mejoría del 75% en el 73% de los pacientes usando TCC; sin embargo, se alcanza solo una mejoría del 49% usando HQ	No se vieron diferencias significativas entre la incidencia de efectos adversos en uno u otro grupo (15% en TCC frente al 9% con HQ)	Ferreira Cestari et al., 2007
	Aclaramiento o mejoría significativa en el 49.6% de los pacientes con melasma	El 48.8 % mostró algún efecto adverso	Chan et al., 2008
Arbutina	Los 10 pacientes con melasma mostraron un decrecimiento significativo de los niveles de melanina	No se observaron efectos adversos	Ertam et al., 2008
Ácido azelaico	El 64.8% de los pacientes con melasma registraron un resultado bueno o excelente	Se registraron irritaciones locales en el 11% de pacientes	Baliña y Graupe, 1991
Ácido kójico	Área significativa de melasma y el índice de gravedad fueron reducidos unas 2.403 veces después de 12 semanas de aplicación	Un paciente (3.3%) experimentó eritema y sensación de ardor	Monteiro et al., 2013
4- <i>n</i> -butilresorcinol	El índice de melanina medio se redujo en un 4.87%, después de 8 semanas de aplicación	No se observaron efectos adversos pasadas 8 semanas	Huh et al., 2010a
	El índice de melanina media se redujo en un 7.51%, después de 8 semanas de aplicación	No se observaron acontecimientos adversos durante el estudio	Huh et al., 2010b

*Combinación de: 4% de hidroquinona, 0.05% de treonina y el 0.01% de fluocinolona acetónido.

1.7. Tirosinasa: Aplicaciones biotecnológicas

Tradicionalmente los estudios con tirosinasa se han llevado a cabo utilizando la enzima comercial de *Agaricus bisporus* como modelo en la investigación sobre la melanogénesis y el pardeamiento enzimático de frutas y hortalizas (Jolivet et al., 1998). Actualmente, debido al interés industrial de esta enzima, se ha intentado extender su estudio a enzimas de otras fuentes, sobre todo a tirosinasas microbianas (Octavio de Faria et al., 2007; Ren et al., 2013; Zaidi et al., 2014a).

Tirosinasa tiene distintas aplicaciones como son: la industria alimentaria y cosmética, su utilización en química orgánica para la síntesis de *o*-difenoles (L-dopa), su empleo en la detoxificación de aguas y tierras que contienen fenoles. Determinación de tioles (Peñalver et al., 2002a; García-Molina et al., 2005c) y a través de biosensores en las determinaciones analíticas de fenoles y *o*-difenoles, y finalmente, su uso en la fabricación del pigmento melanina, que puede emplearse como protector frente a la radiación, transportador de drogas, antioxidante y agente antiviral. La enzima bacteriana utilizada fundamentalmente es la tirosinasa recombinante de *Verrucomicrobium spinosum* expresada en *Escherichia coli* (Ren et al., 2013; Zaidi et al., 2014a).

1.7.1. Industria alimentaria y cosmética

El pardeamiento de frutas, hortalizas y champiñones es una gran preocupación para los agricultores y el sector industrial, debido a la alteración que causa en las propiedades organolépticas del producto y la reducción de su vida útil. Por esta razón, se han desarrollado numerosas estrategias con la finalidad de atenuar o eliminar el proceso de pardeamiento enzimático.

La inactivación de tirosinasa se puede llevar a cabo mediante el empleo de elevadas temperaturas, altas presiones, valores de pH extremos, exposición a microondas o utilización de inhibidores enzimáticos como el 4-hexilresorcinol (Kim y Uyama, 2005).

Otra técnica empleada consiste en eliminar del medio de reacción a uno de los dos sustratos de la enzima. Por un lado, los compuestos fenólicos pueden ser eliminados mediante el empleo de especies complejantes y absorbentes, como son los carragenatos, ciclodextrinas, polivinilpirrolidona y quitosanos, o mediante la adición de

enzimas como las fenil-o-metiltransferasas, que actúan sobre estos compuestos fenólicos produciendo su modificación (Billaud et al., 2003). Por otro lado, aunque no es recomendable eliminar totalmente el oxígeno presente, por las desviaciones metabólicas que se pueden producir, sí que puede resultar útil la utilización de atmósferas controladas con un bajo contenido del mismo (Soliva-Fortuny et al., 2001).

También se ha llevado a cabo la reducción de los productos quinónicos producidos, evitando así su polimerización, mediante el empleo de reactivos como sulfito, cisteína, ácido ascórbico y el isómero D de éste, ácido isoascórbico o eritórbito (Billaud et al., 2003; Kim y Uyama, 2005).

Se han preparado nanopartículas de oro (Au) y plata (Ag) usando un extracto de *Artemisia annua*, estas nanopartículas mostraron un gran efecto antibacteriano e inhibidor de la actividad de tirosinasa (Basavegowda et al., 2014). La melanina producida por *Nocardia alba* se puede utilizar para cubrir nanoestructuras de plata que puede ser útil para el envasado de alimentos. El amplio espectro contra los patógenos de alimentos de estas nanoestructuras de plata con melanina la hacen aplicable al envasado y almacenamiento de frutas y alimentos (Kiran et al., 2014).

Los inhibidores de tirosinasa se están desarrollando también en la industria cosmética por su efecto blanqueador de la piel, aunque sólo unos pocos de ellos se llegan a aplicar realmente por razones de seguridad (Kubo et al., 2000). La arbutina y aloesina se utilizan ampliamente como despigmentantes y se utilizan conjuntamente, ya que así producen una inhibición sinérgica de tirosinasa (Jin et al., 1999). Como inhibidores de segunda generación se ha descrito la desoxiarbutina, que inhibe tanto a la actividad monofenolasa como a la difenolasa de forma reversible (Chawla et al., 2008).

Se ha llevado a cabo la síntesis enzimática de ésteres del ácido kójico y se han discutido las ventajas y desventajas sobre sus posibles aplicaciones en cosmética (Lajis et al., 2013).

1.7.2. Tirosinasa inmovilizada

La inmovilización de tirosinasa es interesante puesto que puede tener aplicaciones biotecnológicas como son: la síntesis de *o*-difenoles a partir de monofenoles, la detección de compuestos fenólicos y de inhibidores de la enzima, y también puede ser útil en la descontaminación de aguas, mediante la eliminación de compuestos fenólicos (Octavio de Faria et al., 2007).

El proceso de inmovilización de una enzima, en este caso tirosinasa, en su soporte debe optimizarse para mejorar su rendimiento. Así pues, deben estudiarse parámetros como la concentración de enzima en la disolución empleada para llevar a cabo la inmovilización, el tiempo y el pH de inmovilización, la cantidad de enzima inmovilizada y aspectos relacionados con la naturaleza del soporte y el método de inmovilización utilizado en cada caso (Arica y Bayramoglu, 2004a; Arica et al., 2004b; Marín-Zamora et al., 2005; 2006; Abdullah et al., 2006; Mita et al., 2007; Shao et al., 2007; Tamura et al., 2010; Bayramoglu et al., 2013; de Oliveira et al., 2014; Rodríguez-Sevilla et al., 2014; Saini et al., 2014).

Tras la inmovilización deben estudiarse las características de la enzima inmovilizada: pH, temperatura óptima de catálisis, la estabilidad térmica, el comportamiento durante el almacenado, el efecto de la reutilización, así como el estudio de las constantes cinéticas que presenta la enzima inmovilizada al actuar sobre su sustrato (Arslan et al., 2005; Marín-Zamora et al., 2005; 2006; 2007a; 2007b; Girelli et al., 2007; Asav et al., 2009; Zynek et al., 2011).

La enzima tirosinasa ha sido inmovilizada en un gran número de soportes mediante distintos métodos y técnicas de inmovilización (Durán et al., 2002; Halaouli et al., 2006; Octavio de Faria et al., 2007). El método de inmovilización covalente ha sido uno de los más usados (Durán et al., 2002; Zynek et al., 2011). El reactivo más utilizado en este tipo de inmovilización es glutaraldehído, que forma un puente entre el soporte y la enzima (Aytar y Bakir, 2008). De esta manera, tirosinasa ha sido inmovilizada en microesferas reactivas basadas en metacrilato (Arica y Bayramoglu, 2004a; Arica et al., 2004b), nanopartículas magnéticas ($\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-SiO}_2$) modificadas con grupos amino en su superficie (Liu et al., 2005), y esferas compuestas de quitosano-arcilla (Dinçer et al., 2012). Otros métodos de inmovilización covalente utilizan otro tipo de reactivos como carbodiimidas (Bieganski et al., 2006; Zhou et al., 2007; Wang et al., 2010) o cloruro cianúrico (Wang y Hasebe, 2011).

Nuestro grupo de investigación, el grupo de Enzimología (GENZ), en colaboración con el Grupo de Química de Carbohidratos, Polímeros y Aditivos Industriales (QCPAI), aprovechando la propiedad de que la enzima de *Agaricus bisporus* es muy hidrofóbica, ha llevado a cabo su inmovilización por interacción hidrofóbica sobre ésteres cinámicos de carbohidratos (Marín-Zamora et al., 2005; 2006; 2007a; 2007b). Otros soportes utilizados para la inmovilización por adsorción son: montmorillonita-Al(OH)_x (Naidja et al., 1997), electrodos de carbono (Yaropolov et al., 1995; Moghaddan et al., 2008; Mohammadi et al., 2008) y electrodos de oro modificados (Nakurama et al., 2006).

Otra técnica que ha sido empleada en la inmovilización de tirosinasa ha sido el atrapamiento en geles. Se han utilizado geles de gelatina, alginato y poli(acrilamida) (Munjal y Sawhney, 2002; Shao et al., 2009), películas de sol-gel de sílice (SiO₂) (Wang et al., 2000; Oriero et al., 2011) y de alúmina (Al₂O₃) (Liu et al., 2000; Zejli et al., 2008). La enzima también se ha inmovilizado por adsorción y atrapamiento entre dos capas con el polímero polication poli (cloruro de dialildimetilamonio) (Fiorentino et al., 2010).

Debido a las numerosas aplicaciones biotecnológicas de tirosinasa, su inmovilización sigue siendo objeto de estudio en la actualidad, produciendo un importante número de publicaciones científicas cada año (Bertolino et al., 2011; Niccoluci et al., 2011; Malzahn et al., 2011; Oriero et al., 2011; Sima et al., 2011; Singh, 2011; Algieri et al., 2012; Donato et al., 2012; Xu et al., 2012; Dinçer et al., 2012; Yang et al., 2012).

Existe una gran variedad de sustratos conocidos sobre los que puede actuar la enzima tirosinasa y muchos de ellos han sido estudiados con tirosinasa inmovilizada. Como por ejemplo: 4-*terc*-butilcatecol, dopamina, L-dopa, DL-dopa, D-dopa, L- α -metildopa, DL- α -metildopa, L-isoprenalina, DL-isoprenalina, L-adrenalina, DL-adrenalina, L-noradrenalina, D-noradrenalina, L-tirosina, DL-tirosina, D-tirosina, hidroxianisol, 4-metilfenol, 4-*terc*-butilfenol, ácido 4-hidroxifenilacético y ácido 4-hidroxifenilpropiónico (Marín-Zamora et al., 2007a; 2007b, 2009; García-Ruiz et al., 2009), catecol (Arslan et al., 2005; Nakamura et al., 2006; Zhang et al., 2009), *p*-cresol (Zhao et al., 2009; Yu et al., 2010), L-tirosina (Arica y Bayramoglu, 2004a; Arica et al., 2004b; Sima et al., 2011), fenol (Gu et al., 2009; Chen y Jin, 2010; Oriero et al., 2011; Dinçer et al., 2012), *o*-aminofenol (Cabaj et al., 2010), 4-clorofenol y 4-cloro-3-metilfenol (Hanifah et al., 2009).

Al realizar el estudio cinético de la actividad enzimática frente a la concentración de sustrato, se pueden determinar los valores aparentes de la constante de Michaelis, K_m^{ap} , y la velocidad máxima, V_{max}^{ap} . Los valores de K_m^{ap} mostrados por tirosinasa inmovilizada normalmente experimentan variaciones respecto a los obtenidos por tirosinasa en disolución, siendo el soporte y método de inmovilización empleados importantes factores a tener en cuenta (Chibata, 1978; Arroyo, 1998). Es habitual encontrar que los valores de K_m^{ap} de tirosinasa inmovilizada para un determinado sustrato sean mayores que los mostrados por dicha enzima en disolución para el mismo sustrato (Arica y Bayramoglu, 2004a; Arica et al., 2004b; Arslan et al., 2005; Yildiz et al., 2005; Nakamura et al., 2006; Marín-Zamora et al., 2007a, 2007b; Shao et al., 2007; Tembe et al., 2008; Sima et al., 2011). También se ha descrito una disminución del valor de K_m^{ap} , mostrando la enzima inmovilizada una mayor afinidad aparente por el sustrato (Rijiravanich et al., 2004; Marín-Zamora et al., 2006; Wang y Hasebe, 2009; Zhang et al., 2009; Sánchez-Paniagua et al., 2010).

Los valores de V_{max}^{ap} dependen de la cantidad de enzima inmovilizada, por lo que la comparación de la actividad de tirosinasa sobre diversos sustratos sólo debe hacerse cuando la enzima ha sido inmovilizada sobre el mismo soporte y con la misma técnica y condiciones de inmovilización. Para determinar las variaciones en la actividad enzimática cuando tirosinasa es inmovilizada sobre distintos soportes y/o con distintas técnicas de inmovilización y es necesario volver a obtener los valores de las constantes catalíticas (k_{cat}^{ap}) y comparar con la actividad de tirosinasa en disolución.

En muy pocos trabajos de enzimas inmovilizadas se da el valor de la constante catalítica. No obstante, sí se han determinado los valores de k_{cat}^{ap} para tirosinasa inmovilizada sobre diversos ésteres cinámicos de carbohidratos (Marín-Zamora et al., 2007a; 2007b) y para tirosinasa complejada, no covalentemente, a polibreno en una mezcla de disolvente agua/etanol (Shipovskov y Levashov, 2003). También se han determinado los valores de k_{cat}^{ap} para otras enzimas, como anhidrasa carbónica inmovilizada sobre octil-sefarosa (Hosseinkhani y Nemat-Gorgani, 2003), mioglobina inmovilizada sobre fosfonatos de circonio (Belleza et al., 2004) y lacasa inmovilizada en Eupergit C (Lloret et al., 2012).

La inmovilización de tirosinasa puede ser muy útil en la producción de L-dopa y otros *o*-difenoles, en la detección de compuestos fenólicos y de algunos inhibidores de

la enzima, y en los procesos de descontaminación de aguas mediante eliminación de compuestos fenólicos (Octavio de Faria et al., 2007; Marín-Zamora et al., 2009; Min et al., 2015), tal y como se describe a continuación.

1.7.2.1. Obtención de *o*-difenoles

La terapia de elección para el tratamiento del Parkinson es el L-dopa. Por este motivo, se calcula que se consumen cada año cerca de 250 toneladas de este medicamento. El L-dopa, mayoritariamente, se genera mediante síntesis química a partir de vanillina e hidantoína, en un proceso muy laborioso que requiere de ocho pasos consecutivos (Reinhold et al., 1987). Una de las alternativas estudiadas es la obtención de L-dopa a partir de L-tirosina, mediante catálisis enzimática con tirosinasa inmovilizada. Para ello, el método clásico utilizado consiste en hacer actuar tirosinasa en un medio de reacción compuesto por tampón fosfato y concentraciones iguales de L-tirosina y ácido ascórbico. Así, se ha llevado a cabo la producción de L-dopa mediante tirosinasa inmovilizada en naylon (Pialis et al., 1996), quitosano (Carvalho et al., 2000; Chuang et al., 2005), ceolita (Seetharan y Saville, 2002), poliestireno modificado (Ho et al., 2003), gel Cu-alginato (Ates et al., 2007), agar activado (Norouzian et al., 2007) y membranas tubulares de poliamida (Algieri et al., 2012). En todos estos estudios los rendimientos conseguidos en la obtención de L-dopa son bastante bajos. En un artículo de revisión sobre el potencial biotecnológico de tirosinasa (Octavio de Faria et al., 2007), se afirma que en los intentos realizados para producir L-dopa, mediante tirosinasa inmovilizada, las productividades conseguidas son bajas, del rango de 1.44 a 54 mg/l/h (Pialis et al., 1996; Carvalho et al., 2000; Seetharan y Saville, 2002; Ho et al., 2003; Ates et al., 2007).

Este bajo rendimiento de tirosinasa se atribuye principalmente a dos factores (Octavio de Faria et al., 2007):

1. En presencia de ácido ascórbico, la conversión de L-tirosina en L-dopa es incompleta (menos del 30% es consumida durante el proceso).
2. En este sistema de producción, parte del L-dopa producido vuelve a reaccionar con tirosinasa y produce *o*-dopaquinona. Esta dopaquinona cicla espontáneamente a leucodopacromo, el cual mediante una reacción de oxidación/reducción con una segunda molécula de dopaquinona regenera una molécula de L-dopa, pero también genera una molécula de dopacromo, que polimeriza espontáneamente, dando lugar a la formación de melaninas.

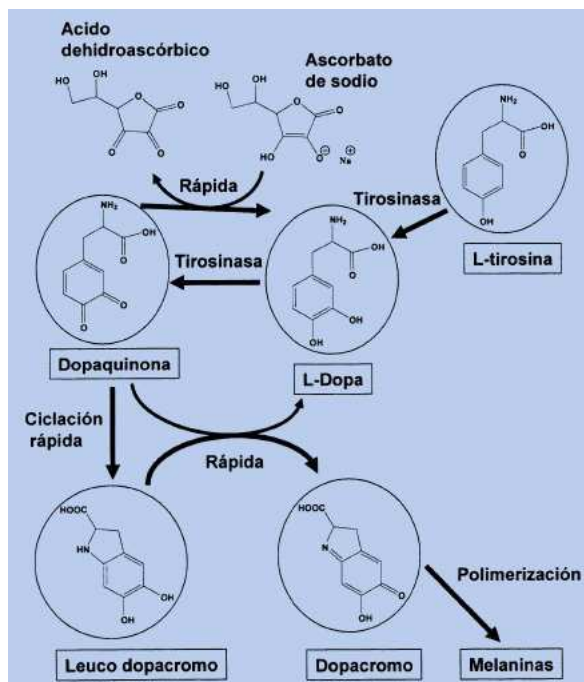


Figura 7.1. Esquema simplificado de la acción de tirosinasa sobre L-tirosina y L-dopa en presencia de ácido ascórbico (Marín-Zamora et al., 2009).

Se puede añadir ácido ascórbico al medio, el cual reduce o-dopaquinona a L-dopa en una reacción no enzimática instantánea. Sin embargo, se necesitarían elevadas cantidades de ácido ascórbico para obtener rendimientos aceptables en la obtención de o-difenol, ya que se entraría en una dinámica de ciclos fútiles (el o-difenol, obtenido por reducción química de la o-quinona, compite con el monofenol para ser oxidado de nuevo por la enzima, lo que supone que parte de él volverá a ser oxidado a o-quinona y tendrá que volver a ser reducido, antes de que nuevas moléculas de monofenol sean hidroxiladas en *orto*, para aumentar la concentración final de o-difenol). Esta dinámica de ciclos fútiles, a su vez, facilitaría la inactivación suicida de la enzima. Asimismo, se ha demostrado que altas concentraciones de ácido ascórbico inhiben la actividad monofenolasa y difenolasa de tirosinasa y, además, inactivan irreversiblemente a la enzima (Ros et al., 1993a; 1995; Muñoz-Muñoz et al., 2009a).

Los datos obtenidos, utilizando el método descrito anteriormente (Algieri et al., 2012; Donato et al., 2012), están en concordancia con los bajos rendimientos descritos anteriormente (Octavio de Faria et al., 2007).

Se ha empleado tirosinasa inmovilizada sobre membranas de zeolita (Donato et al., 2012) y de poliamida (Algieri et al., 2012), con rendimientos en la obtención de L-dopa de aproximadamente el 5 y 10 %, respectivamente. También se han empleado agregados de tirosinasa obtenidos por entrecruzamiento (Xu et al., 2012), para la obtención de L-dopa, en un medio constituido por tampón fosfato y una concentración de ácido ascórbico 7,5 veces superior a la de L-tirosina, lográndose en este caso rendimientos del 53 %. Además del L-dopa pueden obtenerse otros *o*-difenoles de considerable interés por su actividad biológica y antioxidante.

Recientemente se ha publicado la síntesis de L-dopa con buenos rendimientos, mediante una técnica electroenzimática donde tirosinasa está inmovilizada en un electrodo, que permite la reducción de la *o*-dopaquinona a L-dopa sin ser necesaria la adición de ácido ascórbico (Min et al., 2010). También se ha descrito la inmovilización de tirosinasa en resinas epoxi Eupergit C250L y posterior deposición de varias películas de polielectrolito sobre la enzima, utilizando la técnica Layer-by-Layer (Guazzaroni et al., 2012a, 2012b), que ha sido aplicada a la síntesis de una serie de catecoles (distintos a L-dopa) en medio acuoso o añadiendo diclorometano como extractor en contacto con el medio acuoso.

La técnica layer-by-layer también se ha empleado en la inmovilización de tirosinasa en nanotubos de carbón para poder trabajar en medio orgánico (CH_2Cl_2) en la obtención de *o*-difenoles a partir de monofenoles (Subrizi et al., 2014).

Últimamente se ha avanzado en la obtención de L-dopa a partir de L-tirosina, mediante el empleo de microorganismos (Surwase y Jadhav, 2011; Surwase et al., 2012).

En nuestro Grupo de Investigación (GENZ) se ha llevado a cabo la producción de *o*-difenoles, mediante tirosinasa inmovilizada, utilizando como medio de reacción tampón borato (Marín-Zamora et al., 2009; García-Ruiz et al., 2009). El anión borato en presencia del *o*-difenoel da lugar a un complejo estable borato-difenoel (Mochizuki et al., 2002; Yamazaki e Itoh, 2003; Waite, 1984). Este hecho permite mejorar la acumulación de *o*-difenoel en el medio, ya que el anión borato compleja al *o*-difenoel formado, impidiendo la oxidación de éste por parte de tirosinasa, logrando así minimizar la entrada en la dinámica de ciclos fútiles comentada anteriormente. Además, al medio de reacción se añade hidroxilamina o una concentración inicial de *o*-difenoel para facilitar que la forma metatirosinasa pase a desoxitirosinasa (cerrando así el ciclo catalítico). También es necesaria la presencia de ácido ascórbico en exceso

para reducir la *o*-quinona generada a *o*-difenoil. En este caso el ácido ascórbico no inactiva prácticamente a la enzima, porque forma a su vez un complejo con el borato (Obi et al., 1998; Roomi y Tsao, 1998). Siguiendo esta metodología, se sintetizaron *o*-difenoiles de diferentes características y cargas: 4-*terc*-butilcatecol, 4-metilcatecol, 4-metoxicatecol, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y L-dopa, a partir de sus monofenoiles correspondientes (4-*terc*-butilfenol, 4-metilfenol, 4-metoxifenol, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico, ácido *p*-hidroxifenilacético y L-tirosina). Los rendimientos conseguidos fueron muy altos (88-96 %) en todos los casos. En el caso de la obtención de L-dopa se obtuvo por primera vez, mediante tirosinasa inmovilizada, un rendimiento del 90 % en un proceso en continuo, escalable industrialmente.

El grupo de investigación GENZ, en colaboración con el Grupo de Química de Carbohidratos, Polímeros y Aditivos Industriales (QCPAI), consiguió patentar el método de obtención de *o*-difenoiles utilizando tirosinasa de champiñón inmovilizada sobre soportes de cinamato (García-Ruiz et al., 2009).

En la Tabla 7.1 se muestra, a modo de comparación, los distintos rendimientos obtenidos con tirosinasa inmovilizada en diferentes soportes. Nótese el alto rendimiento obtenido con el método desarrollado por nuestro Grupo (Marín-Zamora et al., 2009).

Tabla 7.1. Producción biocatalítica de L-dopa por la acción de tirosinasa inmovilizada.

Soporte de inmovilización	Tipo de reactor	Sustrato convertido (%)	Referencias
Cu-alginato	En lecho	1.8	(Ates et al., 2007)
Membrana 6,6 nylon	En lecho	60	(Pialis et al., 1996)
Zeolita	En lecho	44.9	(Seetharam y Saville, 2002)
CLEA*	En lecho	53	(Xu et al., 2012)
SWNT**	En lecho	95.9	(Min et al., 2010)
SWNT**	En lecho	77.7	(Min et al., 2013)
Adsorción sobre polímeros de ésteres cinamoilados de sorbitol	Reactor en continuo	88-96%	(Marín-Zamora et al., 2009)

* Agregados de enzima entrecruzados

** Nanotubos de pared simple

1.7.2.1.1. Producción biotecnológica de L-dopa

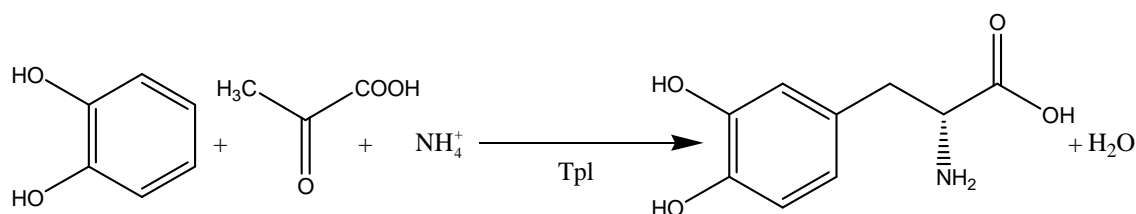
Recientemente se ha publicado una revisión sobre la producción biotecnológica de L-dopa (Min et al., 2015). La producción de L-dopa se lleva a cabo fundamentalmente mediante hidrogenación asimétrica; sin embargo, este proceso tiene limitaciones tales como una pobre velocidad de conversión y una enantioselectividad baja (Sayyed y Sudalai 2004; Valdes et al., 2004). Teniendo en cuenta lo anterior, se están desarrollando métodos biotecnológicos usando microorganismos con actividades tirosinasa, tirosina fenol liasa o *p*-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa. Actualmente Ajinomoto Co. Ltd comercializa la producción

biotecnológica de L-dopa por *Erwinia herbicola* desde 1993, mediante una cepa con alta producción de tirosina fenol liasa (Iizumi et al., 1991).

Los métodos biotecnológicos de producción de L-dopa con microorganismos se pueden clasificar en tres grupos: los basados en tirosinasa, tirosina fenol liasa o *p*-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa. Las dificultades de los métodos de fermentación son dos: (1) requieren más de diez días, además del período inicial de cultivo de las células, y (2) es difícil purificar el L-dopa a partir de la mezcla.

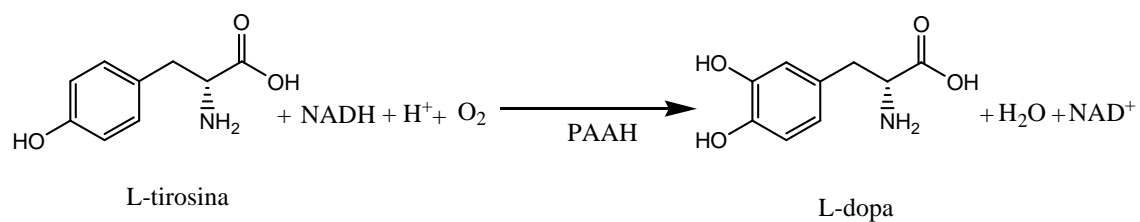
Los métodos que utilizan fermentaciones con microorganismos ricos en tirosinasa (E.C.1.14.18.1) han propuesto al hongo *Acremonium rutilum* como un modelo (Krishnaveni et al., 2009) y se basan en las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa.

Otros métodos utilizan microorganismos ricos en la enzima tirosina fenol liasa (E.C. 4.1.99.2). En el Esquema 7.2 se muestra la acción de tirosina fenol liasa. La reacción catalizada por tirosina fenol liasa es reversible y, por lo tanto, puede formarse L-dopa si se sustituye fenol por catecol (Esquema 7.2). Se utiliza el gen de *E. herbicola* que codifica a Tpl y se expresa en *E. coli* (Katayama et al., 2000; Koyanagi et al., 2005).



Esquema 7.2. Ilustración esquemática de la conversión de piruvato, amonio y catecol en L-dopa por tirosinasa fenol liasa (Tpl) (Min et al., 2015).

Lee y Xun, 1998, han propuesto que L-tirosina puede ser convertida en L-dopa por la reacción descrita en el Esquema 7.3, mediante la acción de la *p*-hidroxifenilacetato hidroxilasa (E.C.1.14.14.9), utilizando la cepa de *E. coli* WATCC11105. La aplicación de este método se ha llevado a cabo recientemente (Muñoz et al., 2011).



Esquema 7.3. Producción de L-dopa desde L-tirosina por *p*-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa (PAAH) (Min et al., 2015).

En la Tabla 7.2 se muestra un esquema comparativo entre los distintos métodos de obtención de L-dopa, con sus ventajas e inconvenientes.

Tabla 7.2. Comparación entre varias aproximaciones para la producción de L-dopa (Min et al., 2015).

	Proceso químico	Fermentación microbiana	Conversión biocatalítica
Método/catalizador	Hidrogenación asimétrica Catalizador metálico (Complejo de Rb)	Cultivo de células (Ejemplo: <i>Erwinia herbicola</i>) Tirosinasa Tirosina fenol-liasa p-hidroxiacetato 3-hidroxilasa	Enzima inmovilizada Tirosinasa
Ventajas	Proceso disponible comercialmente	Proceso disponible comercialmente Mayor concentración de sustrato	Proceso simple La enzima es reutilizable
Desventajas	Proceso complejo Bajo rendimiento Baja enantioselectividad	Purificación difícil a partir de los medios de cultivo Tiempo de operación largo Baja velocidad de conversión/ productividad	Subsiguiente oxidación a o-dopaquinona Reactivo reductor/ poder reductor eléctrico.

1.7.2.2. Biosensores enzimáticos

Las aguas residuales pueden contener residuos fenólicos procedentes de industrias textiles, químicas, petroquímicas y papeleras, entre otras (Yamada et al., 2005). Estos compuestos fenólicos pueden ser contaminantes también de suelos y alimentos. La legislación medioambiental es cada vez más estricta y se requieren métodos de análisis sencillos y precisos para detectar los niveles de compuestos fenólicos en aguas. Los métodos empleados tradicionalmente para llevar a cabo estos análisis han sido métodos espectrofotométricos y cromatográficos. Actualmente, el campo de los biosensores enzimáticos está siendo fruto de numerosos trabajos de investigación en este sentido. Una de las principales ventajas de los biosensores es la posibilidad de la determinación *in situ* de los compuestos que se requiere analizar.

Se han descrito numerosos biosensores para la determinación de catecol basados en tirosinasa inmovilizada (Zhao et al., 2009; Fiorentino et al., 2010; Apetrei et al., 2011; Han et al., 2012), que permiten determinar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el medio. Para ello, se recurre a la medida del consumo de oxígeno por parte de la enzima al llevar a cabo la oxidación catalítica o a la reducción electroquímica de la *o*-quinona liberada por la enzima como producto de reacción (Tembe et al., 2009). Además, los biosensores de tirosinasa también son utilizados para la determinación de sustancias inhibitoras de la actividad catalítica de esta enzima, como son los compuestos organofosforados (Vidal et al., 2006), el ácido benzoico (Kochana et al., 2012) y el ión fluoruro (Asav et al., 2009).

Algunos de los numerosos biosensores basados en tirosinasa inmovilizada se describen a continuación. La determinación de catecol se ha llevado a cabo, por ejemplo, mediante un biosensor basado en tirosinasa inmovilizada en una película compuesta de quitosano, carbón y nanopartículas de níquel (Yang et al., 2012), a través de otro biosensor compuesto de un electrodo de óxido de grafeno enlazado a nanopartículas de oro recubiertas de tirosinasa (Song et al., 2011), y mediante un biosensor basado en tirosinasa inmovilizada sobre nanopartículas de oro encapsuladas por un dendrímero (Singh, 2011).

La detección de bisfenol A ha sido posible gracias a un biosensor de tirosinasa basado en nanografeno (Wu et al., 2012). También se ha llevado a cabo la detección de norepinefrina, mediante tirosinasa inmovilizada en nanotubos de carbono (Mohammadi et al., 2011).

Además, debido a su efecto inhibitorio, se ha llevado a cabo la determinación de sustancias como el ácido benzoico, mediante un biosensor basado en tirosinasa adsorbida sobre fosfato de calcio (Sánchez-Paniagua y López-Ruiz, 2011) y también el ión Cr (III), mediante un biosensor constituido por un electrodo con tirosinasa atrapada en polipirrol obtenido por electropolimerización (Domínguez-Renedo et al., 2004).

Se han diseñado biosensores con tirosinasa inmovilizada, que permiten determinar mediante voltametría diferencial de pulso, hidroquinona y catecol al mismo tiempo, con unos límites de detección de $5 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ y $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ respectivamente (Tang et al., 2013). En la misma línea de la utilización de tirosinasa inmovilizada, se ha diseñado un biosensor para la determinación de epinefrina, con un límite de detección de $2.54 \mu\text{M}$ (Apetrei et al., 2013). Se ha puesto a punto un método amperométrico de determinación de catecol utilizando tirosinasa inmovilizada y aplicando la técnica “capa por capa”, “layer-by-layer”, (LbL) y se ha aplicado a la determinación de catecol en muestras de té (Karim et al., 2014). Se ha descrito el diseño de un biosensor barato utilizando el champiñón liofilizado (*Agaricus bisporus*) para la determinación de fenol, utilizando el electrodo de oxígeno de Clark (Silva et al., 2014). Además, se han descrito biosensores compuestos por dos enzimas, por ejemplo: lacasa y tirosinasa para la determinación de carbamatos (Oliveira et al., 2014)

Otra aplicación de los biosensores en los que participa tirosinasa consiste en la cuantificación electroquímica de la capacidad antioxidante de plantas medicinales (Rodríguez-Sevilla et al., 2014).

1.7.2.3. Descontaminación de aguas

Los compuestos fenólicos son importantes contaminantes orgánicos, que confieren al agua un mal sabor y un mal olor, además de ser muy tóxicos. La contaminación de medios acuosos naturales por presencia de fenoles se produce, principalmente, por el vertido de aguas residuales de industrias de pintura, carbón, insecticidas, fármacos, curtidos y petróleo. La supresión de compuestos fenólicos en los vertidos industriales es un problema prioritario. Algunos de los métodos empleados para llevar a cabo la descontaminación de aguas, liberándolas de compuestos fenólicos, consisten en la extracción con disolventes, oxidación química, degradación microbiana o utilización de enzimas (Octavio de Faria, 2007). La enzima tirosinasa ha sido utilizada en la eliminación de fenoles y biorremediación tanto en disolución, como

inmovilizada a un soporte, con la consiguiente ventaja de su posible reutilización. Generalmente, los productos *o*-quinónicos formados por la oxidación enzimática dan lugar a reacciones de polimerización, obteniéndose compuestos insolubles que pueden ser eliminados por filtración o precipitación.

Se han utilizado extractos de alcachofa (*Cynara scolymus*) ricos en peroxidasa y polifenoloxidasa, para la eliminación de compuestos fenólicos en aguas (López-Molina et al., 2003). El aislamiento y la purificación de peroxidasa de *Cynara scolymus* dió lugar a una patente (Rodríguez-López et al., 2000b) por parte de nuestro Grupo de Investigación, y la aplicación de un extracto de alcachofa para la descontaminación de aguas residuales, dió lugar a otra patente (Rodríguez-López et al., 2000c).

Se han utilizado agregados de tirosinasa entrecruzados. Con estos agregados se obtienen buenos resultados en la eliminación de fenoles (*p*-metilfenol, *p*-clorofenol, fenol y bisfenol) de aguas residuales (Xu y Yang, 2013). Además, también se ha utilizado tirosinasa para oxidar distintos fenoles: fenol, 4-metilfenol, 4-metoxifenol y 4-clorofenol. En este caso, actuando la enzima junto con un polímero de quitosano se pueden retirar los compuestos quinónicos originados tras su polimerización (Saitoh et al., 2011).

Recientemente se ha empleado tirosinasa, inmovilizada covalentemente sobre esferas de quitosano-arcilla, para la eliminación de fenol (Dinçer et al., 2012). También se ha logrado la biodegradación de una serie de bisfenoles, mediante un reactor que contiene tirosinasa inmovilizada sobre esferas de poliacrilonitrilo (Niccolucci et al., 2011). La eliminación de alquilfenoles puede conseguirse mediante un sistema formado por dos columnas, la primera rellena de una resina intercambiadora de iones sobre la que se ha inmovilizado covalentemente la enzima, y la segunda, rellena de esferas de quitosano (entrecruzado con epíclorhidrina) que adsorben las quinonas producto de la reacción catalizada por tirosinasa (Tamura et al., 2010). Otro ejemplo de aplicación de tirosinasa en biorremediación, ha sido la utilización de tirosinasa inmovilizada sobre un soporte compuesto por quitosano-alginato para la eliminación de fenol en un 92 % (Ensuncho et al., 2005). Se ha conseguido la eliminación de naftoles y dihidroxinaftalenos mediante el uso de tirosinasa de champiñón y quitosano (Kimura et al., 2014).

Además, se ha descrito la utilización de tirosinasa sin purificar, la cual actúa muy eficazmente en células completas de *Agaricus bisporus* atrapadas en quitosano. La preparación es activa durante seis meses (Kampmann et al., 2014).

Por último, se han diseñado agregados de una combinación de tirosinasa y lacasa, dos proteínas con cobre que utilizan oxígeno, y que actuando de forma conjunta, consiguen eliminar paracetamol eficientemente de muestras de agua que lo contienen (Ba et al., 2014).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo fundamental de esta Memoria consiste en profundizar en el mecanismo de acción de la tirosinasa. Se centra la atención de este estudio sobre la actividad monofenolasa y se profundiza en el proceso de inactivación suicida. Se investiga la aportación de cada una de las actividades monofenolasa y difenolasa en dicho proceso. Se aborda la caracterización cinética de monofenoles de interés fisiológico.

2.2. Objetivos específicos

- Profundizar en el mecanismo cinético de actuación de la enzima en sus actividades monofenolasa y difenolasa.
- Estudiar la hidroxilación de umbeliferona a esculetina en la ruta de biosíntesis de cumarinas.
- Establecer una metodología para investigar si un monofenol es inhibidor o sustrato alternativo de la enzima con la ayuda del peróxido de hidrógeno.
- Diferenciar las actividades monofenolasa y difenolasa en su implicación en el proceso de inactivación suicida.
- Profundizar en el estudio del mecanismo de inactivación suicida de la enzima en su acción sobre *o*-difenoles mediante la determinación del efecto isotópico generado en un medio deuterado.
- Estudiar y analizar los procesos de catálisis e inactivación en la acción de tirosinasa sobre tres tipos de sustratos: *o*-difenoles, *o*-aminofenoles y *o*-fenilendiaminas.
- Estudiar la acción de tirosinasa sobre hidroxihidroquinona en los procesos de catálisis e inactivación.
- Estudiar la reacción de tirosinasa con hidroquinona, un monofenol, utilizado como despigmentante.
- Caracterizar cinéticamente a hidroquinona como un sustrato de tirosinasa con la ayuda del peróxido de hidrógeno.

- Estudiar la influencia de ácido ascórbico sobre el proceso de hidroxilación de hidroquinona por tirosinasa.
- Caracterizar cinéticamente a hidroquinona como un sustrato de tirosinasa con la ayuda de cantidades catalíticas de o-difenol y ácido ascórbico.

Materiales

y

Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y materiales

3.1.1. Reactivos

Los distintos monofenoles, o-difenoles y demás productos químicos utilizados para la elaboración de esta Memoria, fueron obtenidos de: Sigma (Madrid, España): L-tirosina, L-dopa, umbeliferona, esculetina, sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), ácido ascórbico (AH₂), β-nicotinamida adenina dinucleótico reducido (NADH), catecol, 4-clorocatecol, 4-metilcatecol, 4-etilcatecol, 4-*tert*-butilcatecol (TBC), 4-formilcatecol, 4-nitrocatecol, 2-aminofenol, 2-amino-4-metilfenol, 2-hidroxi-4-metilanilina, 2-hidroxi-4-carboxianilina, 2-amino-4-carboxifenol, 4-metoxi-1,2-fenilendiamina, 4-metil-1,2-fenilendiamina, 4-fluoro-1,2-fenilendiamina, 4-cloro-1,2-fenilendiamina, 4-bromo-1,2-fenilendiamina, ²H₂O, arbutina, hidroquinona, α-naftol, β-naftol, guayacol, timol, carvacrol, eugenol, isoegenol, 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona clorhidrato (MBTH), deferoxamina, hidroxihidroquinona (HHQ), fenol, 4-*tert*-butilfenol (TBF). Todos los sustratos fenólicos utilizados se disolvieron en ácido fosfórico diluido (0.15 mM) para prevenir su autooxidación, excepto umbeliferona que fue disuelta en 2 mM de tampón fosfato a pH 6.8. En todos los ensayos se utilizó agua purificada tipo I (18 MΩ/cm) gracias a un sistema de ósmosis inversa, electrodiálisis y, por último, desionización por resinas de intercambio iónico con un sistema Milli-RX + Milli-Q Reference (Millipore Corp., Bedford, USA).

3.1.2. Enzimas

3.1.2.1. Tirosinasa

A. Purificación de tirosinasa de champiñón

Tirosinasa de champiñón (4276 U/mg de proteína) fue suministrada por Sigma (Madrid, España) y purificada por medio de un método modificado del propuesto por Duckworth y Coleman (1970). Se disolvieron 500 mg del preparado, con un 5% de pureza (Robb, 1984), en 25 mL de tampón fosfato 0,1 M pH 7.0 y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 hora a 4°C. A continuación, se procedió a la

purificación de la enzima, mediante precipitación con sulfato amónico neutralizado a pH 7.0.

En primer lugar, se llevó el extracto hasta una concentración de sulfato amónico de 36% y se mantuvo durante 1 hora a 4 °C. Tras la hora, el extracto se centrifugó a 55000 g durante 1 hora y se separó el precipitado desechándose ya que no mostró ninguna actividad enzimática. El sobrenadante se precipitó otra vez con sulfato amónico al 55% (pH 7.0) y el extracto se dejó durante 1 hora a 4 °C tras lo cual se volvió a realizar otra centrifugación como la descrita anteriormente. El precipitado, que contenía el 90% de unidades enzimáticas de tirosinasa de partida, se disolvió en 4 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 7.0.

La disolución de tirosinasa de champiñón mostró una coloración marrón oscura debida, en parte, a la formación de melaninas. Para eliminar estos pigmentos del extracto, éste se sometió a varios procesos. En primer lugar, se filtró por una columna de fosfato cálcico (Sigma, España) (80 mg/ml, pH 6.4) lo que llevó a una clarificación de la disolución sin apenas perder concentración enzimática. A continuación, la disolución se pasó por una columna de Sephadex G-100 (2.0 x 30 cm) (Pharmacia, Upsala, Suecia) equilibrada con tampón fosfato 0.01 M, pH 7.0.

Las fracciones que mostraron actividad tirosinasa fueron purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico en un FPLC utilizando una columna Mono-Q HR 5/5 equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 7.0 y desplazada con cloruro sódico (gradiente 0-0,5 M). Por último, a la enzima purificada se le eliminaron sales gracias a otra columna G-25 (Pharmacia, Upsala, Suecia) en agua ultrapura desionizada y se almacenó en nitrógeno líquido. La concentración enzimática se determinó utilizando el valor de peso molecular de 120000 Dalton asignado a tirosinasa de champiñón en la bibliografía (Jolley et al., 1974).

B. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas en los distintos extractos obtenidos se llevó a cabo con el método de Bradford (1976), utilizando el kit comercial de Bio-Rad[®], con albúmina de suero bovino como estándar. El método de Bradford mejora al usado por Lowry (Lowry et al., 1951), uno de los más extendidos, en que utiliza solo 1 reactivo y solo necesita 5 minutos para cada ensayo mientras que el de Lowry necesita 3 reactivos y de 30 a 40 minutos en cada ensayo. Además, el método de Bradford no tiene la mayoría de interferentes que posee el de Lowry.

Este método de Bradford se basa en que, cuando una disolución ácida de azul Coomassie G-250 se une a una proteína, cambia la longitud de onda en su absorción

desde 465 nm hasta 595 nm. La muestra se deja incubar 5 minutos con el azul Coomassie y se lee la absorbancia a 595 nm. El resultado se introduce en la recta de calibrado previamente realizada con la albúmina de suero bovino. Así, se determinó la concentración proteica que tenemos en cada fracción. Este ensayo se hace por cuadruplicado a tres concentraciones de proteína diferentes manteniéndose la linealidad. Así, se eliminó el error típico en las medidas y reflejando valores sin desviaciones significativas en las repeticiones.

C. Generación de oxirosinasa y desoxirosinasa

La especie enzimática oxirosinasa (E_{ox}) se generó añadiendo 2 μ M de H_2O_2 a la enzima nativa. En esta enzima nativa, la forma metatirosinasa (E_m) se transforma en E_{ox} . Una vez generada toda la E_{ox} , se pasó una corriente de nitrógeno a la disolución y así se convirtió toda la enzima a desoxirosinasa (E_d), ya que se desplaza el equilibrio $E_{ox} \rightleftharpoons E_d + O_2$ hacia la derecha (Jolley et al., 1974; Jackman et al., 1992; Muñoz-Muñoz et al., 2010a).

D. Generación de metatirosinasa

La especie enzimática metatirosinasa se generó a partir de la enzima nativa mediante 2 métodos:

- a) Añadir una concentración de catalasa (2 μ M). Así, el equilibrio $E_{ox} \rightleftharpoons E_m + H_2O_2$ se desplaza hacia la derecha ya que elimina el H_2O_2 del medio gracias a la reacción $2H_2O_2 + \text{catalasa} \rightarrow O_2 + 2H_2O$. Con esto, en la disolución de enzima nativa, E_{ox} se transforma en E_m .
- b) Añadir 2 μ M de H_2O_2 a la enzima nativa, de tal manera que la E_m se transforma en E_{ox} . Posteriormente, se añade 2 μ M de catalasa al medio y ocurre el mismo paso descrito anteriormente (Jolley et al., 1974; Jackman et al., 1992; Muñoz-Muñoz et al., 2010a).

E. Evaluación de las especies enzimáticas metatirosinasa, desoxirosinasa y oxirosinasa en una preparación enzimática de tirosinasa

Es conocido que en cualquier disolución de tirosinasa de cualquier fuente, existen tres formas enzimáticas, E_{ox} , E_m y E_d (Jackman et al., 1992). Para poder determinar la proporción de cada una de estas formas enzimáticas en una preparación, se propone un método cinético basado en la inactivación que sufre tirosinasa por 2-mercaptoetanol (Aasa et al., 1978). Esta inactivación ocurre en distintas escalas de tiempo puesto que la constante de velocidad de inactivación es

diferente para E_{ox} , E_m y E_d (0.014 s^{-1} para E_{ox} , $4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para E_m y $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para E_d). Este método es válido ya que las constantes de inactivación para E_{ox} y E_m están muy diferenciadas en el tiempo (tres órdenes de magnitud) (Muñoz-Muñoz, et al., 2009a).

3.1.2.2. Superóxido dismutasa

Superóxido dismutasa (SOD) (2500 U/mg de proteína) fue suministrada por Sigma (Madrid, España).

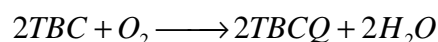
3.1.2.3. Lacasa

Lacasa de *Agaricus Bisporus* (5.1 U/mg de proteína) se compró de Fluka (Madrid, España).

3.2. Equipos y métodos

3.2.1. Ensayos oximétricos

Los ensayos oximétricos se realizaron utilizando un oxímetro Hansatech DW (King's Lynn Norfolk, UK), que mide el consumo de oxígeno. Este oxímetro se basa en un electrodo tipo Clark, recubierto por una membrana de teflón de $12.5 \mu\text{M}$. La muestra se agitó continuamente y la temperatura se mantuvo constante a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Este electrodo está conectado a una unidad amperométrica a su vez controlada por un ordenador PC-compatible. En primer lugar, se ajusta la concentración máxima y mínima de O_2 . Para ajustar el máximo, se considera que el agua está saturada de oxígeno con 0.26 mM del mismo. Posteriormente, para ajustar el mínimo, se burbujeó una corriente de N_2 en la cámara de reacción para eliminar el O_2 del agua, llegando en unos minutos al cero de oxígeno. El electrodo fue calibrado "químicamente" mediante el método 4-*tert*-butilcatecol/tirosinasa, basado en la oxidación de 4-*tert*-butilcatecol (TBC) por oxígeno catalizada por tirosinasa (Rodríguez-López et al., 1992a). Tirosinasa requiere una molécula de oxígeno para oxidar dos moléculas de TBC a dos moléculas de *o-tert*-butilquinona (TBCQ), de acuerdo con la estequiometría:



Para este tipo de calibración química, se realizaron tres disoluciones de TBC cuantificadas espectrofotométricamente. La calibración se llevó a cabo al oxidar unas

concentraciones conocidas de TBC con una alta concentración de enzima, lo cual llevó a consumir todo el TBC en el primer minuto de la reacción. La diferencia entre el trazo inicial y el trazo final (Δ) corresponde a la concentración de oxígeno consumido en la oxidación de TBC por tirosinasa, teniendo en cuenta la estequiometría. Cuando la concentración de TBC es superior a 0.52 mM, este método es válido para conocer el cero de oxígeno, ya que esa concentración estequiométrica de TBC es usada para consumir todo el oxígeno presente en la cámara del oxímetro.

Los ensayos oximétricos se realizaron en la cámara del oxímetro (2 ml) que contenía tampón fosfato sódico 30 mM pH 7.0 como medio de ensayo. El medio fue agitado constantemente. La temperatura se mantuvo constante a 25 °C utilizando un baño circulante Haake D1G con un termostato y criostato, y se comprobó con un termómetro digital Cole-Parmer con una precisión de ± 0.1 °C.

3.2.2. Ensayos espectrofotométricos

Los ensayos cinéticos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda-35 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) conectado mediante una interfase RS232C con un ordenador PC-compatible Intel Pentium® (4) a 3 GHz. Este ordenador disponía del software UV-Winlab suministrado por la casa comercial Perkin-Elmer. La temperatura de los experimentos se mantuvo constante a 25 °C utilizando un baño circulante Haake D1G con un termostato y criostato, y comprobada esta temperatura con un termómetro digital Cole-Parmer con una precisión de ± 0.1 °C. Las cubetas de referencia contenían un volumen final de 1 ml. La actividad de la enzima fue determinada con distintos métodos según el sustrato sobre el que actuase (García-Molina et al., 2007a).

3.2.3. Ensayos de RMN

Los espectros de RMN-¹³C de los distintos sustratos utilizados en esta memoria se obtuvieron en agua deuterada, pH 7.0 (pH óptimo de tirosinasa de champiñón) para obtener los correspondientes valores de desplazamiento químicos (δ). Los espectros de RMN-¹³C se realizaron en un espectrómetro Varian Unity de 400 MHz o en uno de 600 MHz. Los valores de desplazamiento químico se obtuvieron tomando como referencia el valor para el tetrametilsilano ($\delta = 0$). 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 p.p.m.

La dependencia entre los valores de δ en ^{13}C para un átomo de carbono y su densidad electrónica es conocida (Günther, 1980; Farnun, 1975). Se ha demostrado que existe linealidad entre δ y la constante σ y que esta correlación se ha utilizado en los estudios cinéticos y de velocidad de reacción (Levy y Nelson, 1976). Los valores de δ en ^{13}C se han utilizado para verificar o estimar con mayor precisión los valores de σ (Marriott y Topsom, 1985). Cuando varios nucleófilos tienen el mismo átomo nucleofílico y similares características estructurales en la proximidad del sitio nucleofílico, las constantes de ataque nucleofílico para el mismo sustrato se correlacionan con la densidad electrónica de los nucleófilos (Hirsch, 1972; Bordell y Hughes, 1984).

Además, la capacidad electrodonadora del átomo de oxígeno de diferentes compuestos fenólicos (poder nucleofílico) ha sido correlacionada con los valores experimentales de δ para el átomo de carbono que soporta el grupo hidroxilo (Tomiyama et al., 1993).

3.2.4. Ensayos electroquímicos

Los ensayos electroquímicos de voltametría cíclica (CV) se realizaron en el Laboratorio de Electroquímica del Departamento de Química Física de esta Universidad utilizando un sistema potencioestático de tres electrodos construido en el "Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia" (<http://www.um.es/sai>) totalmente controlado, en la generación de señales y en el registro de los resultados, por un ordenador personal. Los programas necesarios para dicho control y para la adquisición y tratamiento de los datos experimentales se han desarrollado en dicho Laboratorio de Electroquímica. Se ha empleado una célula de tres electrodos. Como electrodo de trabajo se utilizó un microdisco de platino (CH Instruments) con un radio de 12,5 μm . El electrodo de referencia fue un electrodo de calomelanos saturado (SCE), y el contraelectrodo era un hilo de platino. Las disoluciones se prepararon con agua desionizada destilada (sistema de filtrado Milli-Q). Las disoluciones fueron desaireadas (de forma independiente tampón y sustrato en medio ácido) con gas nitrógeno durante 20 min antes de las mediciones. Asimismo, se mantuvo una atmósfera de nitrógeno sobre la disolución durante los experimentos. El disco de platino fue pulido antes de los experimentos utilizando una mezcla de agua y alúmina, sucesivamente de tamaños de partícula 1,0; 0,3 y 0,05 μm usando discos de fieltro especialmente diseñados para esta finalidad. Después del pulido mecánico, el

electrodo de trabajo fue sumergido en un baño de ultrasonidos durante 10 min y, posteriormente, sometido a acondicionamiento electroquímico.

3.2.5. Cromatografía

La reacción de tirosinasa con umbeliferona se siguió midiendo la formación de esculetina en presencia de ácido ascórbico por HPLC. La enzima se separó de los intermedios de reacción por centrifugación usando filtros 10.000 MWCO. Los productos de reacción se analizaron en un equipo de cromatografía líquido de alta resolución (VWR-Hitachi, modelo Elite LaChrom). El volumen de las muestras fue de 20 μ l.

3.2.5.1. Ensayos con HPLC

El cromatógrafo utilizado fue un VWR-Hitachi, modelo Elite LaChrom equipado con una bomba L-2130 y con un detector de sistemas de diodos alineados de L-2455. La columna usada fue una Teknokroma Mediterránea Sea C-18 25 cm x 0,4cm con un tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil estaba constituida por las disoluciones (A) agua Milli Q con un 3% de ácido acético y (B) acetonitrilo con ácido acético al 3%. El análisis se hizo con el siguiente gradiente: 0 min, 94% de A; 15 min, 82% de A; 25 min, 67% A; 30 min, 94% A. Las medidas se realizaron a 259 nm, 324 nm y 359 nm. La velocidad de flujo de esta fase móvil es de 1.0 mL/ min.

3.2.5.2. Ensayos con HPLC-MS

Esta técnica se utilizó para monitorizar la reacción de tirosinasa con hidroquinona en presencia de un gran exceso de ácido ascórbico posibilitando, de esta manera, el seguimiento de la formación de hidroxihidroquinona. En primer lugar, se lleva a cabo la reacción y, posteriormente, se separa la enzima de los intermedios de reacción por centrifugación usando filtros de 10.000 MWCO. Los productos de la reacción se analizaron, separaron y cuantificaron en un cromatógrafo HPLC Agilent serie 1100 (Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent VL (Alemania). Se ajustó un programa de separación que supone la elución en gradiente de dos disoluciones: (A) agua con 0,1% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo con 0,1% ácido fórmico. El gradiente comienza a $t = 0$ con 3% B, que aumenta hasta llegar a un 50% de B en 10 minutos. A continuación, el valor inicial de B se recuperó en el minuto 11, dejando que el equipo se estabilizara durante un periodo adicional de 5 minutos (*post-run*). La velocidad de flujo empleada fue de 0.8 ml/min. El detector de diodos alineados (DAD) de alta resolución se ajustó para registrar datos a 290 nm, con un rango de

absorbancia de 190 a 350 nm empleando pasos de 2 nm. En el espectrómetro de masas, la adquisición se realizó en modo SCAN seleccionando un rango de masas de 50-500 m/z. Como método de generación de iones se empleó una ionización por electronebulización (ESI), operando en modo negativo a una temperatura de 350 °C y una presión de 60 psi. Para terminar de adecuar el método de trabajo a la fase móvil utilizada, se seleccionó un flujo de gas de secado de 9 l/minuto.

Con el objeto de optimizar el funcionamiento de la trampa de iones, tras varias pruebas para verificar la eficacia de la ionización, se eligió un pico a 110 m/z de una muestra patrón, una estabilidad del 60% y un nivel de accionamiento de la trampa del 80%. El número máximo de iones fue de 50.000 y el tiempo máximo de acumulación se seleccionó a 300 milisegundos, parámetros adecuados a la sensibilidad de los compuestos analizados en este estudio. El voltaje de capilaridad fue de 3.5 KV. La calibración del instrumento se realizó en la modalidad de sintonización automática (*autotuning*) usando una mezcla especial de calibración para una trampa de iones LC/MSD de Agilent Technologies (referencia G2431A).

El tratamiento de los datos, realizado con el software *Data Analysis* versión 2.1, se completó con la adquisición de los cromatogramas de iones extraídos del barrido principal (Extracted Ion Chromatogram, EIC) para obtener la masa del ion negativo ($M-H$)⁻ y, posteriormente, cuantificar dichos iones mediante su integración.

3.2.6. Efecto isotópico del disolvente

La influencia del efecto isotópico sobre los parámetros cinéticos se determinó como una fracción de deuterio en la disolución. Se prepararon disoluciones stock de tampón fosfato y de los diferentes sustratos en H₂O y ²H₂O y se combinaron en varias proporciones para conseguir diferentes fracciones atómicas (n) de deuterio. Los tampones es ²H₂O se prepararon liofilizando el correspondiente tampón en H₂O y disolviendo el sólido en ²H₂O. Las muestras de enzima se prepararon para tener el mismo porcentaje de ²H₂O como el medio de reacción combinando di soluciones stock de enzima en H₂O y ²H₂O en las proporciones adecuadas.

3.2.7. Análisis de regresión

3.2.7.1. Regresión no lineal

Los ajustes por regresión no lineal pueden realizarse a través de los análisis en gradiente y de los algoritmos tipo Gauss-Newton. Los primeros métodos exploran el espacio de los parámetros buscando la dirección en la que tiene lugar la máxima variación de la función, respecto a todos ellos. A continuación, evolucionan en la dirección opuesta a la anterior, mejorando los valores de los parámetros en iteraciones sucesivas del método. Estos procedimientos no requieren estimaciones iniciales muy próximas a \mathbf{z} , pero requieren largo tiempo de cálculo, características opuestas a las de los algoritmos tipo Gauss-Newton.

Los algoritmos de Gauss-Newton introducen una aproximación lineal de la función en un entorno próximo a los valores de los parámetros calculados en cada iteración (Watts, 1981). Así, en base a las estimaciones \mathbf{z}^i , se calculan los incrementos \mathbf{B}^{i+1} que conducen a las estimaciones mejoradas \mathbf{z}^{i+1} :

$$\mathbf{z}^{i+1} = \mathbf{z}^i + \mathbf{B}^{i+1}$$

La expresión que define al vector de incrementos de parámetros en cada iteración abarca diversos componentes:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{V}^T \mathbf{W} \mathbf{V})^{-1} (\mathbf{V}^T \mathbf{W} \mathbf{D}) = \mathbf{A}^{-1} \mathbf{C}$$

Así pues, cada iteración requiere una nueva evaluación de los residuos \mathbf{D} y de las derivadas \mathbf{V} , respecto a las estimaciones en curso de los parámetros \mathbf{z} y actualizadas mediante los incrementos \mathbf{B} .

La ponderación \mathbf{W} asociada a cada dato determina la contribución específica del mismo al ajuste global de todos los valores experimentales. Los factores de ponderación:

$$W_i = 1 / S_i^2$$

están inversamente relacionados con las varianzas respectivas de cada punto, obtenidas a partir de varias repeticiones para cada dato experimental (Endrenyi, 1981).

La fiabilidad del ajuste se realiza mediante la región de confianza correspondiente al nivel de significación α (Watts, 1981):

$$(z-z)^T V^T V(z-z) \leq pS(z) F(p,n-p, \alpha) / (n-p)$$

Esta región es un elipsoide p -dimensional en el espacio de los parámetros con centro z , interpretación geométrica asociada al concepto estadístico de matriz de correlación (Endrenyi, 1981). Esta expresión abarca la varianza experimental, $S(z)/(n-p)$, estimada para el número de grados de libertad del ajuste $(n-p)$, así como los valores de la distribución F de Fisher.

Entre los mejores métodos de regresión no lineal, se encuentra un algoritmo de Gauss-Newton que incorpora cierta proporción de búsqueda en gradiente (Marquardt, 1963). La contribución del proceso en gradiente se introduce en la anterior expresión de B a través de la matriz A cuyos elementos diagonales contienen la constante L . A la constante L se le asigna un valor inicial de 10^{-3} (Marquardt, 1963) que puede aumentar o disminuir en factores de diez, durante las sucesivas iteraciones.

3.2.7.2. Regresión lineal

La minimización de la suma de los residuos al cuadrado para una función lineal simple o múltiple, conduce directamente a expresiones algebraicas que definen los parámetros correspondientes (Draper y Smith, 1981; Endrenyi, 1981). Así, a partir de las anteriores expresiones para las matrices z y B se obtiene:

$$z = (x^T W x)^{-1} (x^T W y)$$

Siendo igualmente aplicables los conceptos de ponderación y fiabilidad anteriormente descritos.

3.2.8. Simulación numérica

La finalidad última de la bioquímica consiste en la caracterización de los procesos químicos que tienen lugar en los sistemas biológicos. Dicha caracterización exige un proceso de actuación ordenado y riguroso. La realización de un estudio experimental que permita un conocimiento de las propiedades del sistema, hace posible la construcción de un modelo que intente explicar estos datos experimentales, así como la información bibliográfica existente. Una vez construido el modelo correspondiente, se somete a un proceso de simulación que proporciona una serie de datos teóricos. El contraste de estos datos y la información disponible sobre el sistema real es de utilidad para aceptar, modificar o rechazar el modelo propuesto.

Se obtienen una serie de curvas de progreso, asignando valores concretos a las constantes de velocidad de los mecanismos descritos, y simulando mediante la integración numérica del correspondiente sistema de ecuaciones diferenciales. A estas curvas de progreso se les aplicó el análisis de datos cinético, obteniéndose una serie de constantes cinéticas, que se compararon con las obtenidas en los ensayos experimentales. Además, la simulación ha permitido verificar la relación del análisis cinético. A continuación se procede a describir, brevemente, el concepto de integración numérica, así como los métodos más usados.

3.2.8.1. Integración numérica de ecuaciones diferenciales

El comportamiento cinético de un modelo enzimático puede considerarse, a nivel matemático, como un problema de valor inicial, esto es, un sistema de ecuaciones diferenciales:

$$Y_j' = f_j(X, Y_j)$$
$$Y_j(X_0) = Y_j^{(0)}$$

cuyas funciones tienen un valor conocido, en un instante de tiempo determinado, usualmente $X_0 = 0$. Cuando el sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente tiene estructura no lineal, carece de solución analítica, y debe ser resuelto, de modo aproximado, por métodos numéricos.

Considerando el sistema anterior, en el instante inicial, X_0 , se conoce el valor exacto de la variable dependiente, Y_0 , y se calcula su derivada $Y'(X_0)$, a través de la ecuación diferencial correspondiente. Después, se avanza un intervalo de tiempo, denominado tamaño de paso, h , a lo largo de dicha derivada, alcanzándose el instante $X_1 = X_0 + h$. Esto equivale a la obtención de un nuevo valor de la función, Y_1 .

$$Y_1 = Y_0 + hY'(X_0)$$

A continuación se reanuda el proceso tomando como punto de partida Y_1 , en el instante X_1 , y se realizan sucesivas interacciones hasta completar el rango de tiempo considerado.

$$Y_{n+1} = Y_n + hY'(X_n)$$

Este procedimiento se denomina método de Euler y equivale, a nivel geométrico, a la reproducción de una curva mediante una sucesión de rectas. Existen una gran variedad de métodos alternativos que intentan optimizar la exactitud del

cálculo en cada iteración, según se describe posteriormente. Entre estos se encuentran los métodos basados en la serie de Taylor y en los basados en la resolución numérica de integrales.

Existen numerosos métodos de integración basados directa o indirectamente en el desarrollo de Taylor. De entre todos ellos, el más utilizado es el método clásico de Runge-Kutta de cuarto orden, ampliamente referenciado en la bibliografía.

3.2.8.2. Métodos de paso variable

Un tipo de error, característico de los métodos de integración numérica de ecuaciones diferenciales, es el error de truncamiento, tanto menor cuanto mayor es el orden del método considerado. Sin embargo, un aumento indefinido en el orden de un método, origina operaciones más complejas y un tiempo de cálculo excesivo. El error de truncamiento puede reducirse disminuyendo el tamaño de paso de la integración numérica, h , pero un valor excesivamente pequeño de éste, obliga a operar con valores de ordenadas cuya magnitud es muy próxima, ocasionando errores de redondeo (pérdida de cifras significativas), rápidamente propagados en sucesivas iteraciones.

Por tanto, una mejora en los métodos de integración numérica, consiste en el establecimiento de un paso variable, a lo largo del campo de existencia de la función, cuya magnitud permita optimizar la reducción del error de truncamiento y la amplificación del error de redondeo, dentro de límites satisfactorios, para el problema de valor inicial bajo estudio. A tal fin, es necesario disponer de una estimación de ambos tipos de error, estando asociado el error de redondeo, al número de cifras significativas con que opera cada ordenador, habitualmente ocho (precisión simple), dieciséis (precisión doble) o treinta y dos (precisión cuádruple). El método de Fehlberg es eficaz para el cálculo del paso variable acoplado al método de Runge-Kutta de cuarto orden, por lo que se ha utilizado en este trabajo.

3.2.8.3. Implementación

Los ensayos de simulación reproducen el comportamiento de las concentraciones de ligandos y especies enzimáticas involucradas en los mecanismos de reacción propuestos en esta Memoria para tirosinasa. Los respectivos sistemas de ecuaciones diferenciales han sido resueltos numéricamente para casos particulares de valores de constantes de velocidad y concentraciones iniciales de especies para cada mecanismo de reacción (Gálvez y Varón, 1981). La integración numérica está basada en el algoritmo de Runge-Kutta-Fehlberg (Gerald y Wheatley, 1989) con un error máximo de $2,22 \times 10^{-6}$ unidades de concentración, implementado en el programa WES

(García-Sevilla et al., 2000) compilado en el lenguaje C++ para Windows e instalado en un PC compatible.

3.2.8.4. Condiciones de simulación

El conjunto de ecuaciones diferenciales obtenidas del mecanismo de reacción de tirosinasa, las condiciones iniciales, así como los valores de las constantes, los cuales se tomaron de forma que cumplieran el valor de las constantes cinéticas determinadas experimentalmente, así como que permitieran simular los distintos supuestos en tiempos razonablemente cortos y asequibles para el ordenador utilizado, se describen en el capítulo de Resultados y Discusión, en las publicaciones adjuntas.

Resultados y Discusión

4.1. ARTÍCULO 1

4.1.1. Título

Estudio de la hidroxilación de umbeliferona a esculetina catalizada por polifenol oxidasa.

4.1.2. Referencia

Biological and Pharmaceutical Bulletin (2013) 36, 1140-1145.

4.1.3. Resumen

Se ha caracterizado umbeliferona, un derivado del ácido 2,4-dihidroxicumarico, como un sustrato de polifenol oxidasa. Esta enzima hidroxila umbeliferona a esculetina, su *o*-difeno, y posteriormente lo oxida a su *o*-quinona. A partir de estos resultados se pone de manifiesto que umbeliferona, un intermedio en la ruta biosintética de cumarinas, puede ser transformada en su *o*-difeno, esculetina, que también es un intermedio en esta ruta. La actividad de la enzima sobre umbeliferona se siguió mediante la medida del consumo de oxígeno, espectrofotométricamente y mediante HPLC. Las constantes cinéticas que caracterizaron el proceso de hidroxilación de umbeliferona fueron : la constante catalítica $0.09 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ y la constante de Michaelis $0.17 \pm 0.06 \text{ mM}$. El *o*-difeno esculetina fue mejor sustrato y su oxidación se estudió espectrofotométricamente obteniendo: una constante catalítica de $1.31 \pm 0.25 \text{ s}^{-1}$ y una constante de Michaelis de $0.035 \pm 0.002 \text{ mM}$. Por tanto, ambos compuestos se podrían comportar como sustratos alternativos a L-tirosina y L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) puesto que son capaces de inhibir indirectamente la melanogénesis.

4.1.4. Url

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/7/36_b13-00119/_pdf

4.2. ARTÍCULO 2

4.2.1. Título

Peróxido de hidrógeno ayuda a la identificación de monofenoles como sustratos de tirosinasa.

4.2.2. Referencia

Bioscience Biotechnology and Biochemistry (2013) 77, 2383-2388.

4.2.3. Resumen

Tirosinasa existe en tres formas en el ciclo catalítico dependiendo del estado de oxidación de sus átomos de cobre: meta- (E_m), oxi- (E_{ox}) y desoxi- (E_d). Cuando las o-quinonas, productos de la reacción enzimática, evolucionan químicamente para generar un o-difenol en el medio de reacción, la enzima actúa sobre un monofenol empleando el o-difenol como reductor y convirtiendo E_m a E_d . La unión de oxígeno molecular a E_d produce E_{ox} , que es la forma enzimáticamente activa sobre monofenoles, pero cuando la o-quinona producto no genera o-difenol a través de su evolución química, el monofenol no actúa como un sustrato de la enzima. El hecho de que la forma E_{ox} se pueda formar a partir de E_m con peróxido de hidrógeno puede utilizarse para identificar si un monofenol es un sustrato de tirosinasa. Los resultados obtenidos en este estudio confirman que compuestos descritos previamente como inhibidores de la enzima son verdaderos sustratos de ella.

4.2.4. Url

<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.130500>

4.3. ARTÍCULO 3

4.3.1. Título

Inactivación indirecta de tirosinasa en su acción sobre 4-*tert*-butilfenol.

4.3.2. Referencia

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry (2014) 29,344-352.

4.3.3. Resumen

En condiciones anaerobias, el *o*-difenol 4-*tert*-butilcatecol (TBC) inactiva irreversiblemente las formas enzimáticas de tirosinasa *meta* y *desoxi*. Sin embargo, el monofenol 4-*tert*-butilfenol (TBF) protege a la enzima de esta inactivación. En condiciones aerobias, la enzima sufre inactivación suicida cuando actúa sobre TBC. En este estudio se sugiere que el TBF no causa directamente la inactivación de la enzima en la actividad hidroxilasa sino que el responsable de este proceso es el *o*-difenol, el cual es necesario para que el sistema alcance el estado estacionario. Por lo tanto, los monofenoles no inducen la inactivación de tirosinasa en su actividad hidroxilasa, existiendo una gran diferencia entre los monofenoles que dan lugar a *o*-quinonas inestables, como por ejemplo L-tirosinasa capaz de acumular rápidamente L-dopa en el medio, y otras como el TBF, que después de su oxidación produce una *o*-quinona muy estable.

4.3.4. Url

<http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/14756366.2013.782298>

4.4. ARTÍCULO 4

4.4.1. Título

Efecto isotópico de deuterio en la inactivación suicida de tirosinasa en su acción sobre o-difenoles.

4.4.2. Referencia

International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life (2013) 65, 793-799.

4.4.3. Resumen

Se ha observado un efecto isotópico de deuterio en la inactivación suicida de tirosinasa empleando o-difenoles (catecol, 4-metilcatecol y 4-*tert*-butilcatecol). El efecto isotópico observado durante los estudios cinéticos en fase de transición fue mayor que el descrito previamente en estado estacionario, indicando que hay una etapa lenta adicional en el mecanismo de inactivación suicida, la cual pensamos que es la responsable de la inactivación. En un estudio del efecto isotópico sobre la cinética de oxidación de o-difenoles, la representación de $\lambda_{\max}^{f_n} / \lambda_{\max}^{f_0}$ frente a n (fracción molar de deuterio), donde $\lambda_{\max}^{f_n}$ es la constante de inactivación aparente máxima para n y $\lambda_{\max}^{f_0}$ es el correspondiente parámetro cinético en agua, fue lineal para todos los sustratos estudiados. Esto sugiere que solamente uno de los protones transferidos a partir de los grupos hidroxilos del sustrato, los cuales son oxidados en un ciclo catalítico, es responsable del efecto isotópico. Se ha propuesto que este protón puede transferirse desde el grupo hidroxilo de C-2 al hidropéroxido de la forma oxitirosinasa (E_{ox}) y esto es lo que probablemente causa la inactivación de la enzima a través de la reducción del Cu^{2+} a Cu^0 y su posterior liberación del centro activo.

4.4.4. Url

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1191/pdf>

4.5. ARTÍCULO 5

4.5.1. Título

Catálisis e inactivación de tirosinasa en su acción sobre hidroxihidroquinona.

4.5.2. Referencia

International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life (2014) 66, 122-127.

4.5.3. Resumen

Se ha caracterizado a hidroxihidroquinona (HHQ) como un sustrato de tirosinasa. Se propone un mecanismo cinético en el que HHQ se considera como un monofenol o como un *o*-difenol dependiendo de la parte de la molécula que interacciona con la enzima. Los parámetros cinéticos obtenidos a partir del análisis de las medidas de la velocidad inicial de estado estacionario de la formación de 2-hidroxip-benzoquinona fueron: $k_{cat}^{app} = 229.0 \pm 7.7 \text{ s}^{-1}$ y $K_M^{app} = 0.40 \pm 0.05 \text{ mM}$. Además, la acción de tirosinasa sobre HHQ da lugar a la inactivación de la enzima a través de un mecanismo de inactivación suicida caracterizado cinéticamente por λ_{max}^{app} , la constante de inactivación aparente máxima, y *r*, el número de ciclos que realiza un mol de enzima antes de su inactivación. Los valores de λ_{max}^{app} y *r* fueron $(8.2 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y 35.740 ± 2.548 , respectivamente.

4.5.4. Url

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1250/pdf>

4.6. ARTÍCULO 6

4.6.1. Título

Catálisis e inactivación de tirosinasa en su acción sobre o-difenoles, o-aminofenoles y o-fenilendiaminas: potencial uso en aplicaciones industriales.

4.6.2. Referencia

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2013) 91,17-24.

4.6.3. Resumen

Un estudio de las actividades difenolasa, o-aminofenoloxidasas y la o-diamino oxidasa, midiendo la catálisis y la inactivación suicida, suministra la siguiente información: constante catalítica, k_{cat}^s , constante de Michaelis, K_m^s , la constante de inactivación aparente máxima λ_{max}^s y la razón de partición "r" entre la ruta de inactivación suicida y la ruta de catálisis o el número de ciclos que hace un mol de enzima antes de su inactivación. El análisis de estos datos, teniendo en cuenta los desplazamientos químicos del átomo de carbono que soporta el grupo hidroxilo o amino (δ) y σ_p^+ , hace posible proponer un mecanismo para la transformación de o-difenoles, o-aminofenoles y o-fenilendiaminas en sus productos (o-quinonas, o-quinonaimina y o-diamina) y, al mismo tiempo, para la inactivación suicida.

Las constantes de reacción derivadas de las representaciones de $\log k_{cat}^x / k_{cat}^H$ vs. σ_p^+ siguiendo la ecuación de Hammett para los tres tipos de sustratos (o-difenoles, o-aminofenoles y o-fenilendiaminas) confirman que el mecanismo de catálisis es similar (oxidación/reducción simultánea de los dos átomos de cobre). Por otro parte, la dependencia de $\log \lambda_{max}^x / \lambda_{max}^H$ vs. σ_p^+ para los tres tipos de sustratos refleja una constante de reacción más baja (en valor absoluto), lo que indicaría un mecanismo similar para los diferentes sustratos pero diferente del mecanismo anterior (catálisis), en el que la oxidación/reducción implica un átomo de cobre. También discutimos el mecanismo propuesto y lo comparamos con los descritos por otros autores. El conocimiento y cuantificación de los procesos de catálisis/inactivación de tirosinasa puede ser de interés para optimizar aplicaciones tales como el tratamiento de aguas.

4.6.4. Url

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138111771300043X>

4.7. ARTÍCULO 7

4.7.1. Título

Tirosinasa cataliza la hidroxilación de hidroquinona, un agente despigmentante, a hidroxihidroquinona: un estudio cinético.

4.7.2. Referencia

Bioorganic and medicinal chemistry (2014) 22, 3360-3369.

4.7.3. Resumen

Hidroquinona (HQ) es utilizada como un agente despigmentante. En este trabajo nosotros demostramos que tirosinasa hidroxila HQ a 2-hidroxihidroquinona (HHQ). Oxi-tirosinasa hidroxila HQ a HHQ formando el complejo meta-tirosinasa-HHQ capaz de evolucionar por dos caminos distintos, uno para dar desoxi-tirosinasa y p-hidroxi-o-quinona, la cual rápidamente isomeriza a 2-hidroxi-p-benzoquinona u otro para generar meta-tirosinasa y HHQ. En el último caso, HHQ rápidamente es oxidada por oxígeno generando 2-hidroxi-p-benzoquinona, y por lo tanto, la enzima no puede cerrar el ciclo catalítico por la falta de reductor (HHQ). Sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno, meta-tirosinasa (inactiva sobre hidroquinona) es transformada en oxi-tirosinasa, la cual es activa sobre HQ. De forma semejante, en presencia de ácido ascórbico, HQ es transformada en 2-hidroxi-p-benzoquinona por la acción de tirosinasa; sin embargo en este caso, el ácido ascórbico reduce meta-tirosinasa a desoxi-tirosinasa, la cual posteriormente enlaza oxígeno, originando oxi-tirosinasa. Esta forma enzimática es capaz de reaccionar con HQ para generar p-hidroxi-o-quinona, la cual rápidamente isomeriza a 2-hidroxi-p-benzoquinona. La formación de HHQ durante la acción de tirosinasa sobre HQ se demostró por medio de HPLC-MS usando peróxido de hidrógeno y altas concentraciones de ácido ascórbico. Proponemos un mecanismo cinético para la oxidación de HQ por tirosinasa el cual nos permite la caracterización cinética del proceso. Se discute una posible explicación del efecto citotóxico de HQ.

4.7.4. Url

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089614003137>

4.8. ARTÍCULO 8

4.8.1. Título

Acción de tirosinasa sobre hidroquinona en presencia de cantidades catalíticas de o-difenol. Un estudio cinético.

4.8.2. Referencia

Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis (2014) 112, 305-320.

4.8.3. Resumen

La formación de hidroxihidroquinona durante la acción de tirosinasa sobre hidroquinona se ha demostrado mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Se propone un mecanismo cinético para explicar esta acción en presencia de cantidades catalíticas de 4-*tert*-butilcatecol. Basado en un análisis cinético de este mecanismo se propone un diseño experimental que permite caracterizar cinéticamente al sistema.

4.8.4. Url

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11144-014-0723-1>

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

El desarrollo de esta memoria ha conducido al establecimiento de un conjunto de conclusiones específicas y generales sobre el tema de estudio.

5.1. Conclusiones específicas

Las conclusiones descritas en los diferentes capítulos pueden resumirse en varias conclusiones específicas.

1. Se ha puesto a punto un método para discernir si un monofenol es sustrato o inhibidor de tirosinasa.
2. El método utiliza peróxido de hidrógeno, que consigue la transformación de E_m (metatirosinasa), inactiva sobre monofenoles, a E_{ox} (oxitirosinasa), activa sobre monofenoles.
3. Mediante la aplicación de la metodología desarrollada se ha demostrado que moléculas descritas como inhibidores son verdaderos sustratos: hidroquinona, umbeliferona, α -naftol, β -naftol, carvacrol, timol, eugenol, isoeugenol, arbutina y guayacol.
4. Se ha podido demostrar la hidroxilación de umbeliferona a esculetina, ambos intermedios en la ruta de biosíntesis de cumarinas, mediante métodos oximétricos, espectrofotométricos y por HPLC.
5. Se ha caracterizado cinéticamente el proceso, demostrando que la constante catalítica de tirosinasa en su acción sobre umbeliferona es menor que la correspondiente a su acción sobre esculetina.
6. Se ha estudiado la implicación de las dos actividades de la enzima, monofenolasa y difenolasa, en el proceso de inactivación suicida.
7. Se ha podido demostrar que la enzima no se inactiva en la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles.

8. La inactivación suicida se manifiesta únicamente en la actividad difenolasa.
9. En la acción de tirosinasa sobre monofenoles se acumula *o*-difenol en el medio que es el responsable de la inactivación suicida de la enzima.
10. Se ha profundizado en el proceso de inactivación suicida de la enzima, y se ha demostrado mediante la utilización de un medio deuterado que existe una etapa lenta en dicho proceso que se afecta por la presencia de agua pesada.
11. La etapa limitante afectada por deuterio podría corresponder a la transferencia de deuterio al hidroperóxido en la forma oxitirosinasa.
12. Se ha profundizado en el proceso de catálisis e inactivación suicida en la acción de la enzima sobre *o*-difenoles, *o*-aminofenoles y *o*-fenilendiaminas.
13. La representación de $\log k_{cat}^X / k_{cat}^H$ respecto a σ_p^+ de acuerdo con la ecuación de Hammett para los *o*-difenoles, *o*-aminofenoles y *o*-fenilendiaminas proporciona unos valores de la constante de reacción ($\rho = -2.25$, $\rho = -2.42$ y $\rho = -2.06$), respectivamente, similares en los tres casos poniendo de manifiesto que el proceso de catálisis sigue el mismo mecanismo en los tres tipos de moléculas. Se propone que la oxidación/ reducción sobre los dos átomos de cobre podría ocurrir de manera simultánea.
14. La representación de $\log \lambda_{max}^X / \lambda_{max}^H$ respecto a σ_p^+ de acuerdo con la ecuación de Hammett, muestra unos valores de la constante de reacción, en el proceso de inactivación, ρ , más bajos que los obtenidos para el proceso catalítico, lo cual podría interpretarse como un cambio de mecanismo, por ejemplo la oxidación/ reducción sobre un sólo átomo de cobre.
15. Los efectos electrónicos de los sustituyentes en C-4, en los sustratos, son más significativos en los procesos de catálisis que en los de inactivación.
16. Se ha estudiado la acción de tirosinasa sobre hidroxihidroquinona, caracterizando los procesos de catálisis e inactivación suicida.

17. Se ha demostrado bajo distintos enfoques experimentales que hidroquinona es un sustrato de tirosinasa. La enzima la hidroxila a hidroxihidroquinona.
18. Mediante la técnica de HPLC-masas y en presencia de altas concentraciones de ácido ascórbico se ha detectado la formación de hidroxihidroquinona, el producto de la reacción enzimática, en presencia de peróxido de hidrógeno, ya que este compuesto consigue la transformación de metatirosinasa a oxirosinasa.
19. Se ha demostrado que en presencia de ácido ascórbico tirosinasa hidroxila hidroquinona a hidroxihidroquinona en ausencia de peróxido de hidrógeno, mediante la transformación de metatirosinasa a desoxirosinasa.
20. Se ha caracterizado cinéticamente, en presencia de *o*-difenol catalítico y ácido ascórbico, a hidroquinona como un sustrato de tirosinasa.

5.2. Conclusiones generales

Las conclusiones específicas previas permiten establecer las siguientes conclusiones generales:

1. Se ha demostrado que tirosinasa podría participar en la ruta de biosíntesis de cumarinas hidroxilando umbeliferona a esculetina.
2. Peróxido de hidrógeno ayuda a demostrar si un monofenol es sustrato o inhibidor de tirosinasa actuando sobre la forma E_m (metatirosinasa) y transformándola en la forma E_{ox} (oxirosinasa).
3. Los estudios cinéticos con TBF/TBC demuestran que la enzima se inactiva únicamente al actuar sobre *o*-difenoles.
4. Un conjunto de estudios de efecto isotópico con D_2O han puesto de manifiesto que existe una etapa muy lenta en la que se transfiere un protón. Esta etapa podría ser previa a la inactivación suicida.

5. La catálisis de la oxidación de *o*-difenoles, *o*-aminofenoles y *o*-fenilendiaminas, sigue un mecanismo similar: oxidación/ reducción simultánea sobre los dos átomos de cobre.
6. El proceso de inactivación suicida en la acción de la enzima sobre estos sustratos parece seguir un mismo mecanismo, que podría ser la oxidación/ reducción de uno de los átomos de cobre.
7. Los efectos electrónicos de los sustituyentes de C-4 de *o*-difenoles, *o*-aminofenoles y *o*-fenilendiaminas en las etapas de catálisis e inactivación son más importantes en los *o*-difenoles y *o*-aminofenoles.
8. El producto de hidroxilación de hidroquinona, la hidroxihidroquinona, es un sustrato suicida de la enzima.
9. Se ha puesto de manifiesto que hidroquinona, un agente despigmentante, es un sustrato de tirosinasa.
10. Se ha demostrado que tirosinasa actúa sobre hidroquinona en presencia de oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, ya que este último pasa metatirosinasa (inactiva sobre hidroquinona) a oxitirosinasa (activa sobre hidroquinona).
11. También se ha puesto de manifiesto que tirosinasa actúa sobre hidroquinona en presencia de oxígeno y ácido ascórbico a altas concentraciones, por el paso de metatirosinasa a desoxitirosinasa. Del mismo modo, cantidades catalíticas de *tert*-butilcatecol y ácido ascórbico en concentraciones de orden micromolar consiguen la acción de tirosinasa sobre hidroquinona a través del paso de metatirosinasa a desoxitirosinasa.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aasa,R., Deinum,J., Lerch,K. y Reinhammar,B. (1978) The reaction of mercaptans with tyrosinase and hemocyanins. *Biochim. Biophys. Acta* **535**, 287-298.
- Abdel-Malek,Z., Swope,V.B., Pallas,J., Krug,K. y Nordlund,J.J. (1992) Mitogenic, melanogenic, and cAMP responses of cultured neonatal human melanocytes to commonly used mitogens. *J. Cell Physiol.* **150**, 416-425.
- Abdel-Malek,Z., Swope,V., Collins,C., Boissy,R., Zhao,H. y Nordlund,J. (1993) Contribution of melanogenic proteins to the heterogeneous pigmentation of human melanocytes. *J. Cell Sci.* **106**, 1323-1331.
- Abebe,A., Zheng,D., Evans,J. y Sugumaran,M. (2010) Reexamination of the mechanisms of oxidative transformation for the insect cuticular sclerotizing precursor, 1,2-dehydro-N-acetyldopamine. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 650-659.
- Abu Ubeid,A., Zhao,L., Wang,Y. y Hantash,B.M. (2009) Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2242-2249.
- Abdullah,J., Ahmad,M., Karupiah,N., Heng,L.Y. y Sidek,H. (2006) Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sens. Actuators B* **114**, 604-609.
- Ahn,S.M., Rho,H.S., Baek,H.S., Joo,Y.H., Hong,Y.D., Shin,S.S., Park,Y.H. y Park,S.N. (2011) Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 7466-7469.
- Ai,N., Welsh,W.J., Santhanam,U., Hu,H. y Lyga,J. (2014) Novel virtual screening approach for the discovery of human tyrosinase inhibitors. *PLoS One* **9**, e112788. DOI: 10.1371/0112788.
- Algieri,C., Donato,L., Bonacci,P. y Giorno,L. (2012) Tyrosinase immobilised on polyamide tubular membrane for the L-DOPA production: Total recycle and continuous reactor study. *Biochem. Eng. J.* **66**, 14-19.
- Alikhan,A., Felsten,L.M., Daly,M. y Petronic-Rosic,V. (2011) Vitiligo: a comprehensive overview. Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J. Am. Acad. Dermatol.* **65**, 473-491.
- Allan,A.E., Archambault,M., Messina,E. y Gilchrist,B.A. (1995) Topically applied diacylglycerols increase pigmentation in guinea pigs skin. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 687-692.
- Amer,M. y Metwalli,M. (1998) Topical hydroquinone in the treatment of some hyperpigmentary disorders. *Int. J. Dermatol.* **37**, 449-450.
- Amparyup,P., Charoensapri,W. y Tassanakajon,A. (2013) Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* **34**, 990-1001.
- An,C., Jiang,H. y Kanost,M.R. (2010) Proteolytic activation and function of the cytokine Spätzle in the innate immune response of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *FEBS J.* **277**, 148-162.
- Ancans,J., Tobin,D.J., Hoogduijn,M.J., Smit,N.P., Wakamatsu,K. y Thody,A.J. (2001) Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **268**, 26-35.
- Andersen,S.O. (2010) Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 166-178.
- Ando,H., Watabe,H., Valencia,J.C., Yasumoto,K., Furumura,M., Funasaka,Y., Oka,M., Ichihashi,M. y Hearing,V.J. (2004) Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function. *J. Biol. Chem.* **279**, 15427-15433.
- Ando,H., Wen,Z.M., Kim,H.Y., Valencia,J.C., Costin,G.E., Watabe,H., Yasumoto,K., Niki,Y., Kondoh,H., Ichihashi,M. y Hearing,V.J. (2006) Intracellular composition of fatty acid affects the processing and function of tyrosinase through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. J.* **394**, 43-50.

- Apetrei,C., Rodríguez-Méndez,M.L. y De Sajac,J.A. (2011) Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. *Electrochim. Acta* **56**, 8919-8925.
- Apetrei,I.M. y Apetrei,C. (2013) Biosensor based on tyrosinase immobilized on a single-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for detection of epinephrine. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 4391-4398.
- Apfel,R., Lottspeich,F., Hoppe,J., Behl,C., Dürr,G. y Bogdahn,U. (1992). Purification and analysis of growth regulating proteins secreted by a human melanoma cell line. *Melanoma Res.* **2**, 327-336.
- Aranow,C. (2011) Vitamin D and the immune system. *J. Investig. Med.* **59**, 881-886.
- Arica,M.Y. y Bayramoglu,G. (2004a) Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu(II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membranes. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **27**, 255-265.
- Arica,M.Y., Bayramoglu,G. y Bicak,N. (2004b) Characterization of tyrosinase immobilized onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochem.* **39**, 2007-2017.
- Arnao,M.B., Acosta,M., del Rio,J.A., Varón,R. y García-Canovas,F. (1990) A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1041**, 43-47.
- Aroca,P., García-Borrón,J.C., Solano,F. y Lozano,J.A. (1990) Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **1035**, 266-275.
- Arroyo,M. (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* **39**, 23-39.
- Arslan,O., Erzenin,M., Sinan,S. y Ozensoy,O. (2004) Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chem.* **88**, 479-484.
- Arslan,A., Kiralp,S., Toppare,L. y Yagci,Y. (2005) Immobilization of tyrosinase in polysiloxane/polypyrrole copolymer matrices. *Int. J. Biol. Macromol.* **35**, 163-167.
- Asada,N., Yokoyama,G., Kawamoto,N., Norioka,S. y Hatta,T. (2003) Prophenol oxidase A3 in *Drosophila melanogaster*: activation and the PCR-based cDNA sequence. *Biochem. Genet.* **41**, 151-163.
- Asano,T. y Ashida,M. (2001) Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *J. Biol. Chem.* **276**, 11100-11112.
- Asav,E., Yorganci,E. y Akyilmaz,E. (2009) An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta* **78**, 553-556.
- Aspán,A., Huang,T., Cerenius,L. y Söderhäll,K. (1995) cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 939-943.
- Ates,S., Cortenlioglu,E., Bayraktar,E. y Mehmetoglu,U. (2007) Production of L-dopa using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 683-687.
- Autier,P., Doré,J.F., Renard,F., Luther,H., Cattaruzza,M.S., Gefeller,O. y Grivegnée,A. (1997) Melanoma and sunscreen use: need for studies representative of actual behaviours. *Melanoma Res.* **Suppl 2**, S115-120.
- Averbeck,D. (1989) Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. *Photochem. Photobiol.* **50**, 859-882.
- Aytar,B.S. y Bakir,U. (2008) Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochem.* **43**, 125-131.
- Ba,S., Haroune,L., Cruz-Morató,C., Jacquet,C., Touahar,I.E., Bellenger,J.P., Legault,C.Y., Jones,J.P. y Cabana,H. (2014) Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Sci. Total Environ.* **487**, 748-755.
- Badreshia-Banal,S. y Draelos, Z.D. (2007) Insight into skin lightening cosmeceuticals for women of color. *J. Drugs Dermatol.* **6**, 32-39.

- Bae,S.J., Ha,Y.M., Park,Y.J., Park,J.Y., Song,Y.M., Ha,T.K., Chun,P., Moon,H.R. y Chung,H.Y. (2012) Design, synthesis, and evaluation of (E)-N-substituted benzylidene-aniline derivatives as tyrosinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **57**, 383-390.
- Bae,S.J., Ha,Y.M., Kim,J.A., Park,J.Y., Ha,T.K., Park,D., Chun,P., Park,N.H., Moon,H.R. y Chung,H.Y. (2013) A novel synthesized tyrosinase inhibitor: (E)-2-((2,4-dihydroxyphenyl)diazenyl)phenyl 4-methylbenzenesulfonate as an azo-resveratrol analog. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 65-72.
- Bagherzadeh,K., Talari,F.S., Sharifi,A., Ganjali,M.R., Saboury,A.A. y Amanlou,M. (2015) A new insight into mushroom tyrosinase inhibitors: docking, pharmacophore-based virtual screening, and molecular modeling studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **33**, 487-501.
- Baharav,E., Merimski,O., Shoenfeld,Y., Zigelman,R., Gilbrud,B., Yecheskel,G., Youinou,P. y Fishman,P. (1996) Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin. Exp. Immunol.* **105**, 84-88.
- Balch,C.M. (1998) The John Wayne Clinical Research Lecture. Surgical management of melanoma: results of prospective randomized trials. *Ann. Surg. Oncol.* **5**, 301-309.
- Balch,C.M., Gershenwald,J.E., Soong,S.J., 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.Jr, Morton,D.L., Ross,M.I., Sober, A.J. y Sondak,V.K. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6199-6206.
- Baliña,L.M. y Graupe,K. (1991). The treatment of melasma. 20% azelaic acid versus 4% hydroquinone cream. *Int. J. Dermatol.* **30**, 893-895.
- Ballantyne,A.D. y Garnock-Jones,K.P. (2013) Dabrafenib: first global approval. *Drugs* **73**, 1367-1376.
- Bandgar,B.P., Totre,J.V., Gawande,S.S., Khobragade,C.N., Warangkar,S.C. y Kadam,P.D. (2010) Synthesis of novel 3,5-diaryl pyrazole derivatives using combinatorial chemistry as inhibitors of tyrosinase as well as potent anticancer, anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 6149-6155.
- Bao,K., Dai,Y., Zhu,Z.B., Tu,F.J., Zhang,W.G. y Yao,X.S. (2010) Design and synthesis of biphenyl derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 6708-6714.
- Barber,J.L., Townsend,D., Olds,D.P. y King,R.A. (1984) Dopachrome oxidoreductase: a new enzyme in the pigment pathway. *J. Invest. Dermatol.* **83**, 145-149.
- Barrenäs,M.L. y Holgers,K.M. (2000) Ototoxic interaction between noise and pheomelanin: distortion product otoacoustic emissions after acoustical trauma in chloroquine-treated red, black, and albino guinea pigs. *Audiology.* **39**, 238-246.
- Barsh,G.S. (1996) The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends. Genet.* **12**, 229-305.
- Basavegowda,N., Idhayadhulla,A. y Lee,Y.R. (2014) Preparation of Au and Ag nanoparticles using *Artemisia annua* and their in vitro antibacterial and tyrosinase inhibitory activities. *Mater Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.*, **43**, 58-64.
- Baynash,A.G., Hosoda,K., Giaid,A., Richardson,J.A., Emoto,N., Hammer,R.E. y Yanagisawa,M. (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**, 1277-1285.
- Bayramoglu,G., Akbulut,A. y Arica,M.Y (2013) Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* **244-248**:528-536.
- Baharav,E., Merimski,O., Shoenfeld,Y., Zigelman,R., Gilbrud,B., Yecheskel,G., Youinou,P. y Fishman,P. (1996) Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin. Exp. Immunol.* **105**, 84-88.
- Bécherel,P.A., Mossalayi,M.D., Ouaz,F., Le Goff,L., Dugas,B., Paul-Eugène,N., Frances,C., Chosidow,O., Kilchherr,E., Guillosson,J.J., Debré,P. y Arock,M. (1994) Involvement of cyclic AMP and nitric oxide in immunoglobulin E-dependent activation of Fc epsilon RII/CD23+ normal human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **93**, 2275-2279.
- Belleza,F., Cipiciani,A., Costantino,U. y Nicolis,S. (2004) Catalytic activity of myoglobin immobilized on zirconium phosphonates. *Langmuir* **20**, 5019-5025.

- Berrocal,A., Cabañas,L., Espinosa,E., Fernández-de-Misa,R., Martín-Algarra,S., Martínez-Cedres,J.C., Ríos-Buceta,L. y Rodríguez-Peralto,J.L. (2014) Melanoma: diagnosis, staging, and treatment. Consensus group recommendations. *Adv. Ther.* **31**, 945-960.
- Bertolino,F.A., De Vito,I.E., Messina,G.A., Fernández,H. y Raba,J. (2011) Microfluidic-enzymatic biosensor with immobilized tyrosinase for electrochemical detection of pipemic acid in pharmaceutical samples. *J. Electroanal. Chem.* **651**, 204-210.
- Bertolotto,C., Bille,K., Ortonne,J.P. y Ballotti,R. (1996) Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *Cell Sci.* **134**, 747-755.
- Bertolotto,C., Abbe,P., Hemesath,T.J., Bille,K., Fisher,D.E., Ortonne,J.P. y Balotti,R. (1998) Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* **142**, 827-835.
- Bertrand,G. (1896) Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxidant, d'origine végétale. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **122**, 1215-1217.
- Bhalla,A.K., Amento,E.P., Serog,B. y Glimcher,L.H. (1984) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *J. Immunol.* **133**, 1748-1754.
- Bhardwaj,R.S. y Luger,T.A. (1994) Proopiomelanocortin production by epidermal cells: evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* **28**, 785-790.
- Bieganski,A.T., Michota,A., Bukowska,J. y Jackowska, K. (2006) Immobilization of tyrosinase on poly(indole-5-carboxylic acid) evidenced by electrochemical and spectroscopic methods. *Bioelectrochemistry* **69**, 41-48.
- Billaud,C., Philippon,J. y Rouet-Mayer,M.A. (2003) Browning/Enzymatic-biochemical aspects. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, pp 678-686.
- Bissett,D.L., Miyamoto,K., Sun,P., Li,J. y Berge,C.A. (2004) Topical niacinamide reduces yellowing, wrinkling, red blotchiness, and hyperpigmented spots in aging facial skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **26**, 231-238.
- Blesch,A., Bosserhoff,A.K., Apfel,R., Behl,C., Hessdoerfer,B., Schmitt,A., Jachmiczad,P., Lottspeich,F., Buettner,R. y Bogdahn,U. (1994) Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* **54**, 5695-5701.
- Bogdahn,U., Apfel,R., Hahn,M., Gerlach,M., Behl,C., Hoppe,J. y Martín,R. (1989) Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res.* **49**, 5358-5363.
- Bono,A., Tolomio,E., Trincone,S., Bartoli,C., Tomatis,S., Carbone,A. y Santinami,M. (2006) Micro-melanoma detection: a clinical study on 206 consecutive cases of pigmented skin lesions with a diameter < or = 3mm. *Br. J. Dermatol.* **155**, 570-573.
- Boonstra,A., Barrat,F.J., Crain,C., Heath,V.L., Savelkoul,H.F. y O'Garra,A. (2001) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J. Immunol.* **167**, 4974-4980.
- Bordell,F.G. y Hughes,D.L. (1984) S_N2 Reactions of nitranions with benzyl chlorides. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 3234-3240.
- Botchkarev,V.A., Yaar,M., Peters,E.M., Raychaudhuri,S.P., Botchkareva,N.V., Marconi,A., Raychaudhuri,S.K., Paus,R. y Pincelli,C. (2006) Neurotrophins in skin biology and pathology. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1719-1727.
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-256.
- Brenner,M. y Hearing,V.J. (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem. Photobiol.* **84**, 539-549.
- Briganti,S., Camera,E. y Picardo,M. (2003) Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**, 101-110.
- Brossart,P., Keilholz,U., Willhauck,M., Scheibenbogen,C., Möhler,T. y Hunstein,W. (1993) Hematogenous spread of malignant melanoma cells in different stages of disease. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 887-889.

- Brown,D.A., Ren,W.Y., Khorlini,A., Lesiak,K., Conkin,D., Watanabe,K.A., Seidman,M.M. y George,J. (1998) Aliphatic and alicyclic diols induce melanogenesis in cultured cells and guinea pig skin. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 428-437.
- Brown,T., Zirvi,M., Cotsarelis,G. y Gelfand,J.M. (2005) Vitiligo-like hypopigmentation associated with imiquimod treatment of genital warts. *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**, 715-716.
- Bubacco,L., Salgado,J., Tepper,A.W., Vijgenboom,E. y Canters,G.W. (1999) ¹H NMR spectroscopy of the binuclear Cu(II) active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *FEBS Lett.* **442**, 215-220.
- Buitrago,E., Vuillamy,A., Boumendjel,A., Yi,W., Gellon,G., Hardré,R., Philouze,C., Serratrice,G., Jamet,H., Réglier,M. y Belle,C. (2014) Exploring the interaction of N/S compounds with a dicopper center: tyrosinase inhibition and model studies. *Inorg. Chem.* **53**, 12848-12858.
- Bukhari,S.N., Jantan,I., Unsal Tan,O., Sher,M., Naeem-UI-Hassan,M. y Qin,H.L. (2014) Biological activity and molecular docking studies of curcumin-related α,β -unsaturated carbonyl-based synthetic compounds as anticancer agents and mushroom tyrosinase inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 5538-5547.
- Burnett,J.B. (1971) The tyrosinases of mouse melanoma. Isolation and molecular properties. *J. Biol. Chem.* **246**, 3079-3091.
- Burton,K.S., Partis,M.D., Wood,D.A. y Thurston,C.F. (1997) Accumulation of serine proteinase in senescent sporophores of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* **10**, 146-152.
- Byers,H.R. y Bhawan,J. (1998) Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **12**, 717-735.
- Cabaj,J., Soloducho,J. y Swist,A. (2010) Active Langmuir-Schaefer films of tyrosinase-characteristic. *Sens. Actuators B* **150**, 505-512.
- Cabanes Domenech,A., Pérez-Gómez,B., Aragonés,N., Pollán,M. y López-Abente,G. (2009) La situación del cáncer en España, 1975-2006. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, Centro Nacional de Epidemiología ISCIII. Madrid.
- Cabanes,J., García-Cánovas,F., Lozano,J.A. y García-Carmona,F. (1987a) A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta* **923**, 187-195.
- Cabanes,J., García-Cánovas,F., Tudela,J., Lozano,J.A. y García-Carmona,F. (1987b) L-mimosine a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* **26**, 917-919.
- Cabanes,J., Chazarra,S. y García-Carmona,F. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982-985.
- Cabanes,J., Escribano,J., Gandía-Herrero,F., García-Carmona,F. y Jiménez-Atiénzar,M. (2007) Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10446-10451.
- Camand,O., Marchant,D., Boutboul,S., Péquignot,M., Odent,S., Dollfus,H., Sutherland,J., Levin,A., Menasche,M., Marsac,C., Dufier,J.L., Heon,E. y Abitbol,M. (2001) Mutation analysis of the tyrosinase gene in oculocutaneous albinism. *Hum. Mutat.* **17**, 352.
- Campbell,P.M. y Der,C.J. (2004) Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 105-114.
- Campora,E., Repetto,L., Giuntini,P., Bertelli,G., Amoroso,D., Sertoli,M.R. y Rosso,R. (1988) LDH in the follow-up of stage I malignant melanoma. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **24**, 277-278.
- Candille,S.I., Kaelin.C.B., Cattanaach,B.M., Yu,B., Thompson,D.A., Nix,M.A., Kerns,J.A., Schmutz,S.M., Millhauser,G.L. y Barsh,G.S. (2007) A-defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science* **318**, 1418-1423.
- Cardinali,G., Ceccarelli,S., Kovacs,D., Aspate,N., Lotti,L.V., Torrisi,M.R. y Picardo,M. (2005) Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 1190-1199.

- Carlson, J.A., Grabowski, R., Mu, X.C., Del Rosario, A., Malfetano, J. y Slominski, A. (2002) Possible mechanisms of hypopigmentation in *lichen sclerosus*. *Am. J. Dermatopathol.* **24**, 97-107.
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.D., Denat, L., Larue, L. y Goding, C.R. (2005) Mitf cooperates with Rbl and activates p21Cipl expression to regulate cell cycle progression. *Nature* **433**, 764-769.
- Carroll, J.M., Crompton, T., Seery, J.P. y Watt, F.M. (1997) Transgenic mice expressing IFN-gamma in the epidermis have eczema, hair hypopigmentation, and hair loss. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 412-422.
- Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M. y Freire, D.M.G. (2000) L-dopa production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84**, 791-800.
- Casañola-Martín, G.M., Marrero-Ponce, Y., Tareq-Hassan-Khan, M., Torrens, F., Pérez-Gimenez, F. y Rescigno, A. (2008) Atom- and bond-based 2D TOMOCOMD-CARDD approach and ligand-based virtual screening for the drug discovery of new tyrosinase inhibitors. *J. Biomol. Screen.* **13**, 1014-1024.
- Casañola-Martín, G.M., Marrero-Ponce, Y., Khan, M.T., Khan, S.B., Torrens, F., Perez-Jiménez, F., Rescigno, A. y Abad, C. (2010) Bond-based 2D quadratic fingerprints in QSAR studies: virtual and in vitro tyrosinase inhibitory activity elucidation. *Chem. Biol. Drug Des.* **76**, 538-545.
- Casanola-Martín, G.M., Le-Thi-Thu, H., Marrero-Ponce, Y., Castillo-Garit, J.A., Torrens, F., Rescigno, A., Abad, C. y Khan, M.T. (2014) Tyrosinase enzyme: 1. An overview on a pharmacological target. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1494-1501.
- Casas, J.L., García-Cánovas, F., Tudela, J. y Acosta, M. (1993) A kinetic study of simultaneous suicide inactivation and irreversible inhibition of an enzyme. Application to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase inactivation by its substrate S-adenosylmethionine. *J. Enzyme Inhib.* **7**, 1-14.
- Casella, L., Monzani, E., Gullotti, M., Cavagino, D., Cerina, G., Santagostini, L. y Ugo, R. (1996) Functional Modeling of Tyrosinase. Mechanism of Phenol *ortho*-Hydroxylation by Dinuclear Copper Complexes. *Inorg. Chem.* **35**, 7516-7525.
- Catalogo de Medicamentos. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid. 2010.
- Cerenius, L. y Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 116-126.
- Chan, R., Park, K.C., Lee, M.H., Lee, E.S., Chang, S.E., Leow, Y.H., Tay, Y.K., Legarda-Montinola, F., Tsai, R.Y., Tsai, T.H., Shek, S., Kerrouche, N., Thomas, G. y Verallo-Rowell, V. (2008) A randomized controlled trial of the efficacy and safety of a fixed triple combination (fluocinolone acetonide 0.01%, hydroquinone 4%, tretinoin 0.05%) compared with hydroquinone 4% cream in Asian patients with moderate to severe melasma. *Br. J. Dermatol.* **159**, 697-703.
- Chandra, M., Levitt, J. y Pensabene, C.A. (2012) Hydroquinone therapy for post-inflammatory hyperpigmentation secondary to acne: not just prescribable by dermatologists. *Acta Derm. Venereol.* **92**, 232-235.
- Chang, T.S. (2007) Two potent suicide substrates of mushroom tyrosinase: 7,8,4'-trihydroxyisoflavone and 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2010-2015.
- Chang, T.S. (2009) An update review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2440-2475.
- Chang, T.S. (2012) Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials* **5**, 1661-1685.
- Chang, T.S., Ding, H.Y. y Lin, H.C. (2005) Identifying 6,7,4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1999-2001.
- Chang, T.S., Lin, M.Y. y Lin, H.C. (2010) Identifying 8-hydroxynaringenin as a suicide substrate of mushroom tyrosinase. *J. Cosmet. Sci.* **61**, 205-210.
- Chang, T.S. y Wu, C.Y. (2008) Suicide substrate of tyrosinase and use thereof Patente N. US2008/0317692 A1.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Larkin, J.M.G., Haanen, J.B.A.G., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., Testori, A., Lorigan, P., Dummer, R., Sosman, J.A., Garbe, C., Maio, M., Nolop, K.B., Nelson, B.J., Joe, A.K.,

- Flaherty, K.T. y McArthur, G.A. (2012) Updated overall survival (OS) results for BRIM-3, a phase III randomized, open-label, multicenter trial comparing BRAF inhibitor vemurafenib (vem) with dacarbazine (DTIC) in previously untreated patients with BRAF(V600E)-mutated melanoma. *J. Clin. Oncol.* **30**, S 8502.
- Chavin, W., Jelonek, E.J., Reed, A.H. y Binder, L.R. (1980) Survival of mice receiving melanoma transplants is promoted by hydroquinone. *Science* **208**, 408-410.
- Chawla, S., deLong, M.A., Visscher, M.O., Wickett, R.R., Manga, P. y Boissy, R.E. (2008) Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. *Br. J. Dermatol.* **159**, 1267-1274.
- Cheema, S. y Sommerhalter, M. (2015) Characterization of polyphenol oxidase activity in *Ataulfo mango*. *Food Chem.* **171**, 382-387.
- Chen, G.H., Chen, W.M., Huang, Y.C. y Jiang, S.T. (2012) Expression of recombinant mature human tyrosinase from *Escherichia coli* and exhibition of its activity without phosphorylation or glycosylation. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 2838-2843.
- Chen, J. y Jin, Y. (2010) Sensitive phenol determination based on co-modifying tyrosinase and palygorskite on glassy carbon electrode. *Microchim. Acta* **169**, 249-254.
- Chen, J.S., Wei, C. y Marshall, M.R. (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
- Chen, L.Y., Chen, M.Y., Leu, W.M., Tsai, T.Y. y Lee, Y.H. (1993) Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator MelC1. MelC1 is likely a chaperone for apotyrosinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 18710-18716.
- Chen, W.C., Tseng, T.S., Hsiao, N.W., Lin, Y.L., Wen, Z.H., Tsai, C.C., Lee, Y.C., Lin, H.H. y Tsai, K.C. (2015) Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, T1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modeling. *Sci. Rep.* **5**, 7995. DOI: 10.1038/07995.
- Cheng, S., Zhang, Y.F., Zeng, Z.Q., Lin, J., Zhang, Y.W., Ni, H. y Li, H.H. (2015) Screening, separating, and completely recovering polyphenol oxidases and other biochemicals from sweet potato wastewater in starch production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1745-1753.
- Cheng, X., Huang, X., Liu, S., Tang, M., Hu, W. y Pan, S. (2014) Characterization of germin-like protein with polyphenol oxidase activity from *Satsuma mandarine*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **449**, 313-318.
- Chibata, I. (1978) *Immobilized enzymes: Research and development*. John Wiley & Sons, New York.
- Cho, M.H., Moinuddin, S.G., Helms, G.L., Hishiyama, S., Eichinger, D., Davin, L.B. y Lewis, N.G. (2003) (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10641-10646.
- Cho, S.J., Roh, J.S., Sun, W.S., Kim, S.H. y Park, K.D. (2006) N-Benzylbenzamides: a new class of potent tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2682-2684.
- Choi, H., Ahn, S., Lee, B.G., Chang, I. y Hwang, J.S. (2005) Inhibition of skin pigmentation by an extract of *Lepidium apetalum* and its possible implication in IL-6 mediated signaling. *Pigment Cell Res.* **18**, 439-446.
- Choi, Y.J., Rho, H.S., Baek, H.S., Hong, Y.D., Joo, Y.H., Shin, S.S. y Kim, J.M. (2014) Synthesis and biological evaluation of kojic acid derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bull. Korean Chem. Soc.* **35**, 3647-3650.
- Christopher, M.E., Miranda, M., Major, I.T. y Constabe, C.P. (2004) Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta* **219**, 936-947.
- Chu, H.L., Wang, B.S., Chang, L.C., Chang, L.W. y Duh, P.D. (2012) Effects of Captopril on Melanin Formation in B16 cells. *J. Food Drug Anal.* **20**, 668-673.
- Chuang, G.S., Chao, A.C., Chiou, M.S. y Shyu, S.S. (2005) Immobilization of tyrosinase on chitosan- An optimal approach to enhance the productivity of L-DOPA from L-tyrosine. *J. Chin. Chem. Soc.* **52**, 353-362.
- Clark, W.H.Jr., From, L., Bernardino, E.A. y Mihm, M.C. (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* **29**, 705-727.

- Clark,W.H.Jr., Elder,D.E. y Van Horn,M. (1986) The biologic forms of malignant melanoma. *Hum. Pathol.* **17**, 443-450.
- Claus,H. y Decker,H. (2006) Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 3-14.
- Criton,M. y Le Mellay-Hamon,V. (2008) Analogues of N-hydroxy-N'-phenylthiourea and N-hydroxy-N'-phenylurea as inhibitors of tyrosinase and melanin formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 3607-3610.
- Cuff,M.E., Miller,K.I., van Holde,K.E. y Hendrickson,W.A. (1998) Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.* **278**, 855-870.
- Cui,R., Widlund,H.R., Feige,E., Lin,J.Y., Wilensky,D.L., Igras,V.E., D'Orazio,J., Fung,C.Y., Schanbacher,C.F., Granter,S.R. y Fisher,D.E. (2007) Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853-864.
- Curry,B.J., Myers,K. y Hersey,P. (1998) Polymerase chain reaction detection of melanoma cells in the circulation: relation to clinical stage, surgical treatment, and recurrence from melanoma. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1760-1769.
- Curry,B.J., Myers,K. y Hersey,P. (1999) MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2562-2571.
- D'Angelo,S., Ingrosso,D., Migliardi,V., Sorrentino,A., Donnarumma,G., Baroni,A., Masella,L., Tufano,M.A., Zappia,M. y Galletti,P. (2005) Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 908-919.
- Dahl,C. y Guldberg,P. (2007) The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* **115**, 1161-1176.
- da Rocha Dias,S., Salmonson,T., van Zwieten-Boot,B., Jonsson,B., Marchetti,S., Schellens,J.H., Giuliani,R. y Pignatti,F. (2013) The European Medicines Agency review of vemurafenib (Zelboraf®) for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma: summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Eur. J. Cancer* **49**, 1654-1661.
- David,E.E., Rosalie,E., Adam,I.R., Michael,I., Jeffrey,M y O. Fred,M.III. (2013) Atlas and synopsis of Lever's Histopathology of the skin. Jonathan W. Pine Jr. (Ed.), Wolters Kluwer, Williams,L. & Wilkins. Philadelphia, pp. 1-10.
- Davis,EC. y Callender,V.D. (2010) Postinflammatory Hyperpigmentation, a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **3**, 20-31.
- deCaprio,A.P. (1999) The toxicology of hydroquinone-relevance to occupational and environmental exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* **29**, 283-330.
- Decareau,R.V. (1985) *Microwaves in the Food Processing Industry*. Academic Press: London.
- de Jesus Rivas,N. y Whitaker,J.R. (1973) Purification and some properties of two polyphenol oxidases from bartlett pears. *Plant Physiol.* **52**, 501-507.
- de Oliveira,K.B., Mischiatti,K.L., Fontana,J.D. y de Oliveira,B.H. (2014) Tyrosinase immobilized enzyme reactor: development and evaluation. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **945-946**;10-16.
- de Vries,E., Bray,F.I., Coebergh,J.W. y Parkin,D.M. (2003) Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int. J. Cancer* **107**,119-126.
- de Vries,E. y Coebergh,J.W. (2004) Cutaneous malignant melanoma in Europe. *Eur. J. Cancer* **40**, 2355-2366.
- Decker,H., Schweikardt,T. y Tuczec,F. (2006) The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 4546-4550.
- Deeth,J.D. y Diecrich,C. (2010) Structural and mechanistic insights into the oxy form of tyrosinase from molecular dynamics simulations. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 117-129.

- Della Longa,S., Ascone,I., Bianconi,A., Bonfigli,A., Castellano,A.C., Zaviri,O. y Miranda,M. (1996) The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **271**, 21025-21030.
- del Marmol,V. y Beerman,F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**, 161-168.
- Devece,C., Rodríguez-López,J.N., Fenoll,L.G., Tudela,J., Catalá,J.M., de Los Reyes,E. y García-Cánovas,F. (1999) Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4506-4511.
- Dietler,C. y Lerch,K. (1982) Oxidases and related redox systems. King,T.E., Mason,H.S. y Morrison,M. (Eds), Pergamon Press, New York. pp. 305-317.
- Dirinçer,A., Becerik,S. y Aydemir,T. (2012) Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 815-820.
- Dirks-Hofmeister,M.E., Kolkenbrock,S. y Moerschbacher,B.M. (2013) Parameters that enhance the bacterial expression of active plant polyphenol oxidases. *PLoS One* **8**, 77291. DOI: 10.1371/0077291.
- Domínguez-Renedo,M.A., Lomillo,A. y Arcos-Martínez,M.J. (2004) Optimisation procedure for the inhibitive determination of chromium(III) using an amperometric tyrosinase biosensor. *Anal. Chim. Acta* **521**, 215-221.
- Donato,L., Algieri,C., Miriello,V., Mazzei,R., Clarizia,G. y Giorno,L. (2012) Biocatalytic zeolite membrane for the production of L-DOPA. *J. Membr. Sci.* **407**, 86-92.
- Draelos,Z.D. (2007) Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatol. Ther.* **20**, 308-313.
- Draper,N.R. y Smith,H. (1981) *Applied Regression Analysis*. Wiley, New York.
- Du,J.Y., Miller,A.J., Widlund,H.R., Horstmann,M.A., Ramaswamy,S. y Fischer,D.E. (2003) MLANA/ MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am. J. Pathol.* **163**, 333-343.
- Du,J., Widlund,H.R., Horstmann,M.A., Ramaswamy,S., Ross,K., Huber,W.E., Nishimura,E.K., Golub,T.R. y Fisher,D.E. (2004) Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocytespecific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* **6**, 565-576.
- Duce,A.M. Patología quirúrgica. Editorial Elsevier España, 2004.
- Duckworth,H.W. y Coleman,J.E. (1970) Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **245**, 1613-1625.
- Dudley,E.D. y Hotchkiss,J.H. (1989) Cysteine as an inhibitor of polyphenol oxidase. *J. Food Biochem.* **13**, 65-75.
- Dummer,R., Panizzon,R., Bloch,P.H. y Burg,G. (2005) Updated Swiss guidelines for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. *Dermatology* **210**, 39-44.
- Durán,N., Rosa,M.A., D'Annibale,A. y Giafrenda,L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 907-931.
- Ebihara,M., Akiyama,M., Ohnishi,Y., Tajima,S., Komata,K. y Mitsui,Y. (2003) Lontophoresis promotes percutaneous absorption of L-ascorbic acid in rat skin. *J. Dermat. Sci.* **32**, 217-222.
- Eicken,C., Zippel,F., Büldt-Karentzopoulos,K. y Krebs,B. (1998) Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. *FEBS Lett.* **436**, 293-299.
- Eicken,C., Krebs,B. y Sacchettini,J.C. (1999) Catechol oxidase-structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 677-683.
- Eickman,N.C., Solomon,E.I., Larrabee,J.A., Spiro,T.G. y Lerch,K. (1978) Ultraviolet resonance Raman study of oxytyrosinase. Comparison with oxyhemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 6529-6531.

- Eickman, N.C., Himmelwright, R.S. y Solomon, E.I. (1979) Geometric and electronic structure of oxyhemocyanin: spectral and chemical correlations to met apo, half met, met, and dimer active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2094-2098.
- Eisen, T., Marais, R., Affolter, A., Lorigan, P., Robert, C., Corrie, P., Ottensmeier, C., Chevreau, C., Chao, D., Nathan, P.D., Jouary, T., Harries, M., Negrier, S., Montegriffo, E., Ahmad, T., Gibbens, I., James, M.G., Strauss, U.P., Prendergast, S. y Gore, M.E. (2011) Sorafenib and dacarbazine as first-line therapy for advanced melanoma: phase I and open-label phase II studies. *Br. J. Cancer* **105**, 353-359.
- Eller, M.S., Yaar, M. y Gilchrist, B.A. (1994) DNA damage and melanogenesis. *Nature* **372**, 413-414.
- Eller, M.S., Ostrom, K. y Gilchrist, B.A. (1996) DNA damage enhances melanogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1087-1092.
- Eller, M.S. y Gilchrist, B.A. (2000) Tanning as part of the eukaryotic SOS response. *Pigment Cell Res.* **8**, 94-97.
- Endrenyi, L. (Ed.) (1981) *Kinetic Data Analysis: Design and Analysis of Enzyme and Pharmacokinetics Experiments*. Plenum Press, New York.
- Ennes, S.B.P., Paschoalick, R.C. y Alchorne, M.M.D. (2000) A double-blind, comparative, placebo-controlled study of the efficacy and tolerability of 4% hydroquinone as a depigmenting agent in melasma. *J. Dermatol. Treat.* **11**, 173-179.
- Ensuncho, L., Álvarez-Cuenca, M. y Legge, R.L. (2005) Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**, 185-191.
- Ertam, I., Mutlu, B., Unal, I., Alper, S., Kivçak, B. y Ozer, O. (2008) Efficiency of ellagic acid and arbutin in melasma: a randomized, prospective, open-label study. *J. Dermatol.* **35**, 570-574.
- Escribano, J., Tudela, J., García-Carmona, F. y García-Cánovas, F. (1989) A kinetic study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions. Application to the suicide inactivation of tyrosinase. *Biochem. J.* **262**, 597-603.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1995) A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* **231**, 237-246.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1996) Continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenoloxidase. *J. Food. Sci.* **61**, 1177-1182.
- Espín, J.C., Varón, R., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1997) Kinetic study of the oxidation of 4-hydroxyanisole catalyzed by tyrosinase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 1265-1276.
- Espín, J.C., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1998a) Study of stereospecificity in pear and strawberry polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2469-2473.
- Espín, J.C., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1998b) Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochem. J.* **331**, 547-551.
- Espín, J.C., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1998c) 4-Hydroxyanisole: the most suitable monophenolic substrate for determining spectrophotometrically the monophenolase activity of polyphenol oxidase from fruits and vegetables. *Anal. Biochem.* **259**, 118-126.
- Espín, J.C. y Wichers, H.J. (1999a) Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3503-3508.
- Espín, J.C. y Wichers, H.J. (1999b) Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2638-2644.
- Espín, J.C., Veltman, R.H. y Wichers, H.J. (2000a) The oxidation of L-ascorbic acid catalysed by pear tyrosinase. *Physiol. Plant.* **109**, 1-6.

- Espín, J.C., Varón, R., Fenoll, L.G., Gilabert, M.A., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2000b) Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1270-1279.
- Espín, J.C. y Wichers, H.J. (2001) Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**, 289-300.
- Fabi, S.G. y Goldman, M.P. (2013) Comparative study of hydroquinone-free and hydroquinone-based hyperpigmentation regimens in treating facial hyperpigmentation and photoaging. *J. Drugs Dermatol.* **12**, S32-S37.
- Fais, A., Corda, M., Era, B., Fadda, M.B., Matos, M.J., Quezada, E., Santana, L., Picciau, C., Podda, G. y Delogu, G. (2009) Tyrosinase inhibitor activity of coumarin-resveratrol hybrids. *Molecules* **14**, 2514-2520.
- Fairhead, M. y Thöny-Meyer, L. (2010) Role of the C-terminal extension in a bacterial tyrosinase. *FEBS J.* **277**, 2083-2095.
- Fairhead, M. y Thöny-Meyer, L. (2012) Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *N. Biotechnol.* **29**, 183-191.
- Fan, Q., Jiang, H., Yuan, E.D., Zhang, J.X., Ning, Z.X., Qi, S.J. y Wei, Q.Y. (2012) Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of novel cinnamoyl amides with amino acid ester moiety. *Food Chem.* **134**, 1081-1087.
- Fan, Y. y Flurkey, W.H. (2004) Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. *Phytochemistry* **65**, 671-678.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Voudsen, K.H. y Weissman, A.M. (2000) MDM2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 8945-8951.
- Fang, Y., Chen, Y., Feng, G. y Ma, L. (2011) Benzyl benzoates: New phlorizin analogs as mushroom tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 1167-1171.
- Farnum, D.G. (1975) Charge density-NMR chemical shift correlations in organic ions. In: *Advances in Physical Organic Chemistry*, pp. 123-173.
- Farris, P.K. Cosmeceuticals: Vitamin C. In: Draeos ZD, Dover JS, Alam M, editors. *Cosmeceuticals. Procedures in Cosmetic Dermatology*. 2nd ed. New York: Saunders Elsevier; 2009. pp. 51-56.
- Farthmann, B., Eberle, J., Krasagakis, K., Gstöttner, M., Wang, N., Bisson, S. y Orfanos, C.E. (1998) RT-PCR for tyrosinase-mRNA-positive cells in peripheral blood: evaluation strategy and correlation with known prognostic markers in 123 melanoma patients. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 263-267.
- Fecker, L.F., Eberle, J., Orfanos, C.E. y Geilen, C.C. (2002) Inducible nitric oxide synthase is expressed in normal human melanocytes but not in melanoma cells in response to tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and lipopolysaccharide. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 1019-1025.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Sevilla, F., Tudela, J., García-Ruiz, P.A., Varón, R. y García-Cánovas, F. (2000a) Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5865-5878.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2000b) Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem.* **381**, 313-320.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2000c) Kinetic study of the oxidation of 3-hydroxyanisole catalysed by tyrosinase. *Biophys. Chem.* **84**, 65-76.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Sevilla, F., García-Ruiz, P.A., Varón, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2001) Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. *Biochim. Biophys. Acta* **1548**, 1-22.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Molina, F., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2002a) Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life.* **54**, 137-141.

- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2002b) Kinetic characterisation of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and L-tyrosine methyl ester/L-dopa methyl ester. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1594-1607.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Molina, F., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2002c) Michaelis constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 332-336.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2004a) Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and *o*-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* **380**, 643-650.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2004b) Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 235-226.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R. y Jimenez, A. (2002) Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two phase olive oil processing or "alperujo". *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6804-6811.
- Ferreira Cestari, T., Hassun, K., Sittart, A. y de Lourdes Viegas, M. (2007). A comparison of triple combination cream and hydroquinone 4% cream for the treatment of moderate to severe facial melasma. *J. Cosmet. Dermatol.* **6**, 36-39
- Ferrini, U., Mileo, A.M. y Hearing, V.J. (1987) Microheterogeneity of melanosome-bound tyrosinase from the Harding-Passey murine melanoma. *Int. J. Biochem.* **19**, 227-234.
- Finck, S.J., Giuliano, A.E. y Morton, D.L. (1983) LDH and melanoma. *Cancer* **51**, 840-843.
- Fiorentino, D., Gallone, A., Fiocco, D., Palazzo, G. y Mallardi, A. (2010) Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for *o*-diphenols. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2033-2037.
- Fistaro, S.K. e Itin, P.H. (2010) Disorders of pigmentation. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **8**, 187-201.
- Fitzpatrick, T.B., Johnson, R.A., Wolff, K. y Suurmond, D. (2001) Atlas en color y synopsis de dermatología clínica. 4eds. McGraw Hill, España, pp. 270-330.
- Flurkey, W.H. e Inlow, J.K. (2008) Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 2160-2170.
- Franco, D.C., de Carvalho, G.S., Rocha, P.R., da Silva Teixeira, R., da Silva, A.D. y Raposo, N.R. (2012) Inhibitory effects of resveratrol analogs on mushroom tyrosinase activity. *Molecules* **17**, 11816-11825.
- Frankos, V.H., Schmidt, D.F., Haws, L.C., McEvelly, A.J., Iyengar, R. y Miller, S.A. (1991) Generally recognised as safe (GRAS) evaluation of 4-hexylresorcinol for use for processing aid for prevention of melanosis in shrimp. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **14**, 202-212.
- Freeman, S.E., Hacham, H., Gange, R.W., Maytum, D.J., Sutherland, J.C. y Sutherland, B.M. (1989) Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5605-5609.
- Fu, X., Liu, W., Xie, F. y Xiao, R. (2014) Functions of retinoic acid on the biological characteristics of human embryonic stem cells. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* **30**, 191-196.
- Fujieda, N., Yabuta, S., Ikeda, T., Oyama, T., Muraki, N., Kurisu, G. e Itoh, S. (2013a) Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation. *J. Biol. Chem.* **288**, 22128-22140.
- Fujieda, N., Murata, M., Yabuta, S., Ikeda, T., Shimokawa, C., Nakamura, Y., Hata, Y. e Itoh, S. (2013b) Activation mechanism of melB tyrosinase from *Aspergillus oryzae* by acidic treatment. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 19-26.
- Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Iwanaga, S. y Ohnishi, E. (1995) Nucleotide-sequence of the cDNA-encoding the proenzyme of phenol oxidase A (1) of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7769-7773.

- Fuller,B.B., Niekrasz,I. y Hoganson,G.E. (1990) Down regulation of tyrosinase mRNA levels in melanoma cells by tumor promoters and by insulin. *Mol. Cell Endocrinol.* **72**, 81-87.
- Fuller,B.B., Spaulding,D.T. y Smith,D.R. (2001) Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. *Exp. Cell Res.* **262**, 197-208.
- Funasaka,Y., Mishima,Y., Ichihashi,M. y Sugiyama,T. (1988) Comparative analysis of oncogene expression and chromosome abnormalities between metastatic and nonmetastatic B16 melanoma clones. *Dermatologica* **177**, 200-211.
- Funasaka,Y., Chakraborty,A.K., Komoto,M., Ohashi,A. y Ichihashi M. (1999) The depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on human melanoma cells. *Br. J. Dermatol.* **141**, 20-29.
- Fusaro,R.M. y Johnson,J.A. (1975) Protection against long ultraviolet and/or visible light with topical dihydroxyacetone. Implications for the mechanism of action of the sunscreen combination, dihydroxyacetone/naphtoquinone. *Dermatologica* **150**, 346-351.
- Fusaro,R.M. y Lynch,H.T. (2000) The FAMMM syndrome: epidemiology and surveillance strategies. *Cancer Invest.* **18**, 670-680.
- Fuse,N., Yasumoto,K., Suzuki,H., Takahashi,K. y Shibahara,S. (1996) Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 702-707.
- Gabrilovich,D.I., Ostrand-Rosenberg,S. y Bronte,V. (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 253-268.
- Galindo,J.D., Pedreño,E., García-Carmona,F., García-Cánovas,F., Solano-Muñoz,F. y Lozano,J.A. (1983) Steady-state study of the mechanism of dopa-oxidase activity of tyrosinase. *Int. J. Biochem.* **15**, 1455-1461.
- Galván,I. y Moller,A.P. (2011) Brain size and the expression of pheomelanin-based colour in birds. *J. Evol. Biol.* **24**, 999-1006.
- Galván,I., Alonso-Alvarez,C. y Negro,J.J. (2012) Relationships between hair melanization, glutathione levels, and senescence in wild boars. *Physiol. Biochem. Zool.* **85**, 332-347.
- Gálvez,J. y Varón,R. (1981) Transient phase kinetics of enzyme reactions. *J. Theor. Biol.* **89**, 1-17.
- Gandía-Herrero,F., García-Carmona,F. y Escribano,J. (2004) Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 609-615.
- Gandía-Herrero,F., Escribano,J. y García-Carmona,F. (2005) Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxhantins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. *Planta* **222**, 307-316.
- Gantz,I., Munzert,G., Tashiro,T., Schäffer,M., Wang,L., DelValle,J. y Yamada,T. (1991) Molecular cloning of the human histamine H₂ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 1386-1392.
- Garbe,C., Hauschild,A., Volkenandt,M., Schadendorf,D., Stolz,W., Reinhold,U., Kortmann,R.D., Kettelhack,C., Frerich,B., Keilholz,U., Dummer,R., Sebastian,G., Tilgen,W., Schuler,G., Mackensen,A. y Kaufmann,R. (2008) Evidence-based and interdisciplinary consensus-based German guidelines: systemic medical treatment of melanoma in the adjuvant and palliative setting. *Melanoma Res.* **18**, 152-160.
- García-Borrón,J.C. y Solano,F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* **15**, 162-173.
- García-Cánovas,F., García-Carmona,F., Vera-Sánchez,J., Iborra,J.L. y Lozano,J.A. (1982) The role of pH in the melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **257**, 8738-8744.
- García-Cánovas,F., Tudela,J., Martínez-Madrid,C., Varón,R., García-Carmona,F. y Lozano,J.A. (1987) Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochim. Biophys. Acta.* **912**, 417-423.
- García-Cánovas,F., Tudela,J., Varón,R. y Vázquez,A.M. (1989) Experimental methods for kinetic study of suicide substrates. *J. Enzyme Inhib.* **3**, 81-90.

- García-Molina,F., Hiner,A.N.P., Fenoll,L.G., Rodríguez-López,J.N., García-Ruiz,P.A., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2005a) Mushroom tyrosinase: Catalase activity, inhibition, and suicide inactivation, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3702-3709.
- García-Molina,F., Fenoll,L.G., Morote,J.C., García-Ruiz,P.A., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2005b) Opposite effects of peroxidase in the initial stages of tyrosinase-catalysed melanin biosynthesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1179-1196.
- García-Molina,F., Peñalver,M.J., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2005c) Enzymatic method with polyphenol oxidase for the determination of cysteine and N-acetylcysteine. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6183-6189.
- García-Molina,F., Peñalver,M.J., Fenoll,L.G., Rodríguez-López,J.N., Varón,R., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2005d) Kinetic study of monophenol and o-diphenol binding to oxytyrosinase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **32**, 185-192.
- García-Molina,F., Muñoz-Muñoz,J.L., Varón,R., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2007a) A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9739-9749.
- García-Molina,F., Muñoz-Muñoz,J.L., Varón,R., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2007b) Effect of tetrahydropteridines on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **22**, 383-94.
- García-Molina,F., Muñoz-Muñoz,J.L., Acosta,J.R., García-Ruiz,P.A., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López, J.N. (2009) Melanogenesis inhibition by tetrahydropterines. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 1766-1774.
- García-Molina,F., Muñoz-Muñoz,J.L., Martínez-Ortiz,F., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2010a) Effects of tetrahydropterines on the generation of quinones catalyzed by tyrosinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1108-1109.
- García-Molina,F., Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,M., García-Ruiz,P.A., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2010b) Melanogenesis inhibition due to NADH. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1777-1787.
- García-Molina,F., Muñoz-Muñoz,J.L., Martínez-Ortiz,F., García-Ruiz,P.A., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2011) Tetrahydrofolic acid is a potent suicide substrate of mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1383-1391.
- García-Molina,M., Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., García-Ruiz,P.A. y García-Cánovas F. (2012) Action of tyrosinase on ortho-substituted phenols: possible influence on browning and melanogenesis. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 6447-6453.
- García-Molina,M., Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., Rodríguez-López,J.N. y García-Cánovas,F. (2013a) Study of umbelliferone hydroxylation to esculetin catalyzed by polyphenol oxidase. *Biol. Pharm. Bull.* **36**,1140-1145.
- García-Molina,M., Muñoz-Muñoz,J.L., Berna,J., Rodríguez-López,J.N., Varón,R. y García-Cánovas,F. (2013b) Hydrogen peroxide helps in the identification of monophenols as possible substrates of tyrosinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 2383-2388.
- García-Molina,M., Muñoz-Muñoz,J.L., Martínez-Ortiz,F., Martínez,J.R., García-Ruiz,P.A., Rodríguez-López,J.N. y García-Cánovas,F. (2014a) Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of hydroquinone, a depigmenting agent, to hydroxyhydroquinone: A kinetic study. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 3360-3369.
- García-Molina,M., Muñoz-Muñoz,J.L., Berna,J., García-Ruiz,P.A., Rodríguez-López,J.N. y García-Cánovas,F. (2014b) Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on hydroxyhydroquinone. *IUBMB Life* **66**, 122-127.
- García-Molina,M., Berna,J., Muñoz-Muñoz,J.L., García-Ruiz,P.A., Moreno,M.G., Martínez,J.R. y García-Cánovas,F. (2014c) Action of tyrosinase on hydroquinone in the presence of catalytic amounts of o-diphenol. A kinetic study. *Reac. Kinet. Mech. and Cat.* **112**, 305-320.
- García-Moreno,M., Rodríguez-López,J.N., Martínez-Ortiz,F., Tudela,J., Varón,R. y García-Cánovas,F. (1991) Effect of pH on the oxidation pathway of dopamine catalyzed by tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 427-434.

- García-Ruiz,P.A., García-Cánovas,F. y Marín-Zamora,M.E. (2009) *Procedimiento de obtención de o-difenoles*. Patente ES2301453B1.
- García-Sevilla,F., Garrido-del Solo,C., Duggleby,R.G., Garcia-Cánovas,F., Peyro,R. y Varon,R. (2000) Use of a windows program for simulation of the progress curves of reactants and intermediates involved in enzyme-catalyzed reactions. *BioSystems* **54**, 151-164.
- Gasowska,B., Kafarski,P. y Wojtasek,H. (2004) Interaction of mushroom tyrosinase with aromatic amines, *o*-diamines and *o*-aminophenols. *Biochim. Biophys. Acta* **1673**, 170-177.
- Gasparetti,C., Faccio,G., Arvas,M., Buchert,J., Saloheimo,M. y Kruus,K. (2010) Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 213-226.
- Gates,R.R. y Zimmermann,A.A. (1953) Comparison of skin color with melanin content. *J. Invest. Dermatol.* **21**, 339-348.
- Gençer,N., Demir,D., Sonmez,F. y Kucukislamoglu,M. (2012) New saccharin derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 2811-2821.
- Gerald,C.F. y Wheatley, P.O. (1989) *Applied numerical analysis. Fourth edition*. Addison Wesley P. C., New York.
- Gerdemann,C., Eicken,C., Magrini,A., Meyer,H.E., Rompel,A., Spener,F. y Krebs,B. (2001) Isozymes of *Ipomoea batatas* catechol oxidase differ in catalase-like activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1548**, 94-105.
- Gerdemann,C., Eicken,C. y Krebs,B. (2002) The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* **35**, 183-191.
- Gerritsen,Y.A.M., Chapelon,C.G.J. y Wichers,H.J. (1994) The low-isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. *Phytochemistry* **35**, 573-577.
- Ghanbari,F., Rowland-Yeo,K., Bloomer,J.C., Clarke,S.E., Lennard,M.S., Tucker,G.T. y Rostami-Hodjegan,A. (2006) A critical evaluation of the experimental design of studies of mechanism based enzyme inhibition, with implications for in vitro-in vivo extrapolation. *Curr. Drug Metab.* **7**, 315-334.
- Ghani,U. y Ullah,N. (2010) New potent inhibitors of tyrosinase: novel clues to binding of 1,3,4-thiadiazole-2(3H)-thiones, 1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thiones, 4-amino-1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, and substituted hydrazides to the dicopper active site. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 4042-4048.
- Gheibi,N., Saboury,A.A. y Haghbeen,K. (2006) Substrate construes the copper and nickel ions impacts on the mushroom tyrosinase activities. *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**, 642-648.
- Gheibi,N., Saboury,A.A. y Sarreshtehdari,M. (2011) Non-essential activation of Co(2+) and Zn(2+) on mushroom tyrosinase: kinetic and structural stability. *Bull. Korean Chem. Soc.* **32**, 1500-1506.
- Giehl,K. (2005) Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. *Biol. Chem.* **386**, 193-205.
- Gilchrest,B.A., Park,H.Y., Eller,M.S. y Year,M. (1996) Mechanisms of ultraviolet light induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.* **63**, 1-10.
- Gillbro,J.M., Marles,L.K., Hibberts,N.A. y Schallreuter,K.U. (2004) Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 346-353.
- Gillbro,J.M. y Olsson,M.J. (2011) The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing and new approaches. *Int. J. Cosmet. Sci.* **33**, 210-221.
- Girelli,A.M., Mattei,E., Messina,A. y Papaleo,D. (2007) Immobilization of mushroom tyrosinase on controlled pore glass: Effect of chemical modification. *Sens. Actuators B* **125**, 48-54.
- Gläser,R., Rass,K., Seiter,S., Hauschild,A., Christophers,E. y Tilgen,W. (1997) Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two-center study. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2818-2825.

- Goding,C.R. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* **14**, 1712-1728.
- Goldfeder,M., Kanteev,M., Isaschar-Ovdat,S., Adir,N. y Fishman,A. (2014) Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nat. Commun.* **5**, 4505. DOI: 10.1038/5505.
- Gómez-López,V.M. (2002) Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. *Food Chem.* **77**, 163-169.
- Gorman,S., Kuritzky,L.A., Judge,M.A., Dixon,K.M., McGlade,J.P., Mason,R.S., Finlay-Jones,J.J. y Hart,P.H. (2007) Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes. *J. Immunol.* **179**, 6273-6283.
- Goulart,P.D.P., Alves,J.D., Magalhaes,M.M., Lima,L.C.D. y Meyer,L.E. (2003) Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits. *Food Chem.* **83**, 7-11.
- Grando,S.A., Pittelkow,M.R. y Schallreuter,K.U. (2006) Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1948-1965.
- Gray-Schopfer,V., Wellbrock,C. y Marais,R. (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **22**, 851-857.
- Greaves,M. (2014) Was skin cancer a selective force for black pigmentation in early hominin evolution? *Proc. Biol. Sci.* **281**, 20132955.
- Griffith,O.W. y Meister,A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthione sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* **254**, 7558-7560.
- Griffith,O.W. (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* **257**, 13704-13712.
- Griffiths,C.E., Finkel,L.J., Ditre,C.M., Hamilton,T.A., Ellis,C.N. y Voorhees,J.J. (1993) Topical tretinoin (retinoic acid) improves melasma. A vehicle-controlled, clinical trial. *Br. J. Dermatol.* **129**, 415-421.
- Grimes,P.E. (2009) Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **28**, 77-85.
- Gu,B.X., Xu,C.X., Zhu,G.P., Liu,S.Q., Chen,L.Y. y Li,X.S. (2009) Tyrosinase Immobilization on ZnO Nanorods for Phenol Detection. *J. Phys. Chem.* **113**, 377-381.
- Guazzaroni,M., Crestini,C. y Saladino,R. (2012a) Layer-by-layer coated tyrosinase: An efficient and selective synthesis of catechols. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 157-166.
- Guazzaroni,M., Pasqualini,M., Botta,G. y Saladino,R. (2012b) A novel synthesis of bioactive catechols by layer-by-layer immobilized tyrosinase in an organic solvent medium. *Chem. Cat. Chem.* **4**, 89-99.
- Günther,H. (1980) Nuclear magnetic resonance of fluorine-19 and carbon-13 En: *NMR Spectroscopy*, pp. 364-374.
- Guo,H.B., Stoffel-Wagner,B., Bierwirth,T., Mezger,J. y Klingmüller,D. (1995) Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* **31A**, 924-928.
- Ha,M.H., Park,Y.J., Lee,J.Y., Park,D., Choi,Y.J., Lee,E.K., Kim,J.M., Kim,J.A., Park,J.Y., Lee,H.J., Moon,H.R. y Chung,H.Y. (2012a) Design, synthesis and biological evaluation of 2-(substituted phenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid derivatives as novel tyrosinase inhibitors. *Biochimie* **94**, 533-540.
- Ha,M.H., Park,Y.J., Kim,J.A., Park,D., Park,J.Y., Lee,H.J., Lee,J.Y., Moon,H.R. y Chung,H.Y. (2012b) Design and synthesis of 5-(substituted benzylidene)thiazolidine-2,4-dione derivatives as novel tyrosinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **49**, 245-252.
- Haddad,A.L., Matos,L.F., Brunstein,F., Ferreira,L.M., Silva,A. y Costa,D.Jr. (2003) A clinical, prospective, randomized, double-blind trial comparing skin whitening complex with hydroquinone vs. placebo in the treatment of melasma. *Int. J. Dermatol.* **42**, 153-156.

- Hakozaki,T., Minwalla,L., Zhuang,J., Chhoa,M., Matsubara,A., Miyamoto,K., Greatens,A., Hillebrand,G.G., Bissett,D.L. y Boissy,R.E. (2002) The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br. J. Dermatol.* **147**, 20-31.
- Hakulinen,N., Gasparetti,C., Kaljunen,H., Kruus,K. y Rouvinen,J. (2013) The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus *Aspergillus oryzae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 917-929.
- Halaban,R., Ghosh,S. y Baird,A. (1987) bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **23**, 47-52.
- Halaban,R., Langdon,R., Birchall,N., Cuono,C., Baird,A., Scott,G., Moellmann,G. y McGuire,J. (1988) Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J. Cell Biol.* **107**, 1611-1619.
- Halaouli,S., Asther,M., Kruus,K., Guo,L., Hamdi,M., Sigoillot,J.C., Asther,M. y Lomascolo,A. (2005) Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 332-343.
- Halaouli,S., Asther,M., Sigoillot,J.C., Hamdi,M. y Lomascolo,A. (2006) Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 219-232.
- Halder,R.M. y Bang,K.M. (1988) Skin cancer in blacks in the United States. *Dermatol. Clin.* **6**, 397-405.
- Halder,R.M. y Richards,G.M. (2004) Topical agents used in the management of hyperpigmentation. *Skin Therapy Lett.* **9**, 1-3.
- Hall,M., Scott,T., Sugumaran,M., Söderhäll,K. y Law,J.H. (1995) Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7764-7768.
- Han,R., Cui,L., Ai,S., Yin,H., Liu,X. y Qiu,Y. (2012) Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrocalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. *J. Solid State Electrochem.* **16**, 449-456.
- Hanifah,S.A., Heng,L.Y. y Ahmad,M. (2009) Biosensors for phenolic compounds by immobilization of tyrosinase in photocurable methacrylic-acrylic membranes of varying hydrophilicities. *Anal. Sci.* **25**, 779-784.
- Hansen,L.A., Monteiro-Riviere,N.A. y Smart,R.C. (1990) Differential down-regulation of epidermal protein kinase C by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and diacylglycerol: association with epidermal hyperplasia and tumor promotion. *Cancer Res.* **50**, 5740-5745.
- Hara,M., Yaar,M. y Gilchrist,B.A. (1995) Endothelin-1 of keratinocyte origin is a mediator of melanocyte dendricity. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 744-748.
- Hara,M., Yaar,M., Byers,H.R., Goukassian,D., Fine,R.E., Gonsalves,J. y Gilchrist,B.A. (2000) Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 438-443.
- Hartmeyer,M., Scholzen,T., Becher,E., Bhardwaj,R.S., Schwarz,T. y Luger,T.A. (1997) Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J. Immunol.* **159**, 1930-1937.
- Hauschild,A., Agarwala,S.S., Trefzer,U., Hogg,D., Robert,C., Hersey,P., Eggermont,A., Grabbe,S., Gonzalez,R., Gille,J., Peschel,C., Schadendorf,D., Garbe,C., O'Day,S., Daud,A., White,J.M., Xia,C., Patel,K., Kirkwood,J.M. y Keilholz,U. (2009) Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2823-2830.
- Hauschild,A., Grob,J.J., Demidov,L.V., Jouary,T., Gutzmer,R., Millward,M., Rutkowski,P., Blank,C.U., Miller,W.H.Jr., Kaempgen,E., Martín-Algarra,S., Karaszewska,B., Mauch,C., Chiarion-Sileni,V., Martin,A.M., Swann,S., Haney,P., Mirakhur,B., Guckert,M.E., Goodman,V. y Chapman,P.B. (2012) Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **380**, 358-365.
- Hayaishi,O. (1962) Oxygenases (Hayaishi,O. Ed). Academic Press, New York.p 1.
- Hayaishi,O. (1974) Molecular mechanism of oxygen activation. Academic Press, New York.

- Hearing,V.J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 24-48.
- Hearing,V.J. (2005) Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.* **37**, 3-14.
- Hearing,V.J. y Ekel,T.M. (1976) Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* **157**, 549-557.
- Hearing,V.J., Ekel,T.M. y Montague,P.M. (1981) Mammalian tyrosinase: isozymic forms of the enzyme. *Int. J. Biochem.* **13**, 99-103.
- Hearing,V.J. y Jiménez,M. (1987) Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **19**, 1141-1147.
- Hearing,V.J. y Tsukamoto,K. (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902-2909.
- Heck,D.E., Laskin,D.L., Gardner,C.R. y Laskin,J.D. (1992) Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J. Biol. Chem.* **267**, 21277-21280.
- Heinrich,M.C., Rubin,B.P., Longley,B.J. y Fletcher,J.A. (2002) Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum. Pathol.* **33**, 484-495.
- Hemesath,T.J., Price,E.R., Takemoto,C., Badalian,T. y Fisher,D.E. (1998) MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**, 298-301.
- Hernández-Romero,D., Solano,F. y Sánchez-Amat,A. (2005) Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6808-6815.
- Hernández-Romero,D., Sánchez-Amat,A. y Solano,F. (2006) A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. *FEBS J.* **273**, 257-270.
- Herráiz,C., Journé,F., Abdel-Malek,Z., Ghanem,G., Jiménez-Cervantes,C. y García-Borrón,J.C. (2011b) Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT. *Mol. Endocrinol.* **25**, 138-156.
- Hershkovitz,D. y Sprecher,E. (2008) Monogenic pigmentary skin disorders:genetics and pathophysiology. *Isr. Med. Assoc. J.* **10**, 713-717.
- Hewison,M., Hollis,B.W., Adams,J.S., Bloom,B.R. y Modlin,R.L. (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**, 1770-1773.
- Himmelwright,R.S., Eickman,N.C., LuBien,C.D., Solomon,E.I. y Lerch,K. (1980) Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of Neurospora tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7339-7344.
- Hiner,A.N., Hernandez-Ruiz,J., Arnao,M.B., García-Canovas,F. y Acosta,M. (1996) A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 655-662.
- Hirota,S., Kawahara,T., Lonardi,E., de Waal,E., Funasaki,N. y Canters,G.W. (2005) Oxygen binding to tyrosinase *streptomyces antibioticus* studied by laser flash photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17966-17967.
- Hirsch,J.A. (1972) Concepts en: *Theoretical Organic Chemistry*, Vol. 11, Allyn and Bacon Inc. Boston. pp. 184-189.
- Ho,P.Y., Chiou,M.S. y Chao,A.C. (2003) Production of L-dopa by tyrosinase immobilized on modified polystyrene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **111**, 139-152.
- Hoek,K.S. (2007) DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment. Cell Res.* **20**, 466-484.

- Hoek,K.S., Eichhoff,O.M., Schlegel,N.C., Döbbling,U., Kobert,N., Schaerer,L., Hemmi,S. y Dummer,R. (2008) In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res.* **68**, 650-656.
- Hoganson,G.E., Ledwitz-Rigby,F., Davidson,R.L. y Fuller,B.B. (1989) Regulation of tyrosinase mRNA levels in mouse melanoma cell clones by melanocyte-stimulating hormone and cyclic AMP. *Somat. Cell Mol. Genet.* **15**, 255-263.
- Hohn,A., Leibrock,J., Bailey,K. y Barde,Y.A. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**, 339-341.
- Hoon,D.S., Wang,Y., Dale,P.S., Conrad,A.J., Schmid,P., Garrison,D., Kuo,C., Foshag,L.J., Nizze,A.J. y Morton,D.L. (1995) Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Oncol.* **13**, 2109-2116.
- Hosada,K., Hammer,R.E., Richardson,J.A., Baynash,A.G., Cheung,J.C., Giaid,A. y 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**,1267-1276.
- Hosseinkhani,S. y Nemat-Gorgani,M. (2003) Partially unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 179-184.
- Houben,R., Schmid,C.P., Maier,M., Wobser,M., Motschenbacher,S., Becker,J.C., Vetter-Kauczok,C.S., Weyandt,G., Hesbacher,S. y Haferkamp,S. (2014) p53 regulation by TRP2 is not pervasive in melanoma. *PLoS One.* **9**, e87440. DOI: 10.1371/0087440.
- Hsiao,N.W., Tseng,T.S., Lee,Y.C., Chen,W.C., Lin,H.H., Chen,Y.R., Wang,Y.T., Hsu,H.J. y Tsai,K.C. (2014) Serendipitous discovery of short peptides from natural products as tyrosinase inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 3099-3111.
- Hsu,A.F., Shieh,J.J., Bills,D.D. y White,K. (1988) Inhibition of mushroom polyphenoloxidase by ascorbic-acid derivatives. *J. Food Sci.* **53**,765.
- Hughes,A.E., Newton,V.E., Liu,X.Z. y Read,A.P. (1994) A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-pl4.l. *Nat. Genet.* **7**, 509-512.
- Huh,S.Y., Shin,J.W., Na,J.I., Huh,C.H., Youn,S.W. y Park,K.C. (2010a). The efficacy and safety of 4-n-butylresorcinol 0.1% cream for the treatment of melasma: a randomized controlled split-face trial. *Ann. Dermatol.* **22**, 21-25.
- Huh,S.Y., Shin,J.W., Na,J.I., Huh,C.H., Youn,S.W. y Park,K.C. (2010b) Efficacy and safety of liposome-encapsulated 4-n-butylresorcinol 0.1% cream for the treatment of melasma: a randomized controlled split-face trial. *J. Dermatol.* **37**, 311-315.
- Ichihashi,M., Ahmed,N.U., Budiyanto,A., Wu,A., Bito,T., Ueda,M. y Osawa,T. (2000) Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice. *J. Dermatol. Sci.* **1**, S45-S50.
- Iizumi,K., Kotani,T., Nishimoto,Y. y Tsuchida,T. (1991) Production of L-3,4-dihydroxyphenylalanine. Japan Patent JP5123177A.
- Imokawa,G., Yada,Y. y Miyagishi,M. (1992) Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 24675-24680.
- Ingraham,L.L., Corse,J. y Makower,B. (1952) Enzymatic browning of fruits. III. Kinetics of the reaction inactivation of polyphenoloxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2623-2626.
- Ismaya,W.T., Rozeboom,H.J., Wejin,A., Mes,J.J., Fusetti,F., Wichers,H.J. y Dijkstra,B.W. (2011a) Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* **50**, 5477-5486.
- Ismaya,W.T., Rozeboom,H.J., Schrink,M., Boering,C.G., Wichers,H.J. y Dijkstra,B.W. (2011b) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tyrosinase from the mushroom *Agaricus bisporus*. *Acta Crystallogra. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 575-578.

- Ito, S. y Fujita, K. (1985) Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas by chemical degradation and liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **144**, 527-536.
- Ito, M. y Oda, K. (2000) An organic solvent resistant tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21: purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 261-267.
- Iwata, M., Corn, T., Iwata, S., Everett, M.A. y Fuller, B.B. (1990) The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 9-15.
- Jackman, M.P., Huber, M., Hajnal, A. y Lerch, K. (1992) Stabilization of the oxy form of tyrosinase by a single conservative amino acid substitution. *Biochem. J.* **282**, 915-918.
- Jackson, I.J. (1994) Evolution and expression of tyrosinase-related proteins. *Pigment Cell Res.* **7**, 241-242.
- Jaenicke, E., Büchler, K., Decker, H., Markl, J. y Schröder, G.F. (2011) The refined structure of functional unit h of keyhole limpet hemocyanin (KLH1-h) reveals disulfide bridges. *IUBMB Life* **63**, 183-187.
- Jappe, U., Geier, J. y Hausen, B.M. (2005) Contact vitiligo following a strong patch test reaction to triglycidyl-p-aminophenol in an aircraft industry worker: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis* **53**, 89-92.
- Jimbow, K., Fitzpatrick, T.B. y Wick, M.M. (1991) Biochemistry and physiology of melanin pigmentation. En: *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*, Goldsmith L.A. (Ed.) Oxford University Press, New York, pp. 873-909.
- Jimbow, K., Quevedo, W.C.Jr., Fitzpatrick, T.B. y Szabo, G. (1993) Biology of melanocytes. En: *Dermatology in general medicine*. Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., Fredberg, I.M. y Austen, K.F. (Eds), Mc Graw-Hill, New York, pp. 261-289.
- Jimbow, K., Hara, H., Vinayagamoorthy, T., Luo, D., Dakour, J., Yamada, K., Dixon, W. y Chen, H. (1994) Molecular control of melanogenesis in malignant melanoma: functional assessment of tyrosinase and lamp gene families by UV exposure and gene co-transfection, and cloning of a cDNA encoding calnexin, a possible melanogenesis "chaperone". *J. Dermatol.* **21**, 894-906.
- Jimbow, K., Gómez, P.F., Toyofuku, K., Chang, D., Miura, S., Tsujiya, H. y Park, J.S. (1997) Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from TGN to stage I melanosoma, late endosome, through gene transfection study. *Pigment Cell Res.* **10**, 206-213.
- Jiménez-Atienzar, M., Pedreño, M.A. y García-Carmona, F. (1991) Activation of polyphenol oxidase by polyamines. *Biochem. Int.* **25**, 861-868.
- Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V.J., Lozano, J.A. y García-Borrón, J.C. (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1). *J. Biol. Chem.* **269**, 17993-18000.
- Jiménez, M., García-Cánovas, F., García-Carmona, F., Tudela, J. e Iborra, J.L. (1986) Study of alpha-methyl dopa oxidation by tyrosinase. *Int. J. Biochem.* **18**, 39-47.
- Jiménez, M. y García-Carmona, F. (1996) Hydrogen peroxide-dependent 4-t-butylphenol hydroxylation by tyrosinase-a new catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1297**, 33-39.
- Jiménez, M. y García-Carmona, F. (2000) Hydroxylating activity of tyrosinase and its dependence on hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 255-260.
- Jin, Y.H., Lee, S.J., Chung, M.H., Park, J.H., Park, Y.I., Cho, T.H. y Lee, S.K. (1999) Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* **22**, 232-236.
- Jolivet, J., Arpin, N., Wichers, H.J. y Pellon, G. (1998) *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* **102**, 1459-1483.
- Jolley, R.L.Jr., Evans, L.H., Makino, N. y Mason, H.S. (1974) Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.* **249**, 335-345.
- Jones, K., Hughes, J., Hong, M., Jia, Q. y Orndorff, S. (2002) Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* **15**, 335-340.

- Jordan,A.M., Khan,T.H., Osborn,H.M.I., Photiou,A. y Riley,P.A. (1999) Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of a targeted treatment for malignant melanoma. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 1775-1780.
- Jordan,A.M., Khan,T.H., Malkin,H., Osborn,H.M.I., Photiou,A. y Riley,P.A. (2001) Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of second generation prodrugs for targeted treatment of malignant melanoma. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 1549-1558.
- Joshi,M., Strandhoy,J. y White,W.L. (1996) Nitric oxide synthase activity is up-regulated in melanoma cell lines: a potential mechanism for metastasis formation. *Melanoma Res.* **6**, 121-126.
- Joy,R.W., Sugiyama,M., Fukuda,H. y Komamine,A. (1995) Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* **107**, 1083-1089.
- Kadekaro,A.L., Kanto,H., Kavanagh,R. y Abdel-Malek,Z.A. (2003) Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **994**, 359-365.
- Kageyama,A., Oka,M., Okada,T., Nakamura,S., Ueyama,T., Saito,N., Hearing,V.J., Ichihashi,M. y Nishigori,C. (2004) Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 27774-27780.
- Kaintz,C., Mauracher,S.G. y Rompel,A. (2014a) Type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **97**, 1-35.
- Kaintz,C., Molitor,C., Thill,J., Kampatsikas,I., Michael,C., Halbwirth,H. y Rompel,A. (2014b) Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. *FEBS Lett.* **588**, 3417-3426.
- Kalka,K., Mukhtar,H., Turowski-Wanke,A. y Merk,H. (2000) Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **13**, 143-149.
- Kampmann,M., Boll,S., Kossuch,J., Bielecki,J., Uhl,S., Kleiner,B. y Wichmann,R. (2014) Efficient immobilization of mushroom tyrosinase utilizing whole cells from *Agaricus bisporus* and its application for degradation of bisphenol A. *Water Res.* **57**, 295-303.
- Kanteev,M., Goldfeder,M., Chojnacki,M., Adir,N. y Fishman,A. (2013) The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 895-903.
- Karim,M.N., Lee,J.E. y Lee,H.J. (2014) Amperometric detection of catechol using tyrosinase modified electrodes enhanced by the layer-by-layer assembly of gold nanocubes and polyelectrolytes. *Biosens. Bioelectron.* **61**, 147-151.
- Karlin,K.D., Lee,D.H., Obias,H.V. y Humphreys,K.J. (1998) Copper-dioxygen complexes: Functional models for proteins. *Pure Appl. Chem.* **70**, 855-862.
- Katayama,T., Suzuki,H., Koyanagi,T. y Kumagai,H. (2000) Cloning and random mutagenesis of the *Erwinia herbicola* tyrR gene for high-level expression of tyrosine phenol-lyase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4764-4771.
- Katsambas,A. y Antoniou,C. (1995) Melasma. Classification and treatment. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **4**, 217-223.
- Katsambas,A.D., Stratigos,A.J. y Lotti,T.M. (2003) Melasma. In: Katsambas,A.D., Lotti,T.M., editors. *European Handbook of Dermatological Treatments*. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer; 2003: 336-341.
- Kauser,S., Schallreuter,K.U., Thody,A.J., Gummer,C. y Tobin,D.J. (2003) Regulation of human epidermal melanocyte biology by beta-endorphin. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 1073-1080.
- Kavrayan,D. y Aydemir,T. (2001) Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chem.* **74**, 147-154.
- Kawamura-Konishi,Y., Tsuji,M., Hatana,S., Asanuma,M., Kakuta,D., Kawano,T., Mukoyama,E.B., Goto,H. y Suzuki,H. (2007) Purification, characterization, and molecular cloning of tyrosinase from *Pholiota nameko*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1752-1760.

- Keilin,D. y Mann,T. (1938) Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **125**, 187-205.
- Khlgatian,M.K., Hadshiew,I.M., Asawanonda,P., Yaar,M., Eller,M.S., Fujita,M., Norris,D.A. y Gilchrist,B.A. (2002) Tyrosinase gene expression is regulated by p53. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 126-132.
- Kim,D.S., Kim,S.Y., Chung,J.H., Kim,K.H., Eun,H.C. y Park,K.C. (2002) Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal* **14**, 779-785.
- Kim,D.S., Park,S.H. y Park,K.C. (2004a) Transforming growth factor-beta1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1482-1491.
- Kim,D.S., Park,S.H., Kwon,S.B., Youn,S.W. y Park,K.C. (2004b) Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chem. Phys. Lipids* **127**, 199-206.
- Kim,D.S., Park,S.H., Kwon,S.B., Park,E.-S., Huh,C.-H., Youn,S.W. y Park,K.C. (2005) Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **19**, 146-153.
- Kim,H., Choi,J., Cho,J.K., Kim,S.Y. y Lee,Y.S. (2004) Solid-phase synthesis of kojic acid-tripeptides and their tyrosinase inhibitory activity, storage stability, and toxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2843-2846.
- Kim,H.J., Seo,S.H., Lee,B.G. y Lee,Y.S. (2005) Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Med.* **71**, 785-787.
- Kim,M.S., Baek,M.J., Lee,M.H., Park,J.W., Lee,S.Y., Söderhäll,K. y Lee,B.L. (2002) A new easter-type serine protease cleaves a masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *J. Biol. Chem.* **277**, 39999-40004.
- Kim,Y.J. y Uyama,H. (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition, mechanism and perspective for the future. *Cell Mol. Life. Sci.* **62**, 1707-1723.
- Kimball,A.B., Kaczvinsky,J.R., Li,J., Robinson,L.R., Matts,P.J., Berge,C.A., Miyamoto,K. y Bissett,D.L. (2010) Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation after use of moisturizers with a combination of topical niacinamide and N-acetylglucosamine: results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled trial. *Br. J. Dermatol.* **162**, 435-441.
- Kimbrough-Green,C.K., Griffiths,C.E., Finkel,L.J., Hamilton,T.A., Bulengo-Ransby,S.M., Ellis,C.N. y Voorhees,J.J. (1994) Topical retinoic acid (tretinoin) for melasma in black patients. A vehicle-controlled clinical trial. *Arch. Dermatol.* **130**, 727-733.
- Kimura,E.T., Nikiforova,M.N., Zhu,Z., Knauf,J.A., Nikiforov,Y.E. y Fagin,J.A. (2003) High prevalence of BRAF mutations in papillary thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signalling pathway in papillary carcinoma. *Cancer Res.* **63**, 1454-1457.
- Kimura,Y., Gotoh,A., Shinozaki,F., Kashiwada,A. y Yamada,K. (2014) Removal of naphthols and analogues by the combined use of an oxidoreductase polyphenol oxidase and a biopolymer chitosan from aqueous solutions. *Environ. Technol.* **35**, 2910-2919.
- King,D.B. (1999) Parkinson's disease—levodopa complications. *Can. J. Neurol. Sci.* **26** (Suppl. 2) S13-S20.
- Kiran,G.S., Dhasayan,A., Lipton,A.N., Selvin,J., Arasu,M.V. y Al-Dhabi,N.A. (2014) Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. *J. Nanobiotechnology* **1**, 12-18.
- Kitajima,N., Fujisawa,K., Morooka,Y. y Toriumi,K. (1989) μ - η^2 : η^2 peroxo-binuclear copper complex, [Cu(HB(3,5-(Me₂CH)₂pz)₃)]₂(O₂). *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8975-8976.
- Klabunde,T., Eicken,C., Sacchettini,J.C. y Krebs,B. (1998) Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1084-1090.
- Knaggs,S., Malkin,H., Osborn,H.M.I., Williams,N.A.O. y Yaqoob,P. (2005) New prodrugs derived from 6-aminodopamine and 4-aminophenol as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 4002-4010.

- Kobayashi,T., Imokawa,G., Bennett,D.C. y Hearing,V.J. (1998a) Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273**, 31801-31805.
- Kobayashi,N., Nakagawa,A., Muramatsu,T., Yamashina,Y., Shirai,T., Hashimoto,M.W., Ishigaki,Y., Ohnishi,T. y Mori,T. (1998b) Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 806-810.
- Kochana,J., Kozak,J., Skrobisz,A. y Wozniakiewicz,M. (2012) Tyrosinase biosensor for benzoic acid inhibition-based determination with the use of a flow-batch monosegmented sequential injection system. *Talanta* **96**, 147-152.
- Kohashi,P.Y., Kumagai,T., Matoba,Y., Yamamoto,A., Maruyama,M. y Sugiyama,M. (2004) An efficient method for the overexpression and purification of active tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Protein. Expr. Purif.* **34**, 202-207.
- Kolbe,L., Mann,T., Gerwat,W., Batzer,J., Ahlheit,S., Scherner,C., Wenck,H. y Stäb,F. (2013) 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **27**, 19-23.
- Konanayakam,M. y Sastry,S.K. (1988) Kinetics and shrinkage of mushroom during blanching. *J. Food Sci.* **53**, 1406-1411.
- Kondo,T. y Hearing,V.J. (2011) Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev. Dermatol.* **6**, 97-108.
- Kong,K.H., Hong,M.P., Choi,S.S., Kim,Y.T. y Cho,S.H. (2000) Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 113-118.
- Körner,A.M. y Pawelek,J. (1980) Dopachrome conversion: a possible control point in melanin biosynthesis. *J. Invest. Dermatol.* **75**, 192-195.
- Körner,A.M. y Pawelek,J. (1982) Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**, 1163-1165.
- Kowalski,S.P., Eannetta,N.T., Hirzel,A.T. y Steffens,J.C. (1992) Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiol.* **100**, 677-684
- Koyanagi,T., Katayama,T., Suzuki,H., Nakazawa,H., Yokozeki,K. y Kumagai,H. (2005) Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. *J. Biotechnol.* **115**, 303-306.
- Krishnaveni,R., Rathod,V., Thakur,M.S. y Neelgund,Y.F. (2009) Transformation of L-tyrosine to L-dopa by a novel fungus, *Acremonium rutilum*, under submerged fermentation. *Curr. Microbiol.* **58**, 122-128.
- Kroll,T.M., Bommasamy,H., Boissy,R.E., Hernández,C., Nickoloff,B.J., Mestrlil,R. y Caroline Le Poole,I. (2005) 4-Tertiary butyl phenol exposure sensitizes human melanocytes to dendritic cell-mediated killing: relevance to vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 798-806.
- Kubo,I., Kinoshita,H., Kubo,Y., Yamagiwa,Y., Kamikawa,T. y Haraguchi,H. (2000) Molecular design of antibrowning agents. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1393-1399.
- Kubowitz,F. (1938) Spaltung und resynthese der polyphenoloxydase und des hemocyanins. *Biochem. Z.* **299**, 32-57.
- Kuo,T.C. y Ho,F.M. (2013) Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by captopril. *Res. J. Biotechnol* **8**, 26-29.
- Kupper,U., Niedermann,D.M., Travaglini,G. y Lerch,K. (1989) Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **264**, 17250-17258.
- Kushimoto,T., Basur,V., Valencia,J., Matsunaga,J., Vieira,W.D., Ferrans,V.J., Muller,J., Appella,E. y Hearing,V.J. (2001) A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10698-10703.
- Kusmartsev,S., Nefedova,Y., Yoder,D. y Gabrilovich,D.I. (2004) Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* **172**, 989-999.

- Kwak,S.Y., Yang,J.K., Kim,J.H. y Lee,Y.S. (2013a) Chemical modulation of bioactive compounds via oligopeptide or amino acid conjugation. *Biopolymers* **100**, 584-591.
- Kwak,S.Y., Yang,J.K., Choi,H.R., Park,K.C., Kim,Y.B. y Lee,Y.S. (2013b) Synthesis and dual biological effects of hydroxycinnamoyl phenylalanyl/prolyl hydroxamic acid derivatives as tyrosinase inhibitor and antioxidant. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 1136-1142.
- La Bonne,C. y Bronner-Fraser,M. (1998) Induction and patterning of the neural crest, a stem cell like precursor population. *J. Neurobiol.* **36**, 175-189.
- Lahav,R., Ziller,C., Dupin,E. y Le Douarin,N.M. (1996) Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3892-3897.
- Lajis,A.F.B., Basri,M., Mohamad,R., Hamid,M., Ashari,S.E., Ishak,N., Zookiflie,A. y Ariff,A.B. (2013) Enzymatic synthesis of kojic acid esters and their potential industrial applications. *Chemical Papers* **67**, 573-585.
- Lam,K.W., Syahida,A., Ul-Haq,Z., Abdul Rahman,M.B. y Lajis,N.H. (2010) Synthesis and biological activity of oxadiazole and triazolothiadiazole derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 3755-3759.
- Lambert,C., Chacon,J.N., Chedekel,M.R., Land,E.J., Riley,P.A., Thompson,A. y Truscott,T.G. (1989) A pulse radiolysis investigation of the oxidation of indolic melanin precursors: evidence for indolequinones and subsequent intermediates. *Biochim. Biophys. Acta* **993**, 12-20.
- Lambert,J., Onderwater,J., Vander,H.Y., Vancoillie,G., Koerten,H.K., Mommaas,A.M. y Naeyaert,J.M. (1998) Myosin V colocalizes with melanosomes and subcortical actin bundles not associated with stress fibers in human epidermal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 835-840.
- Lamoreux,M.L., Wakamatsu,K. e Ito,S. (2001) Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigment Cell Res.* **14**, 23-31.
- Land,E.J., Ramsden,C.A. y Riley,P.A. (2007) The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: a substrate structure investigation. *Tohoku J. Exp. Med.* **212**, 341-348.
- Land,E.J., Ramsden,C.A., Riley,P.A. y Stratford,M.R. (2008) Evidence consistent with the requirement of cresolase activity for suicide inactivation of tyrosinase. *Tohoku J. Exp. Med.* **216**, 231-138.
- Landau,M. y Krafchik,B.R. (1999) The diagnostic value of café-au-lait-macules. *J. Am. Acad. Dermatol.* **40**, 877-890.
- Laskin,J.D. y Piccinini,L.A. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**, 16626-16635.
- Lassam,N. y Bickford,S. (1992) Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene* **7**, 51-56.
- Laveda,F., Nuñez-Delicado,E., García-Carmona,F. y Sánchez-Ferrer,A. (2000) Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 1-6.
- Laveda,F., Nuñez-Delicado,E., García-Carmona,F. y Sánchez-Ferrer,A. (2001) Proteolytic activation of latent *Paraguayana* PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1003-1008.
- Lee,J.Y. y Xun,L.Y. (1998) Novel biological process for L-DOPA production from L-tyrosine by p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *Biotechnol. Lett.* **20**, 479-482
- Lee,S.Y., Baek,N. y Nam,T.G. (2015) Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* DOI: 10.3109/14756366.2015.1004058.
- Lee,W.R., Shen,S.C., Kuo-Hsien,W., Hu,C.H. y Fang,J.Y. (2003) Lasers and microdermabrasion enhance and control topical delivery of Vitamin C. *J. Invest. Dermat.* **121**, 1118-1125.
- Lee,Y.C., Hsiao,N.W., Tseng,T.S., Chen,W.C., Lin,H.H., Leu,S.J., Yang,E.W. y Tsai,K.C. (2015) Phage display-mediated discovery of novel tyrosinase-targeting tetrapeptide inhibitors reveals the significance of N-terminal preference of cysteine residues and their functional sulfur atom. *Mol. Pharmacol.* **87**, 218-230.

- Legros,L., Cassuto,J.P. y Ortonne,J.P. (2005) Imatinib mesilate (Glivec): a systemic depigmenting agent for extensive vitiligo?. *Br. J. Dermatol.* **153**, 691-692.
- Lejeune,F., Liénard,D., Eggermont,A., Schraffordt Koops,H., Kroon,B., Gérard,J., Rosenkaimer,F. y Schmitz,P. (1994) Clinical experience with high-dose tumor necrosis factor alpha in regional therapy of advanced melanoma. *Circ. Shock* **43**, 191-197.
- Leoni,O., Palmieri,S., Lattanzio,V. y Van Sumere,C.F. (1990) Polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Food Chem.* **38**, 27-39.
- Lerch,K. (1976) *Neurospora* tyrosinase: molecular weight, copper content and spectral properties. *FEBS Lett.* **69**, 157-160.
- Lerch,K. (1978) Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 3635-3639.
- Lerch,K. (1981) Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -hydroxylase. En: *Metal Ions in Biological Systems*. Sigel, H.Ed. Marcel Dekker, New York. pp. 143-186.
- Lerch,K. (1983) *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* **52**, 125-138.
- Lerch,K. y Ettinger,L. (1972) Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur. J. Biochem.* **31**, 427-437.
- Lerner,A.B. y Fitzpatrick,T.B. (1949) Mammalian tyrosinase: preparation and properties. *J. Biol. Chem.* **178**, 185-195.
- Lerner,A.B. y Fitzpatrick,T.B. (1950) Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**, 91-126.
- Le-Thi-Thu,H., Casanola-Martín,G.M., Marrero-Ponce,Y., Rescigno,A., Abad,C. y Khan,M.T. (2014) A rational workflow for sequential virtual screening of chemical libraries on searching for new tyrosinase inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1473-1485.
- Levy,G. y Nelson,G.L. (1976) *Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 Para Químicos Orgánicos*, Ediciones Bellaterra S.A., Barcelona.
- Levy,S.B. (2000) Tanning preparations. *Dermatol. Clin.* **18**, 591-596.
- Levi-Montalcini,R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**, 1154-1162.
- Li,D., Scherfer,C., Korayem,A.M., Zhao,Z., Schmidt,O. y Theopold,U. (2002) Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 919-928.
- Li,D., Deng,Z., Liu,C., Zhao,M., Guo,H., Xia,Z. y Liu,H. (2014) Molecular cloning, expression profiles, and characterization of a novel polyphenol oxidase (PPO) gene in *Hevea brasiliensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1648-1655.
- Li,L. y Steffens,J.C. (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* **215**, 239-247.
- Li,Y., Wang,Y., Jiang,H. y Deng,J. (2009) Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 17002-17006.
- Libra,M., Malaponte,G., Navolanic,P.M., Gangemi,P., Bevelacqua,V., Proietti,L., Bruni,B., Stivala,F., Mazzarino,M.C., Travali,S. y McCubre,J.A. (2005) Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell cycle* **4**, 1382-1384.
- Lima,C.R., Silva,J.R., de Tássia Carvalho Cardoso,E., Silva,E.O., Lameira,J., do Nascimento,J.L., do Socorro Barros Brasil,D. y Alves,C.N. (2014) Combined kinetic studies and computational analysis on kojic acid analogous as tyrosinase inhibitors. *Molecules* **19**, 9591-9605.
- Lin,Y.F., Hu,Y.H., Jia,Y.I., Li,Z.C., Guo,Y.J., Chen,Q.X. y Lin,H.T. (2012) Inhibitory effects of naphthols on the activity of mushroom tyrosinase. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 32-36.

- Liu,J., Cao,R., Yi,W., Ma,C., Wan,Y., Zhou,B., Ma,L. y Song,H. (2009) A class of potent tyrosinase inhibitors: alkylidenethiosemicarbazide compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 1773-1778.
- Liu,J., Wu,F., Chen,L., Zhao,L., Zhao,Z., Wang,M. y Lei,S. (2012) Biological evaluation of coumarin derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Food Chem.* **135**, 2872-2878.
- Liu,J., Chen,C., Wu,F. y Zhao,L. (2013) Microwave-assisted synthesis and tyrosinase inhibitory activity of chalcone derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **82**, 39-47.
- Liu,N., Zhang,T., Wang,Y.J., Huang,Y.P., Ou,J.H. y Shen,P. (2004) A heat inducible tyrosinase with distinct properties from *Bacillus thuringensis*. *Let. Appl. Microbiol.* **39**, 407-412.
- Liu,P.T., Stenger,S., Li,H., Wenzel,L., Tan,B.H., Krutzik,S.R., Ochoa,M.T., Schaubert,J., Wu,K., Meinken,C., Kamen,D.L., Wagner,M., Bals,R., Steinmeyer,A., Zügel,U., Gallo,R.L., Eisenberg,D., Hewison,M., Hollis,B.W., Adams,J.S., Bloom,B.R. y Modlin,R.L. (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**, 1770-1173.
- Liu,Z., Liu,Y., Yang,H., Yang,Y., Shen,G. y Yu,R. (2005) A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* **533**, 3-9.
- Liu,Z.J., Liu,B.H., Kong,J.L. y Deng,J.Q. (2000) Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel derived tyrosinase biosensor. *Anal. Chem.* **72**, 4707-4712.
- Ilieva,K.M., Correa,I., Josephs,DH., Karagiannis,P., Egbuniwe,I.U., Cafferkey,M.J., Spicer,J.F., Harries,M., Nestle,F.O., Lacy,K.E. y Karagiannis,S.N. (2014) Effects of BRAF mutations and BRAF inhibition on immuner to melanoma. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2769-2783.
- Lloret,L., Hollmann,F., Eibes,G., Feijoo,G., Moreira,M.T. y Lema,J.M. (2012) Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor. *Biodegradation* **23**, 373-386.
- Loercher,A.E., Tank,E.M., Delston,R.B. y Harbour,J.W. (2005) MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J. Cell Biol.* **168**, 35-40.
- López-Molina,D., Hiner,A.N.P., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López. (2003) Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 738-742.
- López-Serrano,D., Solano,F. y Sánchez-Amat,A. (2004) Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene* **342**, 179-187.
- López-Serrano,D., Solano,F. y Sánchez-Amat,A. (2007) Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Microbiology* **153**, 2241-2249.
- Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L. y Randall,R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **133**, 265-275.
- Lozano,J.A. y Solano,F. (1989) Bioquímica de la pigmentación en mamíferos. *Investigación y Ciencia* **157**, 87-93.
- Lu,D., Willard,D., Patel,I.R., Kadwell,S., Overton,L., Kost,T., Luther,M., Chen,W., Woychik,R.P. y Wilkison,W.O. (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte stimulating-hormone receptor. *Nature* **371**, 799-802.
- Luiten,R.M., Kueter,E.W., Mooi,W., Gallee,M.P., Rankin,E.M., Gerritsen,W.R., Clift,S.M., Nooijen,W.J., Weder,P., van de Kastele,W.F., Sein,J., van den Berk,P.C., Nieweg,O.E., Berns,A.M., Spits,H. y de Gast,G.C. (2005) Immunogenicity, including vitiligo, and feasibility of vaccination with autologous GM-CSF-transduced tumor cells in metastatic melanoma patients. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8978-8991.
- Maeda,K. y Fukuda,M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**, 361-368.
- Magnus,K.A., Ton-That,H. y Carpenter,J.E. (1994) Recent structural work on the oxygen transport protein hemocyanin. *Chem. Rev.* **94**, 727-735.
- Makino,N. y Mason,H.S. (1973) Reactivity of oxytyrosinase toward substrates. *J. Biol. Chem.* **248**, 5731-5735.

- Makino,E.T., Mehta,R.C., Garruto,J., Gotz,V., Sigler,M.L. y Herndon,J.H. (2013) Clinical efficacy and safety of a multimodality skin brightener composition compared with 4% hydroquinone. *J. Drugs Dermatol.* **12**, S21-S26.
- Malzahn,K., Windmiller,J.R., Valdés-Ramírez,G., Shöning,M.J. y Wang,J.W. (2011) Electrochemical sensors for *in situ* analysis in marine environments. *Analyst* **136**, 2912-2917.
- Maresca,V., Flori,E., Cardinali,G., Briganti,S., Lombardi,D., Mileo,A.M., Paggi,M.G. y Picardo,M. (2006) Ferritin light chain down-modulation generates depigmentation in human metastatic melanoma cells by influencing tyrosinase maturation. *J. Cell Physiol.* **206**, 843-848.
- Marín-Zamora,M.E., Rojas-Melgarejo,F., García-Cánovas,F. y García-Ruiz,P.A. (2005) Cinnamic ester of D-sorbitol for immobilization of mushroom tyrosinase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 1356-1364.
- Marín-Zamora,M.E., Rojas-Melgarejo,F., García-Cánovas,F. y García-Ruiz,P.A. (2006) Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *J. Biotechnol.* **126**, 295-303.
- Marín-Zamora,M.E., Rojas-Melgarejo,F., García-Cánovas,F., y García-Ruiz,P.A. (2007a) Effects of the immobilization supports on the catalytic properties of immobilized mushroom tyrosinase: A comparative study using several substrates. *J. Biotechnol.* **131**, 388-396
- Marín-Zamora,M.E., Rojas-Melgarejo,F., García-Cánovas,F., y García-Ruiz,P.A. (2007b) Stereospecificity of mushroom tyrosinase immobilized on a chiral and a nonchiral support. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4569-4575.
- Marín-Zamora,M.E., Rojas-Melgarejo,F., García-Cánovas,F. y García-Ruiz,P.A. (2009) Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *J. Biotechnol.* **139**, 163-168.
- Marino,S.M., Fogal,S., Bisaglia,M., Moro,S., Scartabelli,G., De Gioia,L., Spada,A., Monzani,E., Casella,L., Mammi,S. y Bubacco,L. (2011) Investigation of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase reactivity toward chlorophenols. *Arch. Biochem. Biophys.* **505**, 67-74.
- Marks,P.A. y Rifkind,R.A. (1984) Differentiation modifiers. *Cancer* **54**, 2766-2769.
- Marquardt,D.W. (1963) An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431-441.
- Marrero-Ponce,Y., Casañola-Martín,G.M., Khan,M.T., Torrens,F., Rescigno,A. y Abad,C. (2010) Ligand-based computer-aided discovery of tyrosinase inhibitors. Applications of the TOMOCOMD-CARDD method to the elucidation of new compounds. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 2601-2624.
- Marri,C., Frazzoli,A., Hochkoeppler,A. y Poggi,V. (2003) Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry* **63**, 745-752.
- Marriott,S. y Topsom,R.D. (1985) A theoretical scale of substituent resonance parameters (σ_R°). *J. Chem. Soc. Perkin Trans II.* **7**, 1045-1047.
- Martínez-Esparza,M., Jiménez-Cervantes,C., Solano,F., Lozano,J.A. y García-Borrón,J.C. (1998) Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**, 139-146.
- Martínez-Esparza,M., Ferrer,C., Castells,M.T., García-Borrón,J.C. y Zuasti,A. (2001) Transforming growth factor beta1 mediates hypopigmentation of B16 mouse melanoma cells by inhibition of melanin formation and melanosome maturation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 971-983.
- Martínez-Ortiz,F., Tudela-Serrano,J., Rodríguez-López,J.N., Varón-Castellanos,R., Lozano-Teruel,J.A. y García-Cánovas,F. (1988) Oxidation of 3,4-dihydroxymandelic acid catalyzed by tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **957**, 158-163.
- Martínez,M.V. y Whitaker J.R. (1995) The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 195-200.
- Marusek,C.M., Trobaugh,N.M., Flurkey,W.H. e Inlow,J.K. (2006) Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 108-23.

- Mason, H.S. (1955) Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.* **16**, 105-184.
- Mason, H.S. (1956) Structures and functions of the phenolase complex. *Nature* **177**, 79-81.
- Mason, H.S. (1966) Preliminary remarks on polyphenoloxidase. En: *The Biochemistry of Copper*. Peisach, J., Aisen, P. y Blumberg, W.E. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 339-341.
- Masuda, T., Momoji, K., Hirata, T. y Mikami, B. (2014) The crystal structure of a crustacean prophenoloxidase provides a clue to understanding the functionality of the type 3 copper proteins. *FEBS J.* **281**, 2659-2673.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H. y Sugiyama, M. (2006) Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8981-8990.
- Matos, M.J., Santana, L., Uriarte, E., Serra, S., Corda, M., Fadda, M.B., Era, B. y Fais, A. (2012) Tyrosine-like condensed derivatives as tyrosinase inhibitors. *J. Pharm. Pharmacol.* **64**, 742-746.
- Matsuda, S., Shibayama, H., Hisama, M., Ohtsuki, M. e Iwaki, M. (2008) Inhibitory effects of novel ascorbic derivative, disodium isostearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate on melanogenesis. *Chem. Pharm. Bull.* **56**, 292-297.
- Matsui, M.S., Wang, N., MacFarlane, D. y DeLeo, V.A. (1994) Long-wave ultraviolet radiation induces protein kinase C in normal human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **59**, 53-57.
- Mattner, F., Smirolto, S., Galbiati, F., Muller, M., Di Lucia, P., Poliani, P.L., Martino, G., Panina-Bordignon, P. y Adorini, L. (2000) Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur. J. Immunol.* **30**, 498-508.
- Mauracher, S.G., Molitor, C., Michael, C., Kragl, M., Rizzi, A. y Rompel, A. (2014a) High level protein-purification allows the unambiguous polypeptide determination of latent isoform PPO4 of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* **99**, 14-25.
- Mauracher, S.G., Molitor, C., Al-Oweini, R., Kortz, U. y Rompel, A. (2014b) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of latent isoform PPO4 mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* **70**, 263-266.
- Mauracher, S.G., Molitor, C., Al-Oweini, R., Kortz, U. y Rompel, A. (2014c) Latent and active abPPO4 mushroom tyrosinase cocrystallized with hexatungstotellurate (VI) in a single crystal. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**, 2301-2315.
- Mayer, A.M. (1987) Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* **26**, 11-20.
- Mayer, A.M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **67**, 2318-2331.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **18**, 193-215.
- McEvely, A.J., Iyengar, R. y Otwell, W.S. (1991) Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technol.* **45**, 80-86.
- McGill, C.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.F., Jordan, S.A., Jackson, I.J., Korsmeyer, S.J., Golub, T.R. y Fisher, D.E. (2002) Bcl-2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**, 707-718.
- McMahon, A.M., Doyle, E.M., Brooks, S. y O'Connor, K.E. (2007) Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1435-1441.
- Mendes, E., Perry, M.deJ. y Francisco, A.P. (2014) Design and discovery of mushroom tyrosinase inhibitors and their therapeutic applications. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 533-554.
- Mengeaud, V. y Ortonne, J.P. (1994) Regulation of melanogenesis induced by 5-methoxypsoralen without ultraviolet light in murine melanoma cells. *Pigment Cell Res.* **7**, 245-254.
- Metwally, M. y El-Shora, H.M. (2008) Use of tyrosinase enzyme from *Bacillus thuringiensis* for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnology* **7**, 305-310.

- Metz, M. y Solomon, E.I. (2001) Dioxygen binding to deoxyhemocyanin. Electronic structure and mechanism of the spinforbidden two-electron reduction of O₂. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4938-4950.
- Michalik, J., Emilianowicz-Czerska, W., Switalski, L. y Raczyńska-Bojanowska, K. (1975) Monophenol monooxygenase and lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 526-531.
- Mills, O.H. y Kligman, A.M. (1978) Further experience with a topical cream for depigmenting human-skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **29**, 147-154.
- Min, K., Park, D.H. y Yoo, Y.J. (2010) Electroenzymatic synthesis of L-Dopa. *J. Biotechnol.* **146**, 40-44.
- Min, K., Kathavarayan, T., Park, K. y Yoo, Y.J. (2013) Novel strategy for enhancing productivity in L-DOPA synthesis the electroenzymatic approach using well-dispersed L-tyrosine. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **90**, 87-90.
- Min, K., Park, K., Park, D.H. y Yoo, Y.J. (2015) Overview on the biotechnological production of L-DOPA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 575-584.
- Minwalla, L., Zhao, Y., Cornelius, J., Babcock, G.F., Wickett, R.R., Le Poole, I.C. y Boissy, R.E. (2001) Inhibition of melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes by lectins and neoglycoproteins in an in vitro model system. *Pigment Cell Res.* **14**, 185-194.
- Mirica, L.M., Vance, M., Rudd, D.J., Hedman, B., Hodgson, K.O., Solomon, E.I. y Stack, T.D. (2002) A stabilized mu-eta (2): eta (2) peroxodicopper(II) complex with a secondary diamine ligand and its tyrosinase-like reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **14**, 9332-9333.
- Mita, D.G., Attanasio, A., Arduini, F., Diano, N., Grano, V., Bencivenga, U., Rossi, S., Amine, A. y Moscone, D. (2007) Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 60-65.
- Mitra, D., Luo, X., Morgan, A., Wang, J., Hoang, M.P., Lo, J., Guerrero, C.R., Lennerz, J.K., Mihm, M.C., Wargo, J.A., Robinson, K.C., Devi, S.P., Vanover, J.C., D'Orazio, J.A., McMahon, M., Bosenberg, M.W., Haigis, K.M., Haber, D.A., Wang, Y. y Fisher, D.E. (2012) An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* **491**, 449-453.
- Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K. y Ikeda, T. (2002) Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim. Biophys. Acta* **1569**, 35-44.
- Mochly-Rosen, D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**, 247-251.
- Moghaddan, A.B., Ganjali, M.R., Niasari, M. y Ahadi, S. (2008) Bioelectrocatalysis of dopamine using adsorbed tyrosinase on single-walled carbon nanotubes. *Anal. Lett.* **41**, 3161-3176.
- Mohammadi, A., Moghaddam, A.B., Dinarvand, R., Adraghi, J., Atyabi, F. y Aboury, A.A. (2008) Bioelectrocatalysis of methyl dopa by adsorbed tyrosinase on the surface of modified glassy carbon with carbon nanotubes. *Int. J. Electrochem. Sci.* **3**, 1248-1257.
- Mohammadi, A., Moghaddam, A.B., Hosseini, S., Kazemzade, M. y Dinarvand, R. (2011) A norepinephrine biosensor based on a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes. *Anal. Methods* **3**, 2406-2411.
- Molloy, S., Nikodinovic-Runic, J., Martin, L.B., Hartmann, H., Solano, F., Decker, H. y O'Connor, K.E. (2013) Engineering of a bacterial tyrosinase for improved catalytic efficiency towards D-tyrosine using random and site directed mutagenesis approaches. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1849-1857.
- Monteiro, R.C., Kishore, B.N., Bhat, R.M., Sukumar, D., Martis, J. y Ganesh, H.K. (2013) A comparative study of the efficacy of 4% hydroquinone vs 0.75% kojic acid cream in the treatment of facial melasma. *Indian J. Dermatol.* **58**, 157. DOI: 10.4103/0019-5154.108070.
- Moore, B.M. y Flurkey, W.H. (1990) Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* **265**, 4982-4988.

- Morgan,A.M., Lo,J. y Fisher,D.E. (2013) How does pheomelanin synthesis contribute to melanomagenesis?: Two distinct mechanisms could explain the carcinogenicity of pheomelanin synthesis. *Bioessays* **35**, 672-676.
- Morpurgo,G., Babudri,N., Fioretti,B., Franciolini,F. y Catacuzzeno,L. (2011) Synthetic aromatic compounds interfering with melanogenesis are responsible of the rising trend of malignant melanoma incidence. *Med. Hypotheses* **76**, 374-377.
- Mountjoy,K.G., Robbins,L.S., Mortrud,M.T. y Cone,R.D. (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* **257**, 1248-1251.
- Munjal,N. y Sawhney,S.K. (2002) Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 613-619.
- Muñoz,A.J., Hernández-Chávez,G., de Anda,R., Martínez,A., Bolívar,F. y Gosset,G. (2011) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis from glucose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1845-1852.
- Muñoz-Muñoz,J., García-Molina,F., Varón,R., Rodríguez-López,J.N., García-Ruiz,P.A., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2007a) Kinetic characterization of the oxidation of chlorogenic acid by polyphenol oxidase and peroxidase. Characteristics of the o-quinone. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 920-928.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., Varón,R., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2007b) Kinetic characterization of the oxidation of esculetin by polyphenol oxidase and peroxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 390-396.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., Molina-Alarcón,M., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2008a) Kinetic characterization of the enzymatic and chemical oxidation of the catechins in green tea. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9215-9224.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., García-Ruiz,P.A., Molina-Alarcón,M., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2008b) Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism. *Biochem. J.* **416**, 431-440.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., García-Ruiz,P.A., Varón,R., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-Lopez,J.N. (2009a) Stereospecific inactivation of tyrosinase by L-and D-ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 244-253.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., Varón,R., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2009b) Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosintesis pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 1017-1029.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., García-Ruiz,P.A., Varón,R., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2010a) Some kinetic properties of deoxytyrosinase. *J. Mol. Catal.-B Enzymatic* **62**, 173-182.
- Muñoz-Muñoz,J.L., Acosta-Motos,J.R., García-Molina,F., Varón,R., García-Ruiz,P.A., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2010b) Tyrosinase inactivation in its action on dopa. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1467-1475.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., Varón,R., García-Ruiz,P.A., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2010c) Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life* **62**, 539-547.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina, F., Varon,R., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2010d) New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. *JOURNAL OF MATHEMATICAL CHEMISTRY* **48**, 347-362.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., Arribas,E., García-Ruiz,P.A., Tudela,J., García-Cánovas,F. y Rodríguez-López,J.N. (2011a) Suicide inactivation of tyrosinase in its action on tetrahydropterines. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **26**, 728-733.
- Muñoz-Muñoz,J.L., García-Molina,F., Acosta-Motos,J.R., Arribas,E., García-Ruiz,P.A., Tudela,J., García-Cánovas F. y Rodríguez-López JN. (2011b) Indirect inactivation of tyrosinase in its action on tyrosine. *Acta Biochim. Pol.* **58**, 477-88.

- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Varón, R., Tudela, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2011c) Kinetic cooperativity of tyrosinase. A general mechanism. *Acta Biochim. Pol.* **58**, 303-311.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Tudela, J., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas F. (2011d) Catalytic oxidation of o-aminophenols and aromatic amines by mushroom tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 1974-1983.
- Muñoz-Muñoz, J.L., Berna, J., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Tudela, J., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2012a) Unravelling the suicide inactivation of tyrosinase: A discrimination between mechanisms. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **75**, 11-19.
- Muñoz-Muñoz, J.L., Berna, J., García-Molina, M., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2012b) Hydroxylation of p-substituted phenols by tyrosinase: further insight into the mechanism of tyrosinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 228-233.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Berna, J., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Tudela, J., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2012c) Kinetic characterisation of o-aminophenols and aromatic o-diamines as suicide substrates of tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 647-655.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, M., García-Molina, F., García-Ruiz, P.A., García-Sevilla, F., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas F. (2013a) Deuterium isotope effect on the suicide inactivation of tyrosinase in its action on o-diphenols. *IUBMB Life* **65**, 793-799.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, M., García-Molina, F., Berna, J., García-Ruiz, P.A., García-Moreno, M., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas F. (2013b) Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on o-diphenols, o-aminophenols and o-phenylenediamines: Potential use in industrial applications. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **91**, 17-24.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, M., García-Molina, F., Varón, R., García-Ruiz, P.A., Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2014) Indirect inactivation of tyrosinase in its action on 4-tert-butylphenol. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **29**, 344-352.
- Nagai, T. y Suzuki, N. (2001) Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3922-3926.
- Naidja, A., Huang, P.M. y Bollag, J.M. (1997) Activity of tyrosinase immobilized on hydroxyaluminum-montmorillonite complexes. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **115**, 305-316.
- Naish-Byfield, S. y Riley, P.A. (1992) Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* **288**, 63-67.
- Nakamura, M., Nakajima, T., Ohba, Y., Yamauchi, S., Lee, B.R. e Ichishima, E. (2000) Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **2**, 537-545.
- Nakamura, T., Ren, J., Zhu, K., Kawara, S. y Jin, B. (2006) Application of the nanogold-4,4'-bis(methanethiol)biphenyl modified gold electrode to the determination of tyrosinase-catechol reaction kinetics in acetonitrile. *Anal. Sci.* **22**, 1261-1264.
- Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Ueda, T., Nakao, M., Tanaka, Y., Kusumi, T. y Nishino, T. (2000) Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* **290**, 1163-1166.
- Nanda, V., Parwaz, M.A. y Handa, S. (2006) Linear hypopigmentation after triamcinolone injection: a rare complication of a common procedure. *Aesthetic Plast. Surg.* **30**, 118-119.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F. y Carton, Y. (1995) Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell Biol.* **68**, 450-456.
- Nappi, A.J. y Vass, E. (1996) Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. *Melanoma Res.* **6**, 341-349.
- Nasti, T.H. y Timares, L. (2015) MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem. Photobiol.* **91**, 188-200.

- Navarro, J.L., Tárrega, A., Sentandreu, M.A. y Sentandreu, E. (2014) Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chem.* **157**, 283-289.
- Niccoluci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Boanco, M., Mita, L., Bencivenga, U., Mita, D.G. y Diano, N. (2011) Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation* **22**, 673-683.
- Nicolaidou, E., Antoniou, C., Miniati, A., Lagogianni, E., Matekovits, A., Stratigos, A. y Katsambas, A. (2012) Childhood and later-onset vitiligo have diverse epidemiologic and clinical characteristics. *J. Am. Acad. Dermatol.* **66**, 954-958.
- Nicolaidou, E. y Katsambas, A. (2014) Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation. *Clinics in Dermatology* **32**, 66-72.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. y Aubert, S.Y. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**, 109-157.
- Nieto, A., Ruiz-Ramos, M., Abdel-Kader, L., Conde, M. y Camacho, F. (2003) Gender differences in rising trends in cutaneous malignant melanoma in Spain, 1975-98. *Br. J. Dermatol.* **148**, 110-116.
- Nguyen, Q.H. y Bui, T.P. (1995) Azelaic acid: pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and its therapeutic role in hyperpigmentary disorders and acne. *Int. J. Dermatol.* **34**, 75-84.
- Niphadkar, S.S., Vetal, M.D. y Rathod, V.K. (2015) Purification and characterization of polyphenol oxidase from waste potato peel by aqueous two-phase extraction. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **45**, 632-649.
- Noble, R., y Burton, K.S. (1993) Postharvest storage and handling of mushrooms: physiology and technology. *Postharvest news and information* **4**, 125N-129N.
- Noh, J.M., Kwak, S.Y., Kim, D.H. y Lee, Y.S. (2007) Kojic acid-tripeptide amide as a new tyrosinase inhibitor. *Biopolymers* **88**, 300-307.
- Noh, J.M., Kwak, S.Y., Seo, H.S., Seo, J.H., Kim, B.G. y Lee, Y.S. (2009) Kojic acid-amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 5586-5589.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Mirdamadi, S., Khetami, S. y Fahanghi, A. (2007) Immobilization of mushroom tyrosinase by different methods in order to transform L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa). *Biotechnology* **6**, 436-439.
- Norris, D.A., Morelli, J.G. y Fujita, M. (1998) Melanocytes interactions in skin. En: *The pigmentary system*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P. (Eds.) Oxford Univ. Press, New York, pp. 123-133.
- Nosanchuk, J.D. y Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* **5**, 203-223.
- Novikoff, P.M., Novikoff, A.B., Quintana, N. y Hauw, J.J. (1971) Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell Biol.* **50**, 859-886.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M.M., García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A. (2003) Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2058-2063.
- Nylander, K., Bourdon, J.C., Bray, S.E., Gibbs, N.K., Kay, R., Hart, I. y Hall, P.A. (2000) Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J. Pathol.* **190**, 39-46.
- Oberley, T.D. y Oberley, L.W. (1997) Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol.* **12**, 525-535.
- Obi, N., Katayama, M., Sano, J., Kojima, Y., Shigemitsu, Y. y Takada, K. (1998) NMR spectroscopic study of the formation of borate esters ascorbic acid and isoascorbic acid. *New J. Chem.* **22**, 933-934.
- Octavio de Faria, R., Rotuno-Moure, V., Lopes de Almeida, M.A., Krieger, N. y Mitchell, D.A. (2007) The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 287-294.
- O'Donoghue, J.L. (2006) Hydroquinone and its analogues in dermatology - a risk-benefit viewpoint. *J. Cosmet. Dermatol.* **5**, 196-203.

- Oetting,W.S. (2000) The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res.* **13**, 320-325.
- Ohguchi,K., Akao,Y. y Nozawa,Y. (2005) Involvement of calpain in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *Mol. Cell Biochem.* **275**, 103-107.
- Olivares,C., Jiménez-Cervantes,C., Lozano,J.A., Solano,F. y García-Borrón,J.C. (2001) The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem. J.* **354**, 131-139.
- Olivares,C. y Solano,F. (2009) New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 750-760.
- Oliveira,T.M., Barroso,M.F., Morais,S., Araújo,M., Freire,C., de Lima-Neto,P., Correia,A.N., Oliveira,M.B. y Delerue-Matos,C. (2014) Sensitive bi-enzymatic biosensor based on polyphenoloxidases-gold nanoparticles-chitosan hybrid film-graphene doped carbon paste electrode for carbamates detection. *Bioelectrochemistry* **98**, 20-29.
- Ollmann,M.M., Wilson,B.D., Yang,Y.K., Kerns,J.A., Chen,Y., Gantz,I. y Barsh,G.S. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278**,135-138.
- Onsa,G.H., bin Saari,N., Selamat,J. y Bakar,J. (2000) Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sagu*): partial purification, activation, and some properties. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5041-5045.
- Orhan,I.E. y Khan,M.T. (2014) Flavonoid derivatives as potent tyrosinase inhibitors - a survey of recent findings between 2008-2013. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1486-1493.
- Oriero,D.A., Jabal,J.M.F., Deobald,L., Weakley,A.T. y Aston,D.E. (2011) A potential enzyme-encapsulating, ultrafine fiber for phenol detection. *React. Funct. Polym.* **71**, 870-880.
- Orlow,S.J., Osber,M.P. y Pawelek,J.M. (1992) Synthesis and characterization of melanins from dihydroxyindole-2-carboxylic acid and dihydroxyindole. *Pigment Cell Res.* **5**, 113-121.
- Ortega,V.V., Díaz,F.M., Romero,C.C. y Pacheco,G.O. (1995) Abnormal melanosomes ultrastructural markers of melanocytic atypia. *Ultrastruct. Pathol.* **19**, 119-128.
- Ortiz-Ruiz,C.V., García-Molina,M., Serrano,J.T., Tomás-Martínez,V. y García-Cánovas F. (2015) Discrimination between Alternative Substrates and Inhibitors of Tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 2162-2171.
- Ortonne,J.P. y Prota,F. (1993) Hair melanins and hair color: ultrastructural and biochemical aspects. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 82S-89S.
- Osaki,S. (1963) The mechanism of tyrosine oxidation by mushroom tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 378-384.
- Pacifico,A. y Leone,G. (2007) Role of p53 and CDKN2A inactivation in human squamous cell carcinomas. *J. Biomed. Biotechnol.* 2007. DOI: 10.1155/2007/43418.
- Palma-Orozco,G., Marrufo-Hernández,N.A., Sampedro,J.G. y Nájera, H. (2014) Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mango (*Mangifera indica* cv. *Manila*). *J. Agric. Food Chem.* **62**, 9832-9840.
- Palmieri,G., Strazzullo,M., Ascierio,P.A., Satriano,S.M., Daponte,A. y Castello,G. (1999) Polymerase chain reaction-based detection of circulating melanoma cells as an effective marker of tumor progression. Melanoma Cooperative Group. *J. Clin. Oncol.* **17**, 304-311.
- Palmieri,G., Casula,M., Sini,M.C., Ascierio,P.A. y Cossu,A. (2007) Issues affecting molecular staging in the management of patients with melanoma. *J. Cell Mol. Med.* **11**, 1052-1068.
- Palmieri,G., Capone,M., Ascierio,M.L., Gentilcore,G., Stroncek,D.F., Casula,M., Sini,M.C., Palla,M., Mozzillo,N. y Ascierio,P.A. (2009) Main roads to melanoma. *J. Transl. Med.* **14**, 86.
- Palumbo,A., Misuraca,G., D'Ischia,M. y Prota,G. (1985) Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochem. J.* **228**, 647-651.

- Panzella,L., Szewczyk,G., d'Ischia,M., Napolitano,A. y Sarna,T. (2010) Zinc-induced structural effects enhance oxygen consumption and superoxide generation in synthetic pheomelanins on UVA/visible light irradiation. *Photochem. Photobiol.* **86**, 757-764.
- Park,H.Y. y Gilchrist,B.A. (1999) Signaling pathways mediating melanogenesis. *Cell Mol. Biol.* **45**, 919-930.
- Park,H.Y., Russakovsky,V., Ohno,S. y Gilchrist,B.A. (1993) The beta isoform of protein kinase C stimulates human melanogenesis by activating tyrosinase in pigment cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 11742-11749.
- Park,H.Y., Perez,J.M., Laursen,R., Hara,M. y Gilchrist,B.A. (1999) Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 16470-16478.
- Park,H.Y., Wu,H., Killoran,C.E. y Gilchrist,B.A. (2004) The receptor for activated C-kinase-I (RACK-I) anchors activated PKC-beta on melanosomes. *J. Cell Sci.* **117**, 3659-3668.
- Park,H.Y., Wu,C., Yonemoto,L., Murphy-Smith,M., Wu,H., Stachur,C.M. y Gilchrist,B.A. (2006) MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes. *Biochem. J.* **395**, 571-578.
- Park,H.Y., Kosmadaki,M., Yaar,M. y Gilchrist,B.A. (2009) Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1493-1506.
- Parvez,S., Kang,M., Chung,H.S. y Bae,H. (2007) Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health cosmetics and agriculture industries. *Phytother. Res.* **21**, 805-816.
- Pathak,M.A. y Fitzpatrick,T.B. (1993) Protective treatment of sunburn, and skin cancer with sun-protective agents, En: *Dermatology in general medicine*. Fitzpatrick,T.B., Eisen,A.Z., Wolff,K., Fredberg,I.M. y Austen,K.F. (Eds), Mc Graw-Hill, New York, pp. 1689-1717.
- Patton,E.E., Widlund,H.R., Kutok,J.L., Kopani,K.R., Amatruda,J.F., Murphey,R.D., Berghmans,S., Mayhall,E.A., Traver,D., Fletcher,CD., Aster,J.C., Granter,S.R., Look,A.T., Lee,C., Fisher,D.E. y Zon,LI. (2005) BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr. Biol.* **15**, 249-254.
- Pavel,S., van Nieuwpoort,F., van der Meulen,H., Out,C., Pizinger,K., Cetkovská,P., Smit,N.P. y Koerten,H.K. (2004) Disturbed melanin synthesis and chronic oxidative stress in dysplastic naevi. *Eur. J. Cancer* **40**, 1423-1430.
- Pawelek,J.M. y Lerner,A.B. (1978) 5,6-dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. *Nature* **276**, 626-628.
- Peacocke,M., Yaar,M., Mansur,C.P., Chao,M.V. y Gilchrist,B.A. (1988) Induction of nerve growth factor receptors on cultured human melanocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5282-5286.
- Pedoux,R., Al-irani,N., Marteau,C., Pellicier,F., Branche,R., Ozturk,M., Franchi,J. y Doré,J.F. (1998) Thymidine dinucleotides induce S phase cell cycle arrest in addition to increased melanogenesis in human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 472-477.
- Peng,W., Qin,R., Li,X. y Zhou,H. (2013) Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.: a review. *J. Ethnopharmacol.* **148**, 729-745.
- Penna,G. y Adorini,L. (2000) 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* **164**, 2405-2411.
- Penney,K.B., Smith,C.J. y Allen,J.C. (1984) Depigmenting action of hydroquinone depends on disruption of fundamental cell processes. *J. Invest. Dermatol.* **82**, 308-310.
- Peñalver,M.J., Rodríguez-López,J.N., García-Molina,F., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2002a) Method for the determination of molar absorptivities of thiol adducts formed from diphenolic substrates of polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* **309**, 180-185.
- Peñalver,M.J., Hiner,A.N., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2002b) Mechanistic implications of variable stoichiometries of oxygen consumption during tyrosinase catalyzed oxidation of monophenols and o-diphenols. *Biochim. Biophys. Acta* **1597**, 140-148.

- Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2003) Solvent deuterium isotope effect on the oxidation of *o*-diphenols by tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1650**, 128-135.
- Peñalver, M.J., Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Molina, F., Varon, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2005) Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **33**, 35-42.
- Perchellet, J.P. y Boutwell, R.K. (1981) Effects of 3 isobutyl-1-methylxanthine and cyclic nucleotides on the biochemical processes linked to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* **41**, 3927-3935.
- Petrescu, S.M., Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A.J. y Dwek, R.A. (2000) Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry* **39**, 5229-5237.
- Pialis, P., Jiménez-Hamann, M.C. y Saville, B.A. (1996) L-DOPA production from tyrosinase immobilized on nylon 6,6. *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 141-147.
- Piñero, S., Rivera, J., Romero, D., Cevallos, M.A., Martínez, A., Bolívar, F. y Gosset, G. (2007) Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 35-44.
- Piquemal, J.P., Maddaluno, J., Silvi, B. y Giessner-Prettre, C. (2003) Theoretical study of phenol and 2-aminophenol docking at a model of the tyrosinase active site. *New J. Chem.* **27**, 909-913.
- Platz, A., Ringborg, U. y Hansson, J. (2000) Hereditary cutaneous melanoma. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 319-326.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., Salem, G., Pohida, T., Haenan, P., Duray, P., Kallioniemi, O., Hayward, N.K., Trent, J.M. y Meltzer, P.S. (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* **33**, 19-20.
- Pomerantz, S.H. (1966) The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **241**, 161-168.
- Prince, S., Illing, N. y Kidson, S.H. (2001) SV-40 large T antigen reversibly inhibits expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Mitf, but not Pax-3, in conditionally immortalized mouse melanocytes. *Cell Biol. Int.* **25**, 91-102.
- Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**, 122-127.
- Prota, G. (1988) Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med. Res. Rev.* **8**, 525-556.
- Provance, D.W. Jr., Wei, M., Ipe, V. y Mercer, J.A. (1996) Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14554-14558.
- Pryor, M.G.M. (1940) On the hardening of the cuticle of insects. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* **128**, 393-407.
- Punnonen, K. y Yuspa, S.H. (1992) Ultraviolet light irradiation increases cellular diacylglycerol and induces translocation of diacylglycerol kinase in murine keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 221-226.
- Queiroz, C., da Silva, A.J.R., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E. y Valente-Mesquita, V. L. (2011) Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chem.* **125**, 128-132.
- Raanani, P., Goldman, J.M. y Ben-Bassat, I. (2002) Challenges in oncology. Case 3. Depigmentation in a chronic myeloid leukemia patient treated with STI-571. *J. Clin. Oncol.* **20**, 869-870.
- Ramsden, C.A., Stratford, M.R. y Riley, P.A. (2009) The influence of catechol structure on the suicide-inactivation of tyrosinase. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 3388-3390.
- Ramsden, C.A. y Riley, P.A. (2010a) Mechanistic studies of tyrosinase suicide inactivation. *Arkivoc* **SI**, 260-274.
- Ramsden, C.A. y Riley, P.A. (2010b) Studies of the competing rates of catechol oxidation and suicide inactivation of tyrosinase. *Arkivoc* **SI**, 248-254.

- Ranadive,N.S., Shirwadkar,S., Persad,S. y Menon,I.A. (1986) Effects of melanin-induced free radicals on the isolated rat peritoneal mast cells. *J. Invest. Dermatol.* **86**, 303-307.
- Rangel,J., Nosrati,M., Torabian,S., Shaikh,L., Leong,S.P., Haqq,C., Miller,J.R.3rd., Sagebiel,R.W. y Kashani-Sabet,M. (2008) Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer* **112**, 144-150.
- Rathjen,A.H. y Robinson,S.P. (1992) Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.* **99**, 1619-1625.
- Raynova,Y., Doumanova,L. y Idakieva,K.N. (2013) Phenoloxidase activity of *Helix maxima* (garden snail, gastropod) hemocyanin. *Protein J.* **32**, 609-618.
- Reddy,B., Jow,T. y Hantash,B.M. (2012) Bioactive oligopeptides in dermatology: Part I. *Exp. Dermatol.* **21**, 563-568.
- Rees,J.L. (2004) The genetics of sun sensitivity in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 739-751.
- Reinhold,D.F., Utne,T. y Abrason,N.L. (1987) Process for L-dopa. United States patent 4716246.
- Reinhold,U., Lütke-Handjery,H.C., Schnautz,S., Kreysel,H.W. y Abken,H. (1997) The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 166-169.
- Ren,Q., Henes,B., Fairhead,M. y Thöny-Meyer,L. (2013) High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* **27**,13-18.
- Rendon,M. y Horwitz,S. (2012) Topical treatment of hyperpigmentation disorders. *Ann. Dermatol.Venereol.* **139**, S153-S158.
- Rescigno,A., Sanjust,E., Soddu,G., Rinaldi,A.C., Sollai,F., Curreli,N. y Rinaldi,A. (1998) Effect of 3-hydroxyanthranilic acid on mushroom tyrosinase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 268-276.
- Rescigno,A., Sollai,F., Pisu,B., Rinaldi,A. y Sanjust,E. (2002) Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **17**, 207-218.
- Rescigno,A., Bruyneel,F., Padiglia,A., Sollai,F., Salis,A., Marchand-Brynaert,J. y Sanjust,E. (2011a) Structure-activity relationships of various amino-hydroxy-benzenesulfonic acids and sulfonamides as tyrosinase substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**, 799-807.
- Rescigno,A., Casañola-Martin,G.M., Sanjust,E., Zucca,P. y Marrero-Ponce,Y. (2011b) Vanilloid derivatives as tyrosinase inhibitors driven by virtual screening-based QSAR models. *Drug Test Anal.* **3**, 176-181.
- Rigel,D.S., Russak,J. y Friedmann,R. (2010) The Evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J. Clin.* **12**, 301-316.
- Rijiravanich,P., Aoki,K., Chen,J., Surareungchai,W. y Somasudrum,M. (2004) Electrode reactions of catechol and tyrosinase immobilized latex suspensions. *Electroanalysis* **16**, 605-611.
- Ríos,L., Nagore,E., López,J.L., Redondo,P., Martí,R.M., Fernández-de-Misa,R. y Soler,B. (2013) Melanoma characteristics at diagnosis from the Spanish National Cutaneous Melanoma Registry: 15 years of experience. *Actas Dermosifiliogr.* **104**, 789-799.
- Rizza,L., Frasca,G., Bonina,C. y Puglia,C. (2010) Comparative in vivo study of the efficacy and tolerance of exfoliating agents using reflectance spectrophotometric methods. *J. Cosmet. Sci.* **61**, 247-258.
- Robb,D.A. (1984) Tyrosinase. En: *Copper proteins and copper enzymes*. Lontie, R. Ed., CRC Press, Boca Ratón pp. 207-241.
- Robinson,N.J. y Winge,D.R. (2010) Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 537-562.
- Rodríguez-López,J.N., Tudela,J., Varón,R. y García-Cánovas,F. (1991a) Kinetic study on the effect of pH on the melanin biosynthesis pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 379-386.

- Rodríguez-López, J.N., Serna-Rodríguez, P., Tudela, J., Varón, R. y García-Cánovas, F. (1991b) A continuous spectrophotometric method for the determination of diphenolase activity of tyrosinase using 3,4-dihydroxymandelic acid. *Anal. Biochem.* **195**, 369-374.
- Rodríguez-López, J.N., Ros-Martínez, J.R., Varón, R. y García-Cánovas, F. (1992a) Calibration of a Clark-Type oxygen electrode by tyrosinase-catalyzed oxidation of 4-tert-butylcatechol. *Anal. Biochem.* **202**, 356-360.
- Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varón, R., García-Carmona, F. y García-Cánovas, F. (1992b) Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 3801-3810.
- Rodríguez-López, J.N., Bañón-Arno, M., Martínez-Ortiz, F., Tudela, J., Acosta, M., Varón, R. y García-Cánovas, F. (1992c) Catalytic oxidation of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine by tyrosinase: identification and evolution of intermediates. *Biochim. Biophys. Acta* **1160**, 221-228.
- Rodríguez-López, J.N., Ros, J.R., Varón, R., García-Cánovas, F. (1993a) Oxygen Michaelis constants for tyrosinase. *Biochem. J.* **293**, 859-866.
- Rodríguez-López, J.N., Varón, R. y García-Cánovas, F. (1993b) Oxidation of 6-hydroxydopamine catalyzed by tyrosinase. *Int. J. Biochem.* **25**, 1175-1182.
- Rodríguez-López, J.N., Escribano, J. y García-Cánovas, F. (1994) A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal. Biochem.* **216**, 205-212.
- Rodríguez-López, J.N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Devece, C., Sánchez-Hernández, D., de Los Reyes, E. y García-Cánovas, F. (1999) Thermal inactivation of mushroom polyphenoloxidase employing 2450 MHz microwave radiation. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3028-3035.
- Rodríguez-López, J.N., Fenoll, L.G., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Tudela, J., Thorneley, R.N. y García-Cánovas, F. (2000a) Stopped-flow and steady-state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry* **39**, 10497-10506.
- Rodríguez-López, J.N., López Molina, D., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2000b) *Enzima con actividad peroxidasa aislada de la alcachofa (Cynara scolymus L.), procedimiento para su aislamiento, purificación y aplicaciones.* Patente P200002553/6.
- Rodríguez-López, J.N., Tudela, J. y García Cánovas, F. (2000c) *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.* Patente P200002544/7.
- Rodríguez-López, J.N., Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Martínez-Ortiz, F. y Tudela, J. (2001) Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of *o*-diphenol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1548**, 238-256.
- Rodríguez-Sevilla, E., Ramírez-Silva, M.T., Romero-Romo, M., Ibarra-Escutia, P. y Palomar-Pardavé, M. (2014) Electrochemical quantification of the antioxidant capacity of medicinal plants using biosensors. *Sensors* **14**, 14423-14439.
- Roh, J.S., Han, J.Y., Kim, J.H. y Hwang, J.K. (2004) Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) seeds for melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1976-1978.
- Roh, K.B., Kim, C.H., Lee, H., Kwon, H.M., Park, J.W., Ryu, J.H., Kurokawa, K., Ha, N.C., Lee, W.J., Lemaitre, B., Söderhäll, K. y Lee, B.L. (2009) Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. *J. Biol. Chem.* **284**, 19474-19481.
- Roméro-Graillet, C., Aberdam, E., Clément, M., Ortonne, J.P. y Ballotti, R. (1997) Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**, 635-642.
- Rompel, A., Fischer, H., Meiwes, D., Büldt-Karentzopoulos, K., Dillinger, R., Tuzcek, F., Witzel, H. y Krebs, B. (1999) Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 56-63.

- Rompel,A., Büldt-Karentzopoulos,K., Molitor,C. y Krebs,B. (2012) Purification and spectroscopic studies on catechol oxidase from lemon balm (*Melissa officinalis*). *Phytochemistry* **81**, 19-23.
- Roomi,M.W. y Tsao,C.S. (1998) Thin-layer chromatographic separation of isomers of ascorbic acid and dehydroascorbic acid as sodium borate complexes on silica gel and cellulose plates. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1406-1409.
- Ros,J.R., Rodríguez-López,J.N. y García-Cánovas,F. (1993a) Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* **295**, 309-312.
- Ros,J.R., Rodríguez-Lopez,J.N. y García-Canovas,F. (1993b) Effect of ferrous ions on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 303-308.
- Ros,J.R., Rodríguez-López,J.N. y García-Cánovas,F. (1994a) Tyrosinase : Kinetic analysis of the transient phase and the steady-state. *Biochim. Biophys. Acta* **1204**, 33-42.
- Ros,J.R., Rodríguez-López,J.N., Varón,R. y García-Cánovas,F. (1994b) Kinetics study of the oxidation of 4-tert-butylphenol by tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **222**, 449-452.
- Ros,J.R., Rodríguez-López,J.N., Varón,R. y García-Cánovas,F. (1995) Mushroom tyrosinase has an ascorbate oxidase activity. *Biochem. Mol. Biol.* **36**, 301-309.
- Ros,J.R., Rodríguez-López,J.N., Espín,J.C., Varón,R. y García-Cánovas,F. (1996) Oxymetric and spectrophotometric study of the ascorbate oxidase activity shown by frog epidermis tyrosinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 917-923.
- Rouet-Mayer,M.A. y Philippon,J. (1986) Inhibition of catechol oxidases from apples by sodium chloride. *Phytochemistry* **25**, 2717-2719.
- Roulin,A., Jungi,T.W., Pfister,H. y Dijkstra,C. (2000) Female barn owls (*Tyto alba*) advertise good genes. *Proc. Biol. Sci.* **267**, 937-941.
- Rouzaud,F., Kadekaro,A.L., Abdel-Malek,Z.A. y Hearing,V.J. (2005) MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutant. Res.* **571**,133-152.
- Ruan,L., Yu,Z., Fang,B., He,W., Wang,Y. y Shen,P. (2004) Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 286-289.
- Ryan,D. y Robards,K. (1998) Phenolics compounds in olives. *Analyst* **123**, 31R-44R.
- Sáenz,S., Conejo-Mir,J. y Cayuela,A. (2005) Melanoma epidemiology in Spain. *Actas Dermosifiliogr.* **96**,411-418.
- Saini,A.S., Kumar,J. y Melo,J.S. (2014) Microplate based optical biosensor for l-Dopa using tyrosinase from *Amorphophallus campanulatus*. *Anal. Chim. Acta* **849**, 50-56.
- Saino,N., Canova,L., Costanzo,A., Rubolini,D., Roulin,A. y Moller,A. (2013) Immune and Stress Responses Covary with Melanin-Based Coloration in the Barn Swallow. *Evol. Biol.* **40**, 521-531.
- Saitoh,T., Asano,K. y Hiraide,M. (2011) Removal of phenols in water using chitosan-conjugated thermo-responsive polymers. *J. Hazard. Mater.* **185**, 1369-1373.
- Sakurai,T. y Kataoka,K. (2007) Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chem. Rec.* **7**, 220-229.
- Salti,G.I., Manougian,T., Farolan,M., Shilkaitis,A., Majundar,D. y Das Gupta,T.K. (2000) Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res.* **60**, 5012-5016.
- Sánchez-Amat,A., Lucas-Elió,P., Fernández,E., García-Borrón,J.C. y Solano,F. (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1547**, 104-116.
- Sánchez-Amat,A., Solano,F. y Lucas-Elió,P. (2010) Finding new enzymes from bacterial physiology: a successful approach illustrated by the detection of novel oxidases in *Marinomonas mediterranea*. *Mar Drugs* **8**, 519-541.

- Sánchez-Ferrer,A., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y García-Carmona,F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 1-11.
- Sánchez-Hernández,D., Devece,C., Catalá,J.M., Rodríguez-López,J.N., Tudela,J., García-Cánovas,F. y de los Reyes,E. (1999) Enzyme inactivation analyses for industrial blanching applications employing 2450 Mhz monomode microwave cavities. *J. Microw. Power Elctromagn. Energy* **34**, 239-252.
- Sánchez-Paniagua,M.L., Charmantray,F., Helaine,V., Hecquet,L. y Mousty,C. (2010) Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosens Bioelectron* **26**, 139-143.
- Sánchez-Paniagua,M.L. y López-Ruiz,B. (2011) Inhibition biosensor based on calcium phosphate materials for detection of benzoic acid in aqueous and organic media. *Electroanalysis* **23**, 264-271.
- Sanjust,E., Cecchini,G., Sollai,F., Curreli,N. y Rescigno,A. (2003) 3-Hydroxykynurenine as a substrate/activator for mushroom tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**, 272-278.
- Santerre,C.R., Cash,J.N. y Vannorman,D.J. (1988) Ascorbic acid/citric acid combinations in the prozesis of frozen apple slices. *J. Food Sci.* **53**, 1713-1716.
- Sarna,T., Swarz,H.M. y Scout,G. (1993) Interactions of melanin with oxygen(and related species). En: *Atmospheric oxidation and antioxidants*, vol III. Sarna,T., Swarz,H.M. y Scout,G. (Eds) Oxford: Elsevier Science Publishers. pp. 129-165.
- Sato,C., Ito,S. y Takeuchi,T. (1987) Enhancement of pheomelanogenesis by L-dopa in the mouse melanocyte cell line, TM10, in vitro. *J. Cell Sci.* **87**, 507-512.
- Satooka,H. y Kubo,I. (2012) Resveratrol as a kcat type inhibitor for tyrosinase: potentiated melanogenesis inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1090-1099.
- Saul,S.J. y Sugumaran,M (1989) Characterization of a new enzyme system that desaturates the side chain of N-acetyldopamine. *FEBS lett.* **251**, 69-73.
- Saul,S.J. y 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 methyde. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **15**, 237-254.
- Sayed,I.A. y Sudalai,A. (2004) Asymmetric synthesis of L-DOPA and (R)-selegiline via OsO₄-catalyzed asymemetric dihydroxylation. *Tetrahedron-Asymmetry* **15**, 3111-3116.
- Schachtschabel,D.O., Leising,H.B., Schjeide,O.A. y Moisen,D.V. (1978) Uptake of melanosomes and increased melanin formation by cultured melanoma cells after treatment with isolated melanosomes. *Cytobios.* **21**, 23-36.
- Schachtschabel,D.O., Pfab,R., Paul,N. y Hess,F. (1988) Augmentation by L-dopa of growth inhibition and melanin formation of X-irradiated Harding-Passey melanoma cells in culture. *Strahlenther. Onkol.* **164**, 419-424.
- Schaerlaekens,K., Schierová,M., Lammertyn,E., Geukens,N., Anné,J. y Van Mellaert,L. (2001) Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J. Bacterial.* **183**, 6727-6732.
- Schallreuter,K.U., Wood,J.M., Pittelkow,M.R., Gütlich,M., Lemke,K.R., Rödi,W., Swanson,N.H., Hitzemann,K. y Ziegler,I. (1994) Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**, 1444-1446.
- Schallreuter,K.U. (1999) A review of recent advances on the regulation of pigmentation in the human epidermis. *Cell Mol. Biol.* **45**, 943-949.
- Schallreuter,K.U., Kothari,S., Hasse,S., Kauser,S., Lindsey,N.J., Gibbons,N.C., Hibberts,N. y Wood,J.M. (2003) In situ and in vitro evidence for DCoH/HNF-1 alpha transcription of tyrosinase in human skin melanocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 610-616.
- Schallreuter,K.U., Kothari,S., Chavan,B. y Spencer,J.D. (2008) Regulation of melanogénesis-controversies and new concepts. *Exp. Dermatol.* **17**, 395-404.

- Scherbel,A.L., McCormack,L.J. y Layle,J.K. (1967) Further observations on the effect of dimethyl sulfoxide in patients with generalized scleroderma. (Progressive systemic sclerosis). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **141**, 613-629.
- Schittek,B., Bodingbauer,Y., Ellwanger,U., Blaheta,H.J. y Garbe C. (1999) Amplification of MelanA messenger RNA in addition to tyrosinase increases sensitivity of melanoma cell detection in peripheral blood and is associated with the clinical stage and prognosis of malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* **141**, 30-36.
- Schmid-Hempel,P. y Ebert,D. (2003) On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 27-32.
- Schrader,A.J., Probst-Kepper,M., Grosse,J., Kunter,U., Schenk,F., Franzke,A., Atzpodien,J. y Buer,J. (2000) Molecular and prognostic classification of advanced melanoma: a multimarker microcontamination assay of peripheral blood stem cells. *Melanoma Res.* **10**, 355-362.
- Schweikardt,T., Olivares,C., Solano,F., Jaenicke,E., García-Borrón,J.C. y Decker,H. (2007) A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. *Pigment Cell Res.* **20**, 394-401.
- Schurink,M., van Berkel,W.J., Wichers,H.J. y Boeriu,C.G. (2007) Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides* **28**, 485-495.
- Score,A.J., Palfreyman,J.W. y White,N.A. (1997) Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *Int. Biodeterior. Biodegrad* **39**, 225-233.
- Scott,G., Leopardi,S., Printup,S., Malhi,N., Seiberg,M. y Lapoint,R. (2004) Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1214-1224.
- Scott,G., Jacobs,S., Leopardi,S., Anthony,F.A., Learn,D., Malaviya,R. y Pentland,A. (2005) Effects of PGF2alpha on human melanocytes and regulation of the FP receptor by ultraviolet radiation. *Exp. Cell Res.* **304**, 407-416.
- Sealy,R.C., Hyde,J.S., Felix,C.C., Menon,I.A. y Prota,G. (1982) Eumelanins and pheomelanins. Characterization by electron spin resonance spectroscopy. *Science* **217**, 545-547.
- Seetharam,G. y Saville,B.A. (2002) L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 747-753.
- Seiberg,M., Paine,C., Sharlow,E., Andrade-Gordon,P., Costanzo,M., Eisinger,M. y Shapiro,S.S. (2000a) Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 162-167.
- Seiberg,M., Paine,C., Sharlow,E., Andrade-Gordon,P., Costanzo,M., Eisinger,M. y Shapiro,S.S. (2000b) The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp. Cell Res.* **254**, 25-32.
- Seiji,M., Sasaki,M. y Tomita,Y. (1978) Nature of tyrosinase inactivation in melanosomes. *Tohoku J. Exp. Med.* **125**, 233-245.
- Sellés-Marchart,S., Casado-Vela,J. y Bru-Martínez,R. (2007) Effect of detergents, trypsin and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase: basis for the enzyme's activity regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **464**, 295-305.
- Sendovski,M., Kanteev,M., Ben-Yosef,V.S., Adir,N. y Fishman,A. (2010) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 1101-1103.
- Sendovski,M., Kanteev,M., Ben-Yosef,V.S., Adir,N. y Fishman,A. (2011) First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.* **405**, 227-237.
- Seo,S.Y., Sharma,V.K. y Sharma,N. (2003) Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2837-2853.
- Seo,W.D., Ryu,Y.B., Curtis-Long,M.J., Lee,C.W., Ryu,H.W., Jang,K.C. y Park,K.H. (2010) Evaluation of anti-pigmentary effect of synthetic sulfonylamino chalcone. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 2010-2017.

- Serna-Rodríguez,P., Rodríguez-López,J.N., Tudela,J., Varón,R. y García-Cánovas,F. (1990) Effect of pH on the oxidation pathway of alpha-methyl-dopa catalysed by tyrosinase. *Biochem. J.* **272**, 459-463.
- Sharlow,E.R., Paine,C.S., Babiartz,L., Eisinger,M., Shapiro,S. y Seiberg,M. (2000) The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 3093-3101.
- Shao,J., Ge,H.L. y Yang,Y.M. (2007) Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO₂ gel for removal of aqueous phenol. *Biotechnol. Lett.* **29**, 901-905.
- Shao,J., Huang,L.L. y Yang,Y.M. (2009) Immobilization of polyphenol oxidase on alginate-SiO₂ hybrid gel: stability and preliminary applications in the removal of aqueous phenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 633-635.
- Sheth,V.M. y Pandya,A.G. (2011) Melasma: a comprehensive update. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.* **65**, 689-697.
- Shi,C., Dai,Y., Xu,X., Xie,Y. y Liu,Q. (2002) The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Exp. Pur.* **24**, 51-55.
- Shi,Y., Chen,Q.X., Wang,Q., Song,K.K. y Qiu,L. (2005) Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase. *Food Chem.* **92**, 707-712.
- Shin,J.M., Lee,J.Y., Lee,D.Y., Yoon,T.Y., Lee,J.C., Lim,E.H., Sohn,K.C., Lee,Y.H., Im,M., Seo,Y.J., Kim,C.D., Lee,J.H. y Lee,Y. (2014a) Proton pump inhibitors as a possible cause of vitiligo: an in vivo and in vitro study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **28**, 1475-1479.
- Shin,J.W. y Park,K.C. (2014b) Current clinical use of depigmenting agents. *Dermatologica Sinica* **32**, 205-210.
- Shipovskov,S. y Levashov,A. (2003) Tyrosinase: Polybrene noncovalent complexes in water-ethanol mixtures. *Biotech. Bioeng.* **84**, 258-263.
- Shuster,V. y Fishman,A. (2009) Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 188-200.
- Siegrist,W., Drozd,R., Cotti,R., Willard,D.H., Wilkison,W.O. y Eberle,A.N. (1997) Interactions of alpha-melanotropin and agouti on B16 melanoma cells: evidence for inverse agonism of agouti. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **17**, 75-98.
- Silva,L.M., de Mello,A.C. y Salgado,A.M. (2014) Phenol determination by an amperométrico biosensor based on lyophilized mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue. *Environ. Technol.* **35**, 1012-1017.
- Silverman,R.B. (1995) Mechanism-based enzyme inactivators. *Methods Enzymol.* **249**, 240-283.
- Sima,V.H., Patris,S., Aydogmus,Z., Sarakbi,A., Sandulescu,R. y Kauffmann,J.M. (2011) Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: application to the skin whitening agents. *Talanta* **83**, 980-987.
- Simon,J.D., Peles,D., Wakamatsu,K. e Ito,S. (2009) Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 563-579.
- Singh,R.P. (2011) A catechol biosensor based on a gold nanoparticles encapsulated-dendrimer. *Analyst* **136**, 1216-1221.
- Slominski,A., Moellmann,G., Kuklinska,E., Bormirski,A. y Pawelek,J. (1988) Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway, L-tyrosine and L-dopa. *J. Cell Sci.* **89**, 287-296.
- Slominski,A., Paus,R. y Bomirski,A. (1989) Hypothesis: possible role for the melatonin receptor in vitiligo: discussion paper. *J. R. Soc. Med.* **82**, 539-541.
- Slominski,A., Paus,R. y Mihm,M.C. (1998) Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis. *Anticancer Res.* **18**, 3709-3715.
- Slominski,A., Tobin,D.J., Shibahara,S. y Wortsman,J. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155-1228.

- Smart,R.C., Mills,K.J., Hansen,L.A. y Conney,A.H. (1989) Synthetic lipid second messenger sn-1,2-didecanoylglycerol: a complete tumor promoter in mouse skin. *Cancer Res.* **49**, 4455-4458.
- Smit,N., Vicanova,J. y Pavel,S. (2009) The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 326-349.
- Söderhäll,K., Aspán,A. y Duvic,B. (1990) The proPO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.* **141**, 896-907.
- Solano,F., Martínez-Liarte,J.H., Jiménez-Cervantes,C., García-Borrón,J.C. y Lozano,J.A. (1994) Dopachrome tautomerase is a zinc-containing enzyme. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **204**, 1243-1250.
- Solano,F., Briganti,S., Picardo,M. y Ghanem,G. (2006) Hypopigmentating agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.* **19**, 550-571.
- Soler-Rivas,C., Arpin,N., Olivier,J.M. y Wichers,H.J. (2000) Discoloration and tyrosinase activity in *Agaricus bisporus* fruit bodies infected with various pathogens. *Mycol. Res.* **104**, 351-356.
- Soliva-Fortuny,R.C., Grigelmo-Miguel,N., Odriozola-Serrano,I., Gorstein,S. y Martín-Belloso,O. (2001) Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3685-3690.
- Soliva,C., Philippon,J. y Rouet-Mayer,M.A. (2003) Browning/Enzymatic-biochemical aspects. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 678-686.
- Sollai,F., Zucca,P., Sanjust,E., Steri,D. y Rescigno,A. (2008) Umbelliferone and esculetin: inhibitors or substrates for polyphenol oxidases?. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 2187-2193.
- Solomon,E.I., Baldwin,M.J. y Lowery,M.D. (1992) Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chem. Rev.* **92**, 521-542.
- Solomon,E.I., Tuczek,F., Root,D.E. y Brown,C.A. (1994) Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes. *Chem. Rev.* **94**, 827-856.
- Solomon,E.I., Sundaram,U.M. y Machonkin,T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563-2606.
- Solomon,E.I., Heppner,D.E., Johnston,E.M., Ginsbach,J.W., Cirera,J., Qayyum,M., Kieber-Emmons,M.T., Kjaergaard,C.H., Hadt,R.G. y Tian,L. (2014) Copper active sites in biology. *Chem. Rev.* **114**, 3659-3853.
- Sommer,A., Neeman,E., Steffens,J.C., Mayer,A.M. y Harel,E. (1994) Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* **105**, 1301-1311.
- Song,W., Li,D.W., Li,Y.T., Li,Y. y Longa,Y.T. (2011) Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 3181-3186.
- Sonmez,F., Sevmezler,S., Atahan,A., Ceylan,M., Demir,D., Gencer,N., Arslan,O. y Kucukislamoglu,M. (2011) Evaluation of new chalcone derivatives as polyphenol oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 7479-7482.
- Spencer,M.C. (1965) Topical use of hydroquinone for depigmentation. *J.A.M.A.* **194**, 962-964.
- Spritz,R.A., Itin,P.H. y Gutmann,D.H. (2004) Piebaldism and neurofibromatosis type 1: horses of very different colors. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 34-35.
- Sprong,H., Degroote,S., Claessens,T., van Drunen,J., Oorschot,V., Westerink,B.H., Hirabayashi,Y., Klumperman,J., van der Sluijs,P. y van Meer,G. (2001) Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **155**, 369-80.
- Srivastava,M.K., Sinha,P., Clements,V.K., Rodríguez,P. y Ostrand-Rosenberg,S. (2010) Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* **70**, 68-77.
- Staricco,R.J. y Pinkus,H. (1957) Quantitative and qualitative data on the pigment cells of adult human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **28**, 33-45.

- Steiner,U., Schliemann,W., Bohm,H. y Strack,D. (1999) Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **208**, 114-124.
- Stone,S., Jiang,P., Dayananth,P., Tavtigian,S.V., Katcher,H., Parry,D., Peters,G. y Kamb,A. (1995) Complex structure and regulation of the P16 (MTSI) Locus. *Cancer Res.* **55**, 2988-2994.
- Stott,F.J., Bates,S., James,M.C., McConnell,B.B., Starborg,M., Brookes,S., Palmero,I., Ryan,K., Hara, E., Vousden,K.H. y Peters,G. (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO. J.* **17**, 5001-5014.
- Strack,D., Vogt,T. y Schliemann,W. (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247-269.
- Stratford,M.R., Ramsden,C.A. y Riley,P.A. (2012) The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 4364-4370.
- Strothkamp,K.G., Jolley,R.L. y Mason,H.S. (1976) Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 519-524.
- Subramanian,K., Balaraman,D., Balachandran,D.N., Thirunavukarasu,R., Gopal,S., Renuka,P.S. y Kumarappan,A. (2014) Immune response of shrimp (*Penaeus monodon*) against *Vibrios furnissii* pathogen. *J. Coastal Life Med.* **2**, 281-286.
- Subrizi,F., Crucianelli,M., Grossi,V., Passacantando,M., Pesci,L. y Saladino,R. (2014) Carbon nanotubes as activating tyrosinase supports for the selective synthesis of catechols. *ACS Catal.* **4**, 810-822.
- Sugumaran,M. y Lipke,H. (1983) Quinone methide formation from 4-alkylcatechols: a novel reaction catalyzed by cuticular polyphenol oxidase. *FEBS Lett.* **155**, 65-68.
- Sugumaran,M., Semensi,V., Dali,H. y Nellaiappan,K. (1991) Oxidation of 3,4-dihydroxybenzyl alcohol: a sclerotizing precursor for *cockroach ootheca*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **16**, 31-44.
- Sugumaran,M. (1991) Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis. Comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett.* **295**, 233-239.
- Sugumaran,M. (2001) Control mechanisms of the prophenoloxidase cascade. *Adv. Exp. Med. Biol.* **484**, 289-298.
- Sugumaran,M. (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* **15**, 2-9.
- Sugumaran,M. (2010) Chemistry of cuticular sclerotization. *Adv. In insect phys.* **39**, Academic Press, Elsevier.
- Sullivan,M.L. (2015) Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Front. Plant Sci.* **5**, 783. DOI: 10.3389/fpls.2014.00783.
- Surwase,S.N. y Jadhav,J.P. (2011) Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium *Bacillus* sp. JPJ. *Amino Acids* **41**, 495-506.
- Surwase,S.N., Patil,S.A., Apine,O.A. y Jadhav,J.P. (2012) Efficient microbial conversion of L-tyrosine to L-DOPA by *Brevundimonas* sp. SGJ. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**, 1015-1028.
- Suzuki,I., Cone,R.D., Im,S., Nordlund,J. y Abdel-Malek,Z.A. (1996) Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* **137**, 1627-1633.
- Szabó,G. (1967) Regional anatomy of human integument with special reference to distribution of hair follicles sweat glands and melanocytes. *Phil. Trans. R. Soc. London B.* **252**, 447-485.
- Szabó,G., Gerald,A.B., Pathak,M.A. y Fitzpatrick,T.B. (1969) Racial differences in the fate of melanosomes in human epidermis. *Nature* **222**, 1081-1082.
- Tada,A., Suzuki,I., Im,S., Davis,M.B., Cornelius,J., Babcock,G., Nordlund,J.J. y Abdel-Malek,Z.A. (1998) Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ.* **9**, 575-584.

- Tai, S.S., Lin, C.G., Wu, M.H. y Chang, T.S. (2009) Evaluation of depigmenting activity by 8-hydroxydaidzein in mouse B16 melanoma cells and human volunteers. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 4257-4266.
- Taïeb, A. y Picardo, M. (2009) Clinical practice. Vitiligo. *N. Engl. J. Med.* **360**, 160-169.
- Taïeb, A.M., Cario-André, S., Briganti, M., Picardo, B.J. y Riley, P.A. (2011) Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim. p 119.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R. y Yamada, K.M. (1998) Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumour suppressor PTEN. *Science* **280**, 1614-1617.
- Tamura, A., Stoh, E., Kashiwada, A., Matsuda, K. y Yamada, K. (2010) Removal of alkylphenols by the combined use of tyrosinase immobilized on ion-exchange resins and chitosan beads. *J. Appl. Polym. Sci.* **115**, 137-145.
- Tang, L., Zhou, Y., Zeng, G., Li, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Chen, G., Yang, G., Lei, X. y Wu, M. (2013) A tyrosinase biosensor based on ordered mesoporous carbon-Au/L-lysine/Au nanoparticles for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. *Analyst* **138**, 3552-3560.
- Tao, Y.M., Yao, L.Y., Qin, Q.Y. y Shen, W. (2013) Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 12662-12669.
- Taylor, S.C., Torok, H., Jones, T., Lowe, N., Rich, P., Tschen, E., Menter, A., Baumann, L., Wieder, J.J., Jarratt, M.M., Pariser, D., Martin, D., Weiss, J., Shavin, J. y Ramirez, N. (2003) Efficacy and safety of a new triple-combination agent for the treatment of facial melasma. *Cutis* **72**, 67-72.
- Telang, P.S. (2013) Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatol. Online J.* **4**, 143-146.
- Tembe, S., Kubalb, B.S., Karvea, M. y D'Souza, S.F. (2008) Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus campanulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine. *Anal. Chim. Acta* **612**, 212-217.
- Tembe, S., Kubalb, B.S., Karvea, M. y D'Souza, S.F. (2009) Epinephrine biosensor using tyrosinase immobilized eggshell membrane. *Sens. Transd. J.* **107**, 111-118.
- Tepper, A.W., Bubacco, L. y Canters, G.W. (2002) Structural basis and mechanism of the inhibition of the type-3 copper protein tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* by halide ions. *J. Biol. Chem.* **277**, 30436-30444.
- Terabayashi, Y., Sano, M., Yamane, N., Marui, J., Tamano, K., Segara, J., Dohmoto, M., Oda, K., Ohshima, E., Tachibana, K., Higa, Y., Ohashi, S., Koike, H. y Machida, M. (2010) Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, and industrially important compound from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 953-961.
- Teruel, J.A., Tudela, J., Fernández-Belda, F., García-Carmona, F., García-Cánovas, F. y Gómez-Fernández, J.C. (1986) A kinetic study of the irreversible inhibition of an enzyme measured in the presence of coupled enzymes. Fluorescein isothiocyanate as inhibitor of the adenosinetriphosphatase activity from sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **869**, 8-15.
- Teruel, J.A., Tudela, J., Fernández-Belda, F., García-Carmona, F., Gómez-Fernández, J.C. y García-Cánovas, F. (1987) Kinetic characterization of an enzymatic irreversible inhibition measured in the presence of coupling enzymes. The inhibition of adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum by fluorescein isothiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta* **911**, 256-260.
- Tessari, I., Bisaglia, M., Valle, F., Samori, B., Bergantino, E., Mammi, S. y Bubacco, L. (2008) The reaction of alpha-synuclein with tyrosinase: possible implications for Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* **283**, 16808-16817.
- Thanigaimalai, P., Hoang, T.A., Lee, K.C., Bang, S.C., Sharma, V.K., Yun, C.Y., Roh, E., Hwang, B.Y., Kim, Y. y Jung, S.H. (2010) Structural requirement(s) of N-phenylthioureas and benzaldehyde thiosemicarbazones as inhibitors of melanogenesis in melanoma B 16 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2991-2993.
- Thipyapong, P., Hunt, M.D. y Steffens, J.C. (2004) Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* **220**, 105-117.

- Thody,A.J., Higgins,E.M., Wakamatsu,K., Ito,S., Burchill,S.A. y Marks,J.M. (1991) Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 340-344.
- Thoma,W., Krämer,H.J. y Maysner,P. (2005) Pityriasis versicolor alba. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **19**, 147-152.
- Thomson,J.A., Murphy,K., Baker,E., Sutherland,G.R., Parsons,P.G., Sturm,R.A. y Thomson, F. (1995) The *brn-2* gene regulates the melanocytic phenotype and tumorigenic potential of human melanoma cells. *Oncogene* **11**, 691-700.
- Tomita,Y., Takeda,A., Okinaga,S., Tagami,H. y Shibahara,S. (1989) Human oculocutaneous albinism caused by a single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 990-996.
- Tomiyama,S., Sakai,S., Nihiyama,T. y Yasmada,F. (1993) Factors influencing the antioxidant activities of phenols by an ab initio study. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **66**, 205-211.
- Torok,H.M., Jones,T., Rich,P., Smith,S. y Tschien,E. (2005) Hydroquinone 4%, tretinoin 0.05%, fluocinonide acetone 0.01%: a safe and efficacious 12-month treatment for melasma. *Cutis* **75**, 57-62.
- Toussaint,O. y Lerch,K. (1987) Catalytic-oxidation of 2-aminophenols y ortho-hydroxylation of aromatic-amines by tyrosinase. *Biochemistry* **26**, 8567-8571.
- Traikovich,S.S. (1999) Use of topical ascorbic acid and its effects on photodamaged skin topography. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **125**, 1091-1098.
- Tran,L.T., Taylor,J.S. y Constabel,C.P. (2012) The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics* **13**, 395-407.
- Tsao,A.S., Kantarjian,H., Cortes,J., O'Brien,S. y Talpaz,M. (2003) Imatinib mesylate causes hypopigmentation in the skin. *Cancer* **98**, 2483-2487.
- Tudela,J., García-Cánovas,F., García-Carmona,F., Iborra,J.L. y Lozano,J.A. (1986) Irreversible inhibition of trypsin by TLCK. A continuous method for kinetic study of irreversible enzymatic inhibitors in the presence of substrate. *Int. J. Biochem.* **18**, 285-288.
- Tudela,J., García-Cánovas,F., Varón,R., Jimenez,M., García-Carmona,F. y Lozano,J.A. (1987a) Kinetic characterization of dopamine as suicide substrate of tyrosinase. *J. Enzyme. Inhib.* **2**, 47-56.
- Tudela,J., García-Cánovas,F., Varón,R., García-Carmona,F., Gálvez,J. y Lozano,J.A. (1987b) Transient-phase kinetics of enzyme inactivation induced by suicide substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **912**, 408-416.
- Tudela,J., García-Cánovas,F., Varón,R., Jimenez,M., García-Carmona,F. y Lozano,J.A. (1988) Kinetic study in the transient phase of the suicide inactivation of frog epidermis tyrosinase. *Biophys. Chem.* **30**, 303-310.
- Tyeklar,Z. y Karlin,K.D. (1989) Copper-Dioxygen chemistry: A bioinorganic challenge. *Acc. Chem. Res.* **22**, 241-248.
- Ubeid,A.A. y Hantash,B.M. (2014) Minireview: Peptide analogs and short sequence oligopeptides as modulators of skin pigmentation. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1418-1424.
- Valdes,R.H., Puzer,L., Gomes,M., Marques,C.E.S.J., Aranda,D.A.G., Bastos,M.L., Gernal,A.L. y Antunes,O.A.C. (2004) Production of L-DOPA under heterogeneous asymmetric catalysis. *Catal. Commun* **5**, 631-634.
- Vámos-Vigyázó,L. (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **15**, 49-127.
- van Gelder,C.W., Flurkey,W.H. y Wichers,H.J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309-1323.
- van Nieuwpoort,F., Smit,N.P., Kolb,R., van der Meulen,H., Koerten,H. y Pavel,S. (2004) Tyrosinase-induced melanogenesis shows differences in morphologic and melanogenic preferences of melanosomes from light and dark skin types. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1251-1255.

- Vancoillie,G., Lambert,J., Mulder,A., Koerten,H.K., Mommaas,A.M., Van Oostveldt,P. y Naeyaert, J.M. (2000a) Cytoplasmic dynein colocalizes with melanosomes in normal human melanocytes. *Br. J. Dermatol.* **143**, 298-306.
- Vancoillie,G., Lambert,J., Mulder,A., Koerten,H.K., Mommaas,A.M., Van Oostveldt,P. y Naeyaert,J.M. (2000b) Kinesin and kinectin can associate with the melanosomal surface and form a link with microtubules in normal human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 421-429.
- Vanneste,W.H. y Zubersbühler,A. (1974) Copper-containing oxygenases. En: *Molecular mechanism of oxygen activation*. Hayaishi,O. (Ed) Academic Press, New York, pp, 371-399.
- Vargas,A.J., Sittadjody,S., Thangasamy,T., Mendoza,E.E., Limesand,K.H. y Burd R. (2011) Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. *Integr. Cancer Ther.* **10**, 328-340.
- Veltman,R.H., Sanders,M.G., Persijn,S.T., Peppelenbos,H.W. y Oosterhaven,J. (1999) Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L-cv. Conference). *Physiol. Plant.* **107**, 39-45.
- Vidal,J.C., Esteban,S., Gil,J. y Castillo,J.R. (2006) A comparative study of immobilization of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide. *Talanta* **68**, 791-799.
- Vijayasaradhi,S., Xu,Y., Bouchard,B. y Houghton,A.N. (1995) Intracellular sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: identification of signals for sorting of the human brown locus protein, gp75. *J. Cell Biol.* **130**, 807-820.
- Virador,V.M., Reyes-Grajeda,J.P., Blanco-Labra,A., Mendiola-Olaya,E., Smith,G.M., Moreno,A. y Whitaker,J.R. (2010a) Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of Grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1189-1201.
- Virador,V.M., Reyes-Grajeda,J.P., Blanco-Labra,A., Mendiola-Olaya,E., Smith,G.M., Moreno,A. y Whitaker,J.R. (2010b) Correction to cloning, sequencing, purification and cristal structure of Grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3867.
- Volbeda,A. y Hol,W.G. (1989) Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **209**, 249-279.
- Vontzalidou,A., Zoidis,G., Chaita,E., Makropoulou,M., Aligiannis,N., Lambrinidis,G., Mikros,E. y Skaltsounis,A.L. (2012) Design, synthesis and molecular simulation studies of dihydrostilbene derivatives as potent tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5523-5526.
- Wagner,R.F. y Casciato,D.A. (2001) Cánceres de la piel. En: *Oncología Clínica*. 4ªedición. Casciato D.A. y Lowitz B.B. Ed. Marban, Madrid, pp. 336-348.
- Waite,J.H. (1984) Determination of (catecholato) borate complexes using difference spectrophotometry. *Anal. Chem.* **56**, 1935-1939.
- Walsh,C.T. (1984) Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 493-535.
- Wan,P.T., Garnett,M.J., Roe,S.M., Lee,S., Niculescu-Duvaz,D., Good,V.M., Jones,C.M., Marshall,C.J., Springer,C.J., Barford,D. y Marais,R. (2004) Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signalling pathway by oncogenic mutations on BRAF. *Cell* **116**, 885-867.
- Wang,B., Zhang,J. y Dong,S. (2000) Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 397-402.
- Wang,D.H., Ootsuki,Y., Fujita,H., Miyazaki,M., Yie,Q., Tsutsui,K., Sano,K., Masuoka,N. y Ogino,K. (2012) Resveratrol inhibited hydroquinone-induced cytotoxicity in mouse primary hepatocytes. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **9**, 3354-3364.
- Wang,J. y Constabel,C.P. (2003) Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry* **64**, 115-121.

- Wang, J. y Constabel, C.P. (2004) Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* **220**, 87-96.
- Wang, L., Ran, Q., Tian, Y., Ye, S., Xu, J., Xian, Y., Peng, R. y Jin, L. (2010) Covalent grafting tyrosinase and its application in phenolic compounds detection. *Microchim. Acta* **171**, 217-223.
- Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L. y Söderhäll, K. (2001) Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 895-902.
- Wang, Y. y Hasebe, Y. (2009) Carbon felt-based bimocatalytic enzymatic flow-through detectors: Chemical modification of tyrosinase onto amino-functionalized carbon felt using various coupling reagents. *Talanta* **79**, 1135-1141.
- Wang, Y. y Hasebe, Y. (2011) Acridine orange-induced signal enhancement effect of tyrosinase-immobilized carbon-felt-based flow biosensor for highly sensitive detection of monophenolic compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 1151-1162.
- Watts, D.G. (1981) An introduction to nonlinear least squares, En: *Kinetic Data Analysis. Design and Analysis of Enzyme and Pharmacokinetics Experiments*. Endrenyi (Ed.) Plenum Press, New York. pp. 1-24.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendricks, M.E. y Tobback, P.P. (1998) Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Food Sci. Technol. Lebensm. Wiss.* **31**, 44-49.
- Wellbrock, C. y Marais, R. (2005) Elevated expression of MITF counteracts B-RAF stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J. Cell Biol.* **170**, 703-708.
- Wehrle-Haller, B., Morrison-Graham, K. y Weston, J.A. (1996) Ectopic c-kit expression affects the fate of melanocyte precursors in Patch mutant embryos. *Dev. Biol.* **177**, 463-474.
- Weijn, A., Bastiaan-Net, S., Wichers, H.J. y Mes, J.J. (2013) Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal Genet. Biol.* **55**, 42-53.
- Wesche-Ebeling, P. y Montgomery, M.W. (1990a) Strawberry polyphenoloxidase: its role in anthocyanin degradation. *J. Food Sci.* **55**, 731-734.
- Wesche-Ebeling, P. y Montgomery, M.W. (1990b) Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization. *J. Food Sci.* **55**, 1315-1319.
- Westerdahl, J., Olsson, H., Mäsback, A., Ingvar, C. y Jonsson, N. (1995) Is the use of sunscreens a risk factor for malignant melanoma? *Melanoma Res.* **5**, 59-65.
- Wichers, H.J., Gerritsen, Y.A.M. y Chapelon, C.G.J. (1996) Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* **43**, 333-337.
- Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.E., Biancone, G., Hoeberichts, F.A., Mooibroek, H. y Soler-Rivas, C. (2003) Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 336-341.
- Wititsuwannakul, D., Chareonthiphakorn, N., Pace, M. y Wititsuwannakul, R. (2002) Polyphenol oxidases from latex *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry* **61**, 115-121.
- Wolf, P., Donawho, C.K. y Kripke, M.L. (1994) Effect of sunscreens on UV radiation-induced enhancement of melanoma growth in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 99-105.
- Wolff, G.L. (2003) Regulation of yellow pigment formation in mice: a historical perspective. *Pigment Cell Res.* **16**, 2-15.
- Wu, B. (2014) Tyrosinase inhibitors from terrestrial and marine resources. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1425-1449.
- Wu, J., Chen, H., Gao, J., Liu, X., Cheng, W. y Ma, X. (2010) Cloning, characterization and expression of two new polyphenol oxidase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Biotechnol. Lett.* **32**, 1439-1447.
- Wu, L., Den, D., Jin, J., Lu, X. y Chen, J. (2012) Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. *Biosens. Bioelectron.* **35**, 193-199.

- Wu,X., Bowers,B., Wei,Q., Kocher,B. y Hammer,J.A. (1997) Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Sci.* **110**, 847-859.
- Wu,H. y Park,H.Y. (2003) Protein kinase C-beta-mediated complex formation between tyrosinase and TRP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 948-953.
- Xu,D.Y., Chen,J.Y. y Yang,Z. (2012) Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of L-DOPA. *Biochem. Eng. J.* **63**, 88-94.
- Xu,D.Y. y Yang,Z. (2013) Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater. *Chemosphere* **92**, 391-398.
- Xu,L., Liu,C., Xiang,W., Chen,H., Qin,X.L. y Huang,X.Z. (2014) Advances in the study of oxyresveratrol. *Int. J. Pharmacol.* **10**, 44-54.
- Xue,C.B., Luo,W.C., Ding,Q., Liu,S.Z. y Gao,X.X. (2008) Quantitative structure-activity relationship studies of mushroom tyrosinase inhibitors. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **22**, 299-309.
- Yaar,M., Grossman,K., Eller,M. y Gillchrest,B.A. (1991) Evidence for nerve growth factor mediated paracrine effects in human epidermis. *J. Cell Biol.* **115**, 821-828.
- Yada,Y., Higuchi,K. y Imokawa,G (1991) Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 18352-18357.
- Yamada,K., Akiba,Y., Shibuya,T., Kashiwada,A., Matsuda,K. y Hirata,M. (2005) Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemicals adsorption by chitosan beads. *Biotechnol. Progr.* **21**,823-829.
- Yamaguchi,Y., Itami,S., Watabe,H., Yasumoto,K., Abdel-Malek,Z.A., Kubo,T., Rouzaud,F., Tanemura,A., Yoshikawa,K. y Hearing,V.J. (2004) Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J. Cell Biol.* **165**, 275-285.
- Yamazaki,S. e Itoh,S. (2003) Kinetic evaluation of phenolase activity of tyrosinase using simplified catalytic reaction system. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13034-13035.
- Yamazaki,S., Morioka,S. e Itoh,S. (2004) Kinetic evaluation of catalase and peroxygenase activities of tyrosinase. *Biochemistry* **43**, 11546-11553.
- Yang,L., Xiong,H., Zhang,X. y Wang,S. (2012) A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film. *Bioelectrochemistry* **84**, 44-48.
- Yang,M.H., Chen,C.M., Hu,Y.H., Zheng,C.Y., Li,Z.C., Ni,L.L., Sun,L. y Chen,Q.X. (2013) Inhibitory kinetics of DABT and DABPT as novel tyrosinase inhibitors. *J. Biosci. Bioeng.* **115**, 514-517.
- Yaropolov,A.I., Kharybin,A.N., Emneus,J., Marko-Varga,G. y Gorton,L. (1995) Flow-injection analysis of phenols at a graphite electrode modified with co-immobilized laccase and tyrosinase. *Anal. Chim. Acta* **308**, 137-144.
- Yasumoto,K., Yokoyama,K., Takahashi,K., Tomita,Y. y Shibahara,S. (1997) Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J. Biol. Chem.* **272**, 503-509.
- Yi,W., Dubois,C., Yahiaoui,S., Haudecoeur,R., Belle,C., Song,H., Hardré,R., Réglier,M. y Boumendjel,A. (2011) Refinement of arylthiosemicarbazone pharmacophore in inhibition of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4330-4335.
- Yildiz,H.B., Kiralp,S., Toppare,L. y Yagci,Y. (2005) Immobilization of tyrosinase in poly(ethyleneoxide) electrodes and determination of phenolics in red wines. *React. Funct. Polym.* **63**, 155-161.
- Yohn,J.J., Norris,D.A., Yrastorza,D.G., Buno,I.J., Leff,J.A., Hake,S.S. y Repine,J.E. (1991) Disparate antioxidant enzyme activities in cultured cutaneous fibroblasts, keratinocytes and melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 405-409.
- Yoshida,M., Takahashi,Y. e Inoue,S. (2000) Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H₂ receptors in human normal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 334-342.

- Young, A.R., Potten, C.S., Chadwick, C.A., Murphy, G.M. y Cohen, A.J. (1988) Inhibition of UV radiation-induced DNA damage by a 5-methoxypsoralen tan in human skin. *Pigment Cell Res.* **1**, 350-354.
- Young, B. y Heath, J.W. (2000) Wheater's histología funcional. Diorki servicios integrales de Edición. 4 Eds. Elsevier, España, pp.157-160.
- Yu, Z., Zhao, G., Liu, M., Lei, I. y Li, M. (2010) Fabrication of a novel atrazine biosensor and its subpart-per-trillion levels sensitive performance. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 7878-7883.
- Zaidi, K.U., Ali, A.S., Ali, S.A. y Naaz, I. (2014a) Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochem. Res. Int.* **2014**, DOI:10.1155/2014/854687.
- Zaidi, K.U., Ali, A.S. y Ali, S.A. (2014b) Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Res.* DOI: 10.1155/2014/120739.
- Zakut, R., Perlis, R., Eliyahu, S., Yarden, Y., Givol, D., Lyman, S.D. y Halaban, R. (1993) KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. *Oncogene* **8**, 2221-2229.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. y Michael Eskin, N.A. (1991) Polyphenol Oxidase. En: *Oxidative Enzymes in Foods*. Robinson, D.S. y Eskin, N.A.M (Eds). Elsevier Science, London. pp. 217-273.
- Zehtab, T., Yazdanparast, R. y Rafieii, S. (2001) Inhibition of experimental autoimmune vitiligo by oral administration of mushroom tyrosinase. *Cytobios* **105**, 27-34.
- Zeji, H., Hidalgo, J.L., Naranjo-Rodríguez, I., Liu, B., Tamsamani, K.R. y Marty, J.L. (2008) Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization. *Anal. Chim. Acta* **612**, 198-203.
- Zekiri, F., Bijelic, A., Molitor, C. y Rompel, A. (2014) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of polyphenol oxidase from *Juglans regia* (jrPPO1). *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 832-834.
- Zhang, D.L., Quantick, P.C. y Grigor, J.M. (2000) Changes in phenolic compounds in Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* **19**, 165-172.
- Zhang, J.T., Yan, J.P., Zheng, D.S., Sun, Y.J. y Yuan, Z.M. (2008) Expression of mel gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 151-157.
- Zhang, X., Hu, X., Hou, A. y Wang, H. (2009) Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 86-90.
- Zhang, Y., Choksi, S., Chen, K., Pobezińska, Y., Linnoila, I. y Liu, Z.G. (2013) ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res.* **23**, 898-914.
- Zhao, J.F., Zhang, Y.J., Jin, X.H., Athar, M., Santella, R.M., Bickers, D.R. y Wang, Z.Y. (1999) Green tea protects against psoralen plus ultraviolet A-induced photochemical damage to skin. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 1070-1075.
- Zhao, J., Zhi, J., Zhou, Y. y Yan, W. (2009) A tyrosinase biosensor on ZnO nanorod clusters/nanocrystalline diamond electrodes for biosensing of phenolic compounds. *Anal. Sciences* **25**, 1083-1088.
- Zhong, J. y Groutas, W.C. (2004) Recent developments in the design of mechanism-based and alternate substrate inhibitors of serine proteases. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**, 1203-1216.
- Zhou, H., Cadigan, K.M. y Thiele, D.J. (2003) A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **278**, 48210-48218.
- Zhou, Y.L., Tian, R.H. y Zhi, J.F. (2007) Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 822-828.
- Złotek, U. y Gawlik-Dziki, U. (2015) Selected biochemical properties of polyphenol oxidase in butter lettuce leaves (*Lactuca sativa* L. var. capitata) elicited with dl-β-amino-n-butyric acid. *Food Chem.* **168**, 423-429.
- Zynek, K., Bryjak, J., Szymanska, K. y Jarzebski, A.B. (2011) Screening of porous and cellular materials for covalent immobilisation of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**, 180-189.

