



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Analysis and Discrimination Between Substrates and
Inhibitors of Tyrosinase

Análisis y Discriminación entre Sustratos e
Inhibidores de Tirosinasa

Dña. Carmen Vanessa Ortiz Ruiz
2016



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

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

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

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

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

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

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

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

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

La autora de esta Tesis Doctoral ha disfrutado de las siguientes ayudas:

CONTRATO VINCULADO AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN INDUSTRIAL (CDTI-MICINN) IDI20110316-1/2. GENZ, Grupo de Investigación Enzimología (E006-05), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Universidad de Murcia y Alissi Brontè S. L. (Murcia).
Período: 01/10/2010-01/12/2011.

BECA-CONTRATO DE FORMACIÓN DE PROFESORADO UNIVERSITARIO. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Referencia AP2010-4300.
Período: 02/12/2011-01/12/2015.

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

A los **Dres. Francisco García Cánovas y José Tudela Serrano**, directores de esta Tesis Doctoral, por darme la oportunidad de trabajar en este grupo, transmitirme una ínfima parte de su conocimiento, su entusiasmo por la investigación y prestarme su apoyo cuando lo he necesitado.

Al **Dr. José Berna Cánovas**, por su amabilidad, colaboración y por estar siempre disponible para resolver cualquier duda. Sin su ayuda no habría sido posible la obtención de muchos de los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral.

Al **Dr. Ramón Varón Castellanos**, por su constante participación con nuestro grupo de investigación y asesoramiento.

A los **Dres. José Neptuno Rodríguez López, Pedro Antonio García Ruiz, José Antonio Teruel Puche, Virginia Tomás Martínez y José Fenoll**, por su contribución durante el desarrollo de esta Memoria.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, en especial a **Mercedes**, por su amabilidad y ayuda en la preparación de las clases prácticas, y a los compañeros de pasillo **Encarna, Javier Campoy y Cecilio**.

A todos y cada uno de los compañeros que han pasado por el departamento: a **Magda** y **Jesús**, que me enseñaron a trabajar en el laboratorio en mis inicios; a **Paquito** y **José Luis**, por los buenos ratos que pasamos en la hora del té; a **María, Fernanda, Mar Collado, Ana, Marisa, Sole, Juan Diego y Wun**, compañeros de pasillo; a **Quique, Rafa, Manuel** y, en especial, a **Xavi, Thelma, Mar, Miguel Ángel y Antonio** con los que he compartido además de horas de trabajo, muchas charlas y risas. Gracias también a todos por esas comidas y cenas de departamento que tanto hemos disfrutado.

*Tengo que hacer una mención especial a mi compañero y amigo **Alejandro**, entramos juntos al laboratorio y desde entonces, juntos permanecemos. Siempre tendré un grato recuerdo de los años en los que compartimos piso, de nuestras comidas, cenas de ensalada y jueves de cerveza, gimnasio, series y como no, nuestras charlas sobre todo tipo de temas. Por sus consejos, su apoyo, por darme la confianza que en muchos momentos me ha faltado y por su alegría, que transmite allá por donde va. También a **Ana Belén**, con la que junto a Alejandro, he compartido grandes momentos en este laboratorio, nuestras comidas diarias, conversaciones, debates, ratos de hacer el payaso y muchas risas.*

*A mis **amigos**, especialmente a mis dos **Isas** y a **Luisa**, por tener siempre palabras de apoyo y ánimo en los momentos difíciles, porque aunque no nos veamos mucho sé que siempre están ahí para cualquier cosa que necesite. Por eso y por todos los buenos ratos que hemos pasado juntas, que espero sean muchos más, gracias.*

*A mi **familia**, en especial a mi **padre**, **hermano**, **cuñados**, **suegros** y como no, a mi **madre**, que siempre ha estado a mi lado para ayudarme y animarme, por creer siempre en mí y transmitirme su optimismo. Ella me enseñó que luchando y trabajando todo se puede conseguir y esta Tesis Doctoral es un claro ejemplo de ello. A ella se lo debo todo. También quiero mencionar a mis sobrinos, **José Miguel**, **Irene** y **Ángela**, por su alegría, que hace que te olvides de cualquier problema cuando estas con ellos.*

A **David**, por ser como es, por confiar en mí, valorar lo que hago, escucharme y entenderme siempre y por estar a mi lado para lo bueno y lo malo.

CONTENIDO

PUBLICACIONES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	109
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
5. CONCLUSIONES.....	147
6. RESUMEN.....	155
6. BIBLIOGRAFÍA.....	161

PUBLICACIONES

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

1. **Ortiz-Ruiz, C.V.**, García-Molina, M. del M., Serrano, J.T., 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 (Factor de Impacto): 2.912 (2014), C (Categoría): Agriculture, Multidisciplinary, P (Posición): 2 de 56 (Q1).
2. **Ortiz-Ruiz, C.V.**, Berna, J., García-Molina, M. del M., Tudela, J., Tomás, V. y García-Cánovas, F. (2015) Identification of *p*-hydroxybenzyl alcohol, tyrosol, phloretin and its derivate phloridzin as tyrosinase substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**, 3738-3746, FI: 2.793 (2014), C: Chemistry, Organic, P: 15 de 58 (Q2).
3. **Ortiz-Ruiz, C.V.**, Berna, J., Rodríguez-López, J.N., Tomás, V. y García-Cánovas, F. (2015) Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of 4-hexylresorcinol, an antibrowning and depigmenting agent: a kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 7032-7040, FI: 2.912 (2014), C: Agriculture, Multidisciplinary, P: 2 de 56 (Q1).
4. **Ortiz-Ruiz, C.V.**, María-Solano, M.A., García-Molina, M. del M., Varón, R., Tudela, J., Tomás, V. y García-Cánovas, F. (2015) Kinetic characterization of substrate-analogous inhibitors of tyrosinase. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB Life)* **67**, 757-767, FI: 3.143 (2014), C: Biochemistry and Molecular Biology, P: 115 de 290 (Q2).
5. **Ortiz-Ruiz, C.V.**, Ballesta de Los Santos, M., Berna, J., Fenoll, J., García-Ruiz, P.A., Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2015) Kinetic characterization of oxyresveratrol as a tyrosinase substrate. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB Life)* **67**, 828-836, FI: 3.143 (2014), C: Biochemistry and Molecular Biology, P: 115 de 290 (Q2).
6. María-Solano, M.A., **Ortiz-Ruiz, C.V.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Teruel-Puche, J.A., Berna, J., García-Ruiz, P.A. y García-Cánovas, F. (2016) Further insight into the pH effect on the catalysis of mushroom tyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **125**, 6-15, FI: 2.128 (2014), C: Chemistry, Physical, P: 74 de 139 (Q3).
7. **Ortiz-Ruiz, C.V.**, Berna, J., Tudela, J., Varón, R. y García-Cánovas, F. (2016) Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway. *Journal of Dermatological Science*, Doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.02.004, FI: 3.419 (2014), C: Dermatology, P: 10 de 63 (Q1).

Otros artículos de investigación relacionados:

8. Carrasco, A., **Ortiz-Ruiz, V.**, Martínez-Gutiérrez, R., Tomás, V. y Tudela, J. (2015) *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: aromatic profile determined by gas chromatography – mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Industrial Crops and Products* **73**, 16-27, FI: 2.837 (2014), C: Agronomy, P: 9 de 81 (Q1).
9. Molina Alarcón, M., García-Moreno, M., García-Sevilla, F., Masia, M.D., Amo-Saus, M.L., **Ortiz-Ruiz, C.V.** y Varón, R. (2016) A comparative analysis of strict kinetic equations for the enzyme systems and equations obtained by the rapid equilibrium approach. *MATCH Communications in Mathematical and in Computer Chemistry* **75**, 595-612, FI: 1.466 (2014), C: Mathematics, Interdisciplinary Applications, P: 28 de 99 (Q2).

Comunicaciones a Congresos Internacionales:

1. **Ortiz, V.**, Martínez-Ruiz, J., Tomás, V., Martínez-Gutiérrez, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. IEX Chromatographic purification of tyrosinase of *Agaricus bisporus* from Spain. ANQUE-International Congress of Chemical Engineering-2012. 24-27 June. Sevilla (Spain).
2. **Ortiz, V.**, Carrasco, A., García-Cánovas, F., Martínez-Gutiérrez, R., Martínez, J.A., Sánchez, M., Tomás, V. y Tudela, J. Bitter fennel essential oils from Spain with antioxidant and inhibitory activity on tyrosinase. 22nd IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology & 37th FEBS Congress. 04-09 September 2012. Sevilla (Spain).
3. **Ortiz, V.**, Tomás, V., Martínez-Gutiérrez, R., García-Cánovas, F. y Tudela, J. *p*-Coumaric acid characterization as non competitive inhibitor of trypsin. 13th International Conference on Antioxidants 2013. 26-28 June 2013. Marrakech (Morocco).
4. Cutillas, A.B., Carrasco, A., **Ortiz, V.**, Martínez-Gutiérrez, R., Martínez, F.J., Sánchez, M., Tomás, V. y Tudela, J. *Salvia lavandulifolia* from Spain: aromatic profile by enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. 5th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2013. 8-11 October 2013. Krakow (Poland).
5. Cutillas, A.B., Carrasco, A., **Ortiz, V.**, Martínez-Gutiérrez, R., Martínez, F.J., Sánchez, V., Tomás, M. y Tudela, J. *Salvia officinalis* from Spain: aromatic profile by enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. MicroBiotech 2013. 6-8 December 2013. Aveiro (Portugal).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ASPECTOS GENERALES Y FUNCIONES DE TIROSINASA.....	3
1.1.1. Tirosinasa de bacterias.....	4
1.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas.....	5
1.1.3. Tirosinasa de artrópodos.....	11
1.1.4. Tirosinasa de mamíferos.....	13
1.1.4.1. Melanocitos e histología de la melanogénesis.....	14
1.1.4.2. Tipos de melaninas.....	16
1.1.4.3. Papel de tirosinasa en la melanogénesis.....	17
Síntesis de eumelaninas.....	18
Síntesis de feomelaninas.....	21
1.1.4.4. Regulación de la melanogénesis.....	22
Radiaciones ultravioleta.....	22
PKC- β y activación de tirosinasa.....	24
Principales rutas señaladoras asociadas a tirosinasa, TRP-1 y TRP-2.....	25
pH del melanosoma.....	28
1.2. PATOLOGÍA.....	30
1.2.1. Alteraciones de la pigmentación.....	30
1.2.1.1. Hiperpigmentación.....	30
1.2.1.2. Hipopigmentación.....	32
1.2.2. Melanoma.....	35
1.2.2.1. Principales rutas moleculares implicadas en la melanomagénesis.....	36
Ruta dependiente de CDKN2A.....	36
Ruta dependiente de MAPK.....	36

Ruta dependiente de PI3K.....	37
MITF.....	38
cKIT.....	38
1.2.2.2. Papel de las melaninas en el cáncer de piel.....	39
1.2.2.3. Diagnóstico.....	42
1.2.2.4. Clasificación histológica.....	45
1.2.2.5. Tratamiento.....	46
1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	48
1.3.1. Industria alimentaria.....	49
1.3.2. Industria cosmética.....	50
1.3.3. Producción de biopolímeros entrecruzados.....	51
1.3.4. Biosensores enzimáticos para la detección y cuantificación de compuestos.....	52
1.3.5. Biorremediación.....	53
1.3.6. Producción de <i>o</i> -difenoles.....	54
1.4. ESTRUCTURA DE TIROSINASA.....	56
1.4.1. Estructura general.....	57
1.4.1.1. Tirosinasas bacterianas.....	60
1.4.1.2. Tirosinasas de plantas y de hongos.....	64
1.4.1.3. Tirosinasas de artrópodos.....	68
1.4.1.4. Tirosinasa de mamíferos.....	70
1.4.2. Estados de oxidación del cobre del sitio activo.....	72
1.5. ACTIVIDADES CATALÍTICAS DE TIROSINASA.....	75
1.5.1. Actividad difenolasa.....	76
1.5.2. Actividad monofenolasa.....	81
1.5.3. Estereoespecificidad de las actividades monofenolasa y difenolasa.....	84
1.5.4. Diferencias entre catecol oxidasas y tirosinasas.....	85

1.5.5. Acción de tirosinasa sobre <i>meta</i> -difenoles y <i>para</i> -difenoles.....	86
1.6. REGULACIÓN ENZIMÁTICA DE TIROSINASA.....	91
1.6.1. Inhibidores	91
1.6.1.1. Polifenoles.....	92
1.6.1.2. Derivados del benzaldehído y benzoatos.....	97
1.6.1.3. Lípidos (triacilglicéridos) de cadena larga y esteroides.....	98
1.6.1.4. Péptidos con actividad inhibidora de tirosinasa.....	98
1.6.1.5. Inactivadores	98
Inhibidores irreversibles.....	98
Inactivadores suicidas.....	99
1.6.1.6. Diseño de inhibidores.....	104
1.6.2. Activadores.....	107
2. OBJETIVOS.....	109
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	111
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	111
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
3.1. REACTIVOS Y MATERIALES.....	115
3.1.1. Reactivos.....	115
3.1.2. Fuente de enzima.....	115
Purificación de tirosinasa.....	116
3.1.3. Determinación de la concentración de proteínas.....	116
3.2. EQUIPOS Y MÉTODOS.....	117
3.2.1. Ensayos espectrofotométricos.....	117
3.2.1.1. Medidas de actividad enzimática de tirosinasa.....	117
Medida de la actividad monofenolasa.....	118

Medida de la actividad monofenolasa sobre sustratos que no acumulan o-difenol en el medio.....	118
Método cronométrico.....	119
Método de desaparición de ácido ascórbico.....	120
3.2.2. Análisis cinético.....	121
3.2.2.1. Ensayos de inhibición enzimática y análisis cinético de inhibidores....	121
3.2.2.2. Caracterización cinética de sustratos alternativos.....	122
3.2.2.3. Determinación de valores de K_a y pK_a de tirosinasa.....	123
3.2.3. Ensayos de RMN.....	124
3.2.4. <i>Docking</i> computacional.....	124
3.2.5. Ensayos oximétricos.....	125
3.2.6. Análisis de regresión.....	126
3.2.6.1. Regresión no lineal.....	126
3.2.6.2. Regresión lineal.....	127
3.2.7. Simulación numérica.....	128
3.2.7.1. Integración numérica de ecuaciones diferenciales.....	128
3.2.7.2. Métodos de paso variable.....	129
3.2.7.3. Implementación.....	130
3.2.7.4. Condiciones de simulación.....	130
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
4.1. DISCRIMINACIÓN ENTRE SUSTRATOS ALTERNATIVOS E INHIBIDORES DE TIROSINASA.....	133
4.2. IDENTIFICACIÓN DEL ALCOHOL <i>p</i>-HIDROXIBENCÍLICO, TIROSOL, FLORETINA Y SU DERIVADO FLORICINA COMO SUSTRATOS DE TIROSINASA.....	135
4.3. HIDROXILACIÓN CATALIZADA POR TIROSINASA DEL 4-HEXILRESORCINOL, UN AGENTE ANTIPARDEANTE Y DESPIGMENTANTE: UN ESTUDIO CINÉTICO.....	137

4.4. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE INHIBIDORES ANÁLOGOS A SUSTRATOS DE TIROSINASA.....	139
4.5. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL OXIRESVERATROL COMO SUSTRATO DE TIROSINASA.....	141
4.6. PROFUNDIZACIÓN SOBRE EL EFECTO DEL PH EN LA CATÁLISIS DE TIROSINASA DE CHAMPIÑÓN.....	143
4.7. ACCIÓN DEL ÁCIDO ELÁGICO EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE MELANINA.....	145
5. CONCLUSIONES.....	147
6. RESUMEN.....	155
7. BIBLIOGRAFÍA.....	161

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES Y FUNCIONES DE TIROSINASA.

Las proteínas son biopolímeros responsables de una amplia variedad de funciones dentro y fuera de la célula. Entre ellas destacan las enzimas, proteínas que catalizan una enorme variedad de reacciones químicas en rutas esenciales del metabolismo celular. Las proteínas que enlazan uno o varios iones metálicos en su sitio activo como grupos prostéticos se denominan metaloproteínas, una parte muy importante de las cuales contiene metales de transición, como el hierro, cobre, níquel, etc. (Holm *et al.*, 1996). Este es el caso de la cuproproteína tirosinasa o polifenol oxidasa (TYR) (monofenol, *o*-difenol: oxígeno óxido-reductasa, EC 1.14.18.1), la enzima estudiada en esta memoria. En concreto se ha trabajado con tirosinasa del champiñón *Agaricus bisporus* como enzima modelo.

Las cuproproteínas contienen cobre en su sitio activo y desempeñan cuatro funciones básicas: 1) transferencia electrónica, 2) almacenamiento, transporte y consumo de oxígeno, 3) almacenaje, transporte y recogida de ión metálico y 4) catálisis. Existen siete sitios activos distintos en las cuproproteínas (tipo-1, tipo-2, tipo-3, tipo-4, CuA, CuB y CuZ) (Solomon *et al.*, 1996; Bubacco *et al.*, 1999). La enzima tirosinasa posee un centro activo tipo-3, formado por dos átomos de cobre, cada uno de los cuales está coordinado a tres residuos de histidina.

Las oxigenasas son enzimas que incorporan uno o dos átomos de oxígeno por mol de sustrato, por lo que se dividen en monooxigenasas y dioxigenasas, respectivamente (Hayaishi, 1974). Tirosinasa es una monooxigenasa u oxidasa de función mixta, que catalizan la reducción de un átomo de oxígeno a agua mientras que otro es transferido al sustrato. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en toda la escala filogenética y cataliza dos reacciones acopladas en las que interviene el oxígeno molecular: 1) hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y 2) oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas, (actividad difenolasa). Se trata de una enzima con muy poca especificidad de sustrato y cuyos productos de reacción (*o*-quinonas) son moléculas muy inestables y reactivas, lo que determina que participe en procesos tan diversos como la biosíntesis de melaninas y ligninas y la esclerotización de la cutícula de artrópodos, entre otros (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).

El primer trabajo sobre esta enzima fue publicado por Bertrand hace 118 años (Bertrand, 1896). Posteriormente se han publicado gran cantidad de artículos científicos sobre la enzima, procedimientos para su aislamiento (Keilin y Mann, 1938; Kubowitz, 1938), estructura y funciones (Mason, 1956; 1966; Matoba *et al.*, 2006; Mayer, 2006; Sendovski *et al.*, 2011; Ismaya *et al.*, 2011a; 2011b; Mauracher *et al.*, 2014a; Zekiri *et al.*, 2014) y mecanismos de actuación (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Solomon *et al.*, 2014). Sin embargo, existen aun gran cantidad de aspectos por resolver.

1.1.1. Tirosinasa de bacterias.

Las primeras tirosinasas bacterianas descritas fueron las del género *Streptomyces* (Lerch y Ettlinger, 1972) y las primeras purificadas de las especies *S. nigrifaciens* y *S. glaucescens*. Actualmente se han descrito estructuralmente otras tirosinasas bacterianas como las del género *Bacillus* (*B. megaterium* y *B. thuringiensis*), *Pseudomonas melanogenum*, *Ralstonia solanacearum*, *Thermomicrobium roseum* y *Marinomonas mediterránea* entre otras (Sánchez-Amat *et al.*, 2001; 2010; Liu *et al.*, 2004; Ruan *et al.*, 2004; López-Serrano *et al.*, 2004; 2007; Hernández-Romero *et al.*, 2005; 2006; Claus y Decker, 2006; Metwally y El-Shora, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Shuster y Fishman, 2009; Sendovski *et al.*, 2011).

Las tirosinasas procedentes de organismos procariotas presentan ciertas ventajas frente a las de organismos eucariotas, que las hacen muy útiles para el estudio de tirosinasa procedente de otras fuentes:

- 1) Estos organismos se cultivan rápidamente.
- 2) La enzima se secreta al medio extracelular (está implicada 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.
- 4) No se produce modificación post-traducciona l de la proteína en procesos de activación proteolítica de proenzimas o glicosilaciones.

Por todo esto, las tirosinasas bacterianas han sido caracterizadas genética y espectroscópicamente, resultando útiles para profundizar en el estudio estructural de la enzima, lo que contrasta con las procedentes de células eucariotas, que son difíciles de aislar con una pureza y cantidad suficiente para llevar a cabo un estudio estructural adecuado.

En cuanto a función, tirosinasa es la responsable de la síntesis del pigmento melanina en estos organismos, aunque en algunos casos es sintetizado por lacasa. La función de este pigmento en microorganismos no está totalmente definida, pero parece que juega un papel clave en la protección del microorganismo y sus esporas frente a la radiación (Ruan *et al.*, 2004). Además, las melaninas son capaces de unir metales pesados que de otro modo resultarían muy tóxicos para la célula bacteriana y la protegen frente a oxidantes, calor y componentes antimicrobianos, lo que las hace más resistentes y contribuye a aumentar la patogénesis bacteriana (Nosanchuk y Casadevall, 2003). Se ha descrito que la tirosinasa extracelular en ambientes terrestres está implicada en la formación de materia húmica y en procesos de polimerización y detoxificación de compuestos fenólicos de plantas. También se han descrito otras funciones en microorganismos para tirosinasa, como la producción de betalainas, síntesis de antibióticos basados en aminoácidos como la lincomicina, o la eliminación de fenoles defensivos de plantas en bacterias simbióticas (Fairhead y Thony-Meyer, 2012).

1.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas.

Actualmente, la investigación sobre tirosinasas de hongos y plantas se ha impulsado notablemente debido a sus posibles aplicaciones biotecnológicas en la industria farmacéutica, alimentaria, y medioambiental (Seo *et al.*, 2003; Halaoui *et al.*, 2006).

La tirosinasa más estudiada es la procedente del champiñón *Agaricus bisporus*, ya que es la enzima internacionalmente utilizada como modelo experimental para extrapolar resultados a otros tipos de tirosinasas. Del mismo modo, la tirosinasa del ascomiceto, *Neurospora crassa*, ha sido muy estudiada 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). Recientemente, se ha descrito un método optimizado para la purificación de la enzima de champiñón (Zaidi *et al.*, 2014b), y se ha conseguido la

purificación de una forma latente de polifenol oxidasa de champiñón, la isoenzima PPO4 (Maraucher *et al.*, 2014a). Además, se han clonado, expresado y caracterizado dos cADNs de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Wichers *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2010) y se han publicado dos estructuras cristalizadas de la misma (Ismaya *et al.*, 2011a; 2011b; Mauracher *et al.*, 2014a).

En cuanto a plantas, se ha extraído y purificado la enzima tirosinasa de muchos tejidos vegetales, entre ellos: pera (Espín *et al.*, 1996), manzana (Nicolas *et al.*, 1994; Espín *et al.*, 1995), aguacate (Weemaes *et al.*, 1998; Gómez-López, 2002), caqui (*Diospyros kaki*, Núñez-Delicado *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2014), melocotón (*Prunus persica* L., Cabanes *et al.*, 2007), mora (*Morus alba* L., Arslan *et al.*, 2004), mandarina (*Satsuma mandarine* L., Cheng *et al.*, 2014), patata (*Solanum tuberosum*, Marri *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2015; Niphadkar *et al.*, 2015), remolacha (*Beta vulgaris* L., Gandía-Herrero *et al.*, 2004), menta (*Mentha piperita*, Kavrayan y Aydemir, 2001), tabaco (*Nicotiana tabacum*, Shi *et al.*, 2002), café (*Coffea arabica*, Goulart *et al.*, 2003), álamo (*Populus trichocarpa* P. *deltoides*, Wang y Constabel, 2003), látex (*Hevea brasiliensis*, Wititsuwannakul *et al.*, 2002) y hoja del árbol de caucho (Li *et al.*, 2014). Además, recientemente se ha estudiado la enzima procedente de lechuga (*Lactuca sativa*, Zlotek y Gawlik-Dziki, 2015), de la morácea *Artocarpus heterophyllus* (Tao *et al.*, 2013), de patata (Cheng *et al.*, 2014), mango o melocotón de los trópicos (Palma-Orozco *et al.*, 2014) y de *Ataulfo mango* (Cheema y Sommerhalter, 2015). También se ha publicado la estructura cristalizada de tirosinasa de hojas del nogal *Juglans regia* (Zekiri *et al.*, 2014) y se han cristalizado dos catecol oxidasas, una del boniato *Ipomoea batatas* (Klabunde *et al.*, 1998) y la otra procedente de la uva *Vitis vinifera* (Virador *et al.*, 2010a; 2010b).

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 \approx 43 KDa (subunidad pesada o H) y dos subunidades de \approx 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* de 43 KDa (Wichers *et al.*, 1996).

Una característica frecuente de tirosinasa de hongos y plantas es que, en estado nativo, existe como enzima latente que tiene que ser activada. Se ha descrito

activación *in vivo* por proteasas (Rathjen y Robinson, 1992) y se ha demostrado activación proteolítica *in vitro* (Laveda *et al.*, 2001). También se ha demostrado activación *in vitro* por poliaminas (Jiménez-Atienzar, 1991) y detergentes, SDS (Laveda *et al.*, 2000).

Los sustratos fisiológicos de tirosinasa más importantes encontrados en frutas y hortalizas, aunque varían según especies y variedades, son: catecoles y derivados, las catequinas (catequina, epicatequina, galocatequinas, etc.), derivados del ácido cinámico (ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, etc.), derivados del ácido benzoico (ácidos protocatéquico, vanílico, siríngico, etc.), flavonas, flavonoides, antocianidinas, etc. (Vámos-Vigyázó, 1981).

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).

La función de tirosinasa en plantas y hongos es confusa y objeto de controversia (Sommer *et al.*, 1994; Joy *et al.*, 1995; Onsa *et al.*, 2000; Mayer, 2006), debido a características propias del sistema enzimático como su doble actividad y a la complejidad de extracción y purificación (Robb, 1984; Zhang *et al.*, 1999; Nagai y Suzuki, 2001). Tirosinasa en hongos y plantas participa, entre otros, en los siguientes procesos:

- Procesos biosintéticos, como la síntesis de betalainas (Steiner *et al.*, 1999; Strack *et al.*, 2003; Sullivan, 2015) o la hidroxilación de tiramina a dopamina, que en presencia de ácido betalámico puede formar dopaminobetaxantina, y esta posteriormente puede rendir 2-descarboxi-betanidina (Gandía-Herrero *et al.*, 2005) (Esquema 1).

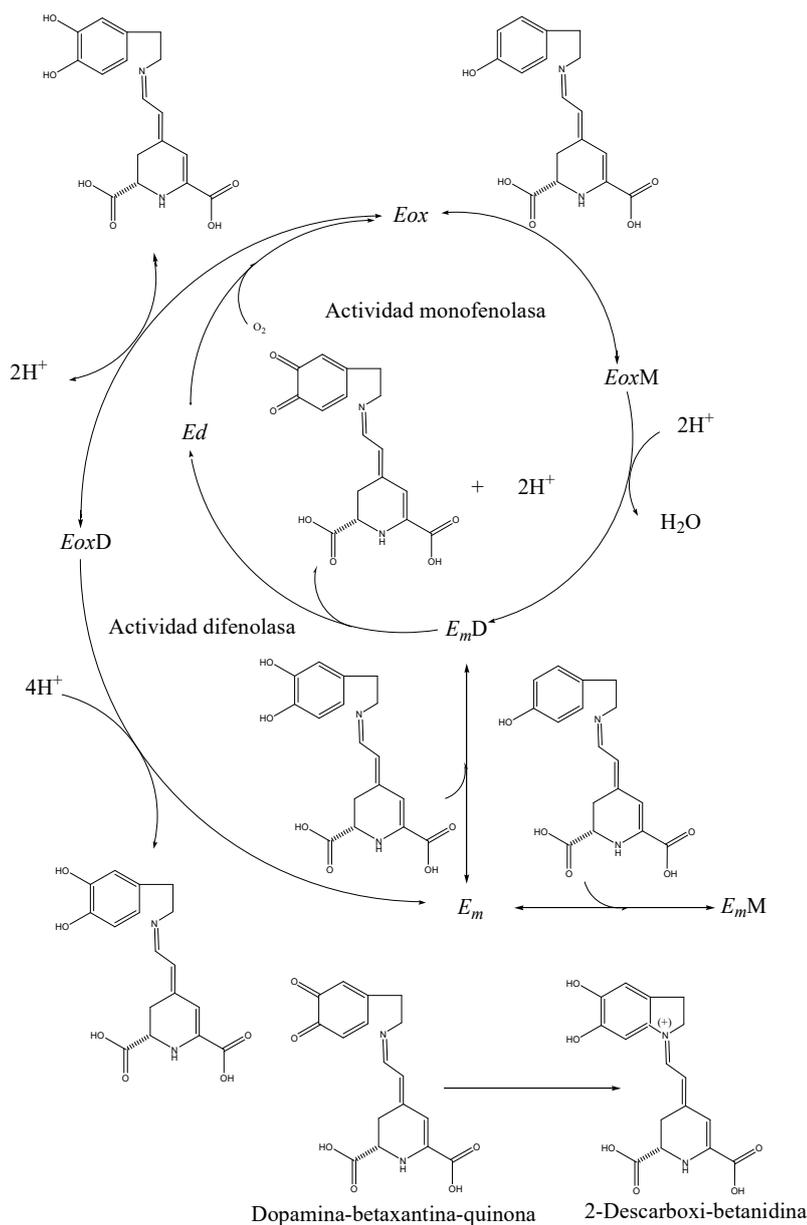
- Resistencia de plantas al estrés y patógenos (Thipyapong *et al.*, 2004; Li y Steffens, 2002). La Figura 1 muestra la relación entre los niveles variables de la actividad de tirosinasa y algunas de sus funciones.

- Pardeamiento enzimático de frutas y hortalizas, proceso que lleva consigo una pérdida de su aroma y sabor. El pardeamiento también se produce por reacciones no enzimáticas entre aminas, péptidos o proteínas con azúcares reductores

(reacciones de Maillard). Se han desarrollado numerosas estrategias para disminuir este proceso (Noble y Burton, 1993; Nicolas *et al.*, 1994; Soliva *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2011).

- Defensa frente a herbívoros (Wang y Constabel, 2004; Christopher *et al.*, 2004). Aunque esta función parece evidente, la secuencia de reacciones es compleja, implica expresión genética, formación de enzima, activación de enzima y liberación del sustrato.

- Patogenicidad y reacciones de defensa de hongos (Score *et al.*, 1997; Soler-Rivas *et al.*, 2000).



Esquema 1. Mecanismo propuesto para la actividad monofenolasa y difenolasa de tirosinasa adaptada para betaxantinas, en analogía al mecanismo para compuestos no betalaínicos (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).

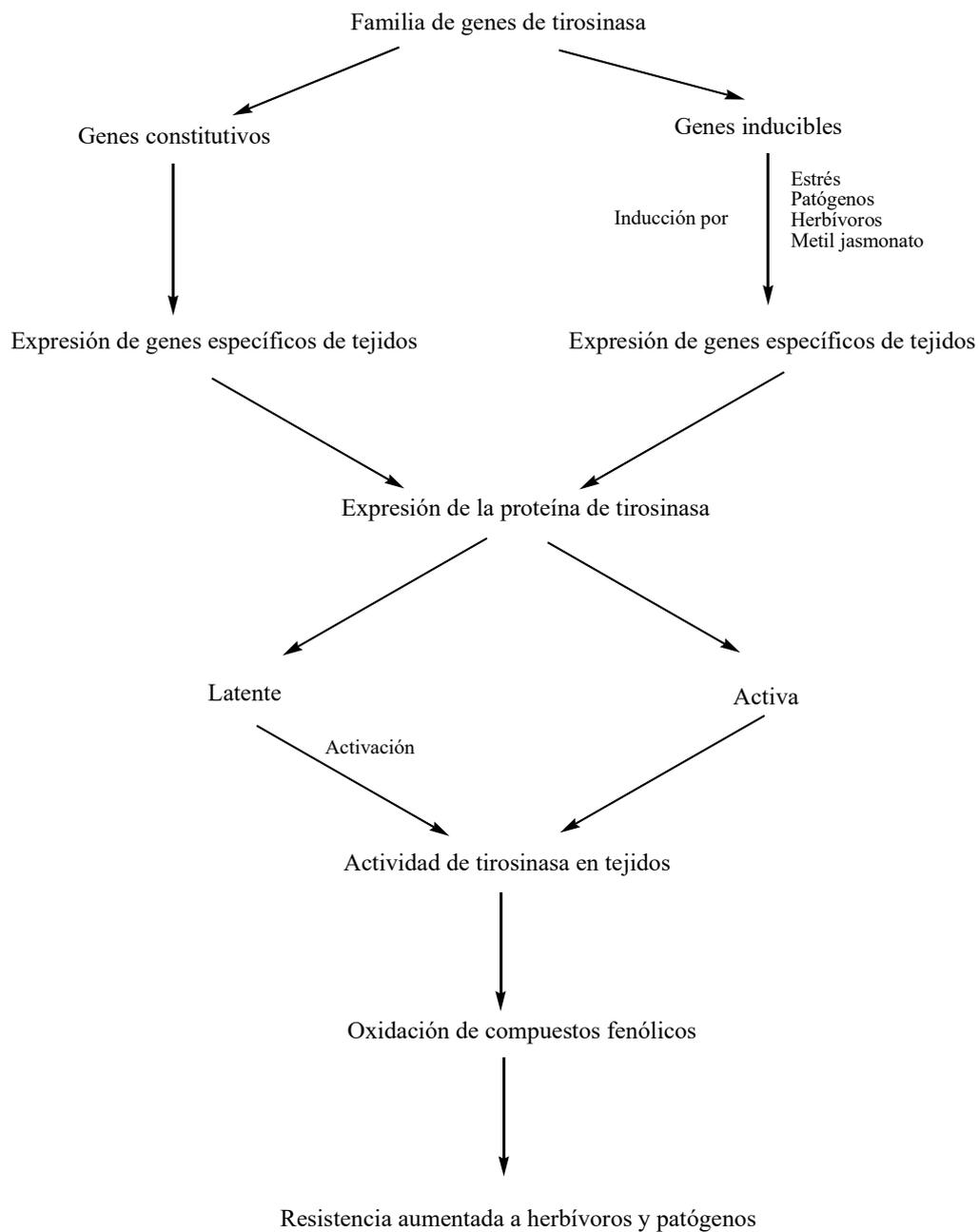


Figura 1. Representación entre los niveles variables de la actividad de tirosinasa y algunas de sus funciones (Mayer, 2006).

1.1.3. Tirosinasa de artrópodos.

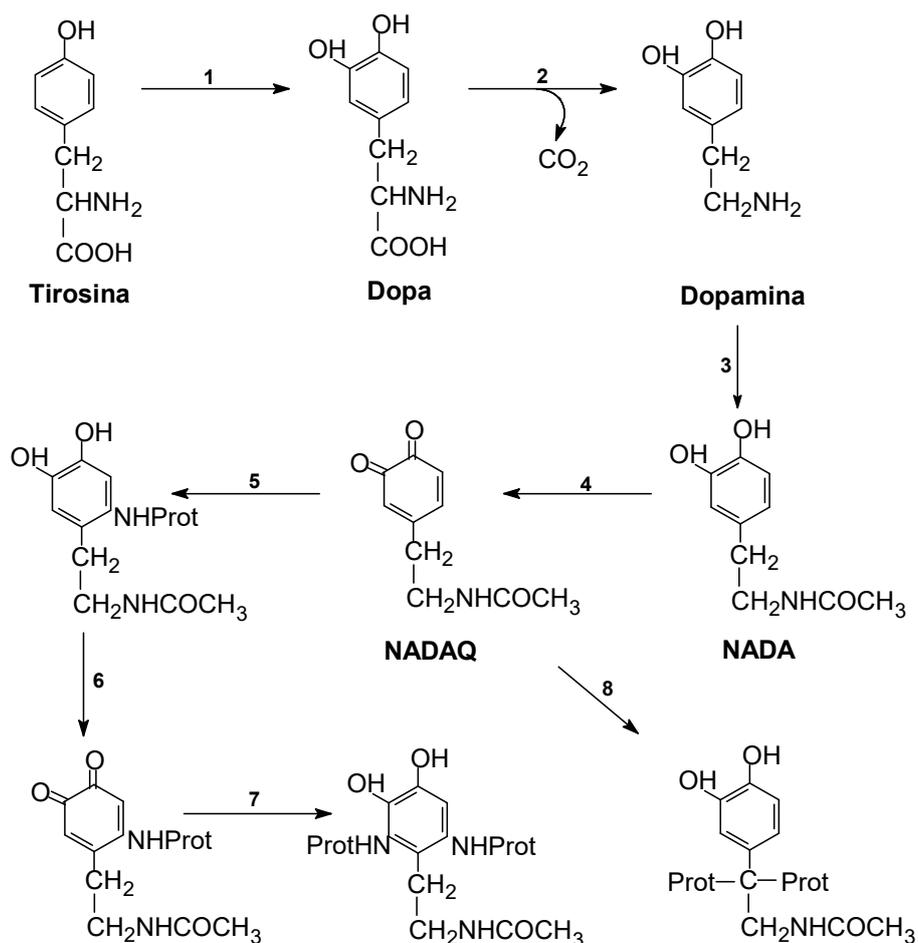
La tirosinasa o también llamada fenoloxidasa (PO) de insectos, se encuentra soluble en la hemolinfa, en contacto con sus sustratos, por lo que está en forma de proenzima y se activa, cuando se requiere, por mecanismos regulados como son la proteólisis limitada (Söderhäll *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1995; Asano y Ashida, 2001).

Recientemente se ha cristalizado la pro-fenoloxidasa (ProPO) de *Manduca sexta* a una resolución de 1.97 Å, (Li *et al.*, 2009). Se trata de un heterodímero consistente en dos polipéptidos homólogos, cada uno con un sitio activo tipo-3. 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).

Esta enzima está implicada en la ruta de biosíntesis de melaninas en insectos y otros artrópodos, que difiere de la de mamíferos en cuanto a enzimas y sustratos que intervienen. La enzima de mamíferos que inicia la melanogénesis, tirosinasa, en insectos se denomina fenoloxidasa y existe una dopacromo isomerasa (decarboxilante) en lugar de la dopacromo tautomerasa (Sugumaran, 2002; 2010). Con respecto a los sustratos, fenoloxidasa utiliza fundamentalmente dopamina y *N*-acetildopamina (Sugumaran, 2002), necesarias para los procesos de esclerotización. Además, las melaninas de insectos son polímeros de 5,6-dihidroxiindol y las de mamíferos son mezclas de 5,6-dihidroxiindol y de ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico.

La importancia de las melaninas en insectos es amplia y está relacionada con procesos de camuflaje, esclerotización de la cutícula, respuesta inmune y curación de heridas (Sugumaran, 2002; Abebe *et al.*, 2010).

Los primeros estudios llevados a cabo sobre el proceso de esclerotización concluyen que las *o*-quinonas generadas por tirosinasa son las principales desencadenantes del proceso (Pryor, 1940). En la ruta propuesta, L-tirosina es hidroxilada a L-dopa, que sufre una descarboxilación y da dopamina, que reacciona con acetil-CoA y conduce a la formación de *N*-acetildopamina (NADA). Posteriormente, por acción de tirosinasa, NADA se convierte en NADA-quinona (NADAQ) (Esquema 2). NADAQ reacciona con sitios puntuales de las cadenas de proteínas (intermoleculares). Tras reaccionar con grupos ϵ -amino de lisinas se produce un difenol sustituido, que es oxidado no enzimáticamente por NADQ a la forma quinónica. Posteriormente, la sustitución con otro residuo de la cadena de proteína da lugar a la formación de esclerotina, una molécula proteica entrecruzada.



Esquema 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).

Adicionalmente, en invertebrados se produce la activación de profenoloxidasa a fenoloxidasa en presencia de patógenos. Además, se ponen de manifiesto otras reacciones inmunes como la generación de factores con actividad antimicrobiana 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).

1.1.4. Tirosinasa de mamíferos.

La tirosinasa de mamíferos es una glicoproteína con diversos azúcares unidos en residuos de asparragina. En los polirribosomas se produce la síntesis de la parte proteica y posteriormente es trasladada al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi donde sufre diferentes modificaciones estructurales. 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 con un pI de 3.3 (Burnett, 1971; Hearing *et al.*, 1981; Laskin y Piccinini, 1986). Posteriormente la enzima es transportada en vesículas a los melanosomas, donde participa en la ruta de biosíntesis de las melaninas unida a la membrana de los melanosomas (Hearing y Jiménez, 1987). En concreto, tirosinasa cataliza la conversión de L-tirosina a L-dopa y este último a o-dopaquinona (Hearing y Ekel, 1976; Hearing *et al.*, 1981). Posteriormente, o-dopaquinona a través de una serie de reacciones no enzimáticas da lugar a distintos tipos de melaninas.

En organismos inferiores y plantas, tirosinasa es la única 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), de gran similitud con esta última (Figura 2) (Jackson, 1994; Olivares y Solano, 2009), aunque con diferentes funciones y capacidades catalíticas (Hearing y Tsukamoto, 1991; del Marmol y Beerman, 1996).

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). En cuanto a 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 (zinc) y, probablemente, TRP-1 (cobre) (Olivares y Solano, 2009).

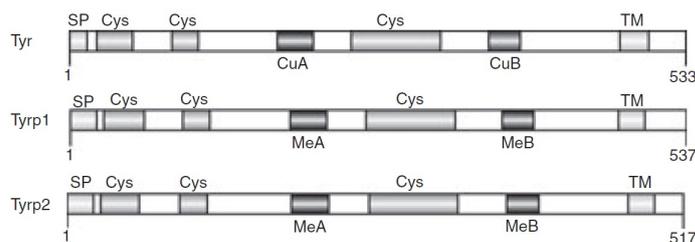


Figura 2. Representación del gen codificante para tirosinasa (Tyr), y proteínas relacionadas con tirosinasa 1 y 2 (Tyrp1 y Tyrp2). La posición y numeración de los dominios correspondientes de estas proteínas en ratón son: SP, péptido señal; Cys, segmentos ricos en cisteína; Cu o Me, dominios de unión de cobre o metal; TM, fragmento transmembrana (Olivares y Solano, 2009).

1.1.4.1. Melanocitos e histología de la melanogénesis.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, cubre un área aproximada de 1.5 a 2 m² y su función principal es proteger el medio interno de agentes externos y establecer una comunicación entre medio interno y externo. Está formada por varias capas: la epidermis (capa más externa, epitelio escamoso estratificado queratinizado), la dermis (tejido fibroelástico de sostén), y la hipodermis (tejido adiposo) (Young y Heath, 2000). La dermis está constituida por fibroblastos principalmente, mientras que en la epidermis se encuentran gran variedad de tipos celulares, como los queratinocitos, células de Merkel, células dendríticas y los melanocitos, células muy específicas cuya función principal es la síntesis de melaninas. Además, existen anejos epiteliales especializados como las glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y folículos pilosos. En la Figura 3 aparecen representadas las distintas capas de la piel y un detalle de la unión dermoepidérmica en la que se pueden observar los melanocitos con sus dendritas y la transferencia de gránulos de melanosoma.

Las células precursoras de los melanocitos son los melanoblastos, que tienen origen neuroectodérmico y migran a la epidermis durante el desarrollo embrionario, distribuyéndose entre las capas basales. Los melanocitos son células pequeñas con unas prolongaciones dendríticas que van cargadas de gránulos de melanina o melanosomas maduros, donde se encuentra la enzima tirosinasa (Figura 3). 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). Cada melanocito contacta con 30-40 queratinocitos constituyendo lo que se denomina “unidad epidérmica de melanina”. Una vez la melanina es sintetizada en el melanosoma es transferida a queratinocitos vecinos. El melanosoma es un orgánulo muy importante ya que mantiene en su interior a los intermediarios de la melanogénesis, que son compuestos muy reactivos y citotóxicos (Pawelek y Lerner, 1978). El tamaño, número y distribución de melanosomas son factores importantes a la hora de determinar el grado de pigmentación (Hearing, 1999). Es interesante recalcar que el número de melanocitos es prácticamente igual en todas las razas humanas, y que las diferencias en el color de la piel se deben principalmente a la cantidad de pigmento que producen los melanocitos y transfieren a queratinocitos circundantes (Toda *et al.*, 1973; Hearing, 1999).

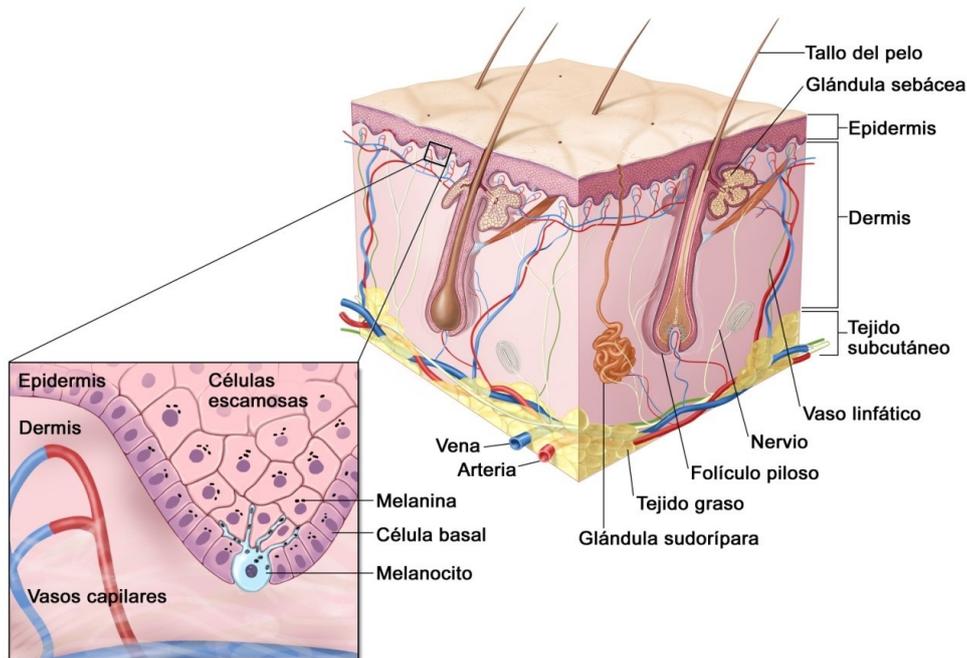


Figura 3. Capas de la piel y detalle de la unión dermoepidérmica. Unión del melanocito con sus dendritas y queratinocitos. Transferencia de gránulos de melanosoma (Young y Heath, 2000).

No se tiene mucha información sobre la transferencia del melanosoma (Hearing, 2005), pero se ha observado que la asociación del melanosoma con

microtúbulos y filamentos de actina, vía proteínas motoras como quinesina, dineína y miosina V, es importante para el movimiento del mismo 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 hidrolasa ácida lisosomal de los queratinocitos participa en la degradación de melanosomas.

En el proceso de bronceado natural de la piel se produce 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 melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos e incremento en la proliferación de los queratinocitos (Jimbow *et al.*, 1991; 1993).

1.1.4.2. Tipos de melaninas.

Las melaninas son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, en toda la escala filogenética. Se trata de polímeros polifenólicos heterogéneos de diversos colores, desde amarillo hasta negro. El estudio de sus propiedades físicas y químicas ha llevado al descubrimiento de tres tipos distintos (Prota, 1988; Lamoreux *et al.*, 2001):

- Eumelanina: pigmento de color marrón a negro, insoluble, de estructura polimérica nitrogenada formada a partir de unidades indólicas. Es el principal responsable de la pigmentación de la piel y también puede encontrarse en el pelo.
- Feomelanina: pigmento de color amarillo a pardo-rojizo, caracterizado por su alto contenido en azufre. Soluble en bases fuertes. Es responsable de algunos tipos de coloraciones de cabello y labios entre otros.
- Tricocromo: pigmento fenólico de bajo peso molecular, soluble en álcalis. Contiene el cromóforo Δ -bi-(1,4-benzotiazina).
- Mezclas: Muchas de las melaninas de mamíferos son mezclas de eumelaninas y feomelaninas en proporciones variables.

En la Figura 4 se muestra el esquema de biosíntesis de eumelaninas y feomelaninas. Como se observa en la figura, tirosinasa participa en las dos vías de biosíntesis mientras que TRP-1 y TRP-2 (DCT) sólo en la síntesis de eumelaninas. La radiación ultravioleta, α -MSH, ASP (Proteína Señalizadora Agouti), modulan la

expresión de reguladores de los genes que sintetizan feomelaninas / eumelaninas. Se ha descrito la interacción de α -MSH y ASP como crucial para producir eumelanina o feomelanina (Bhardwaj y Luger, 1994; Barsh, 1996; Hartmeyer *et al.*, 1997). En humanos, el grado de pigmentación de la piel y el pelo depende, además del tamaño, número y distribución de melanosomas, de la naturaleza química de las melaninas que contienen (Hearing, 1999).

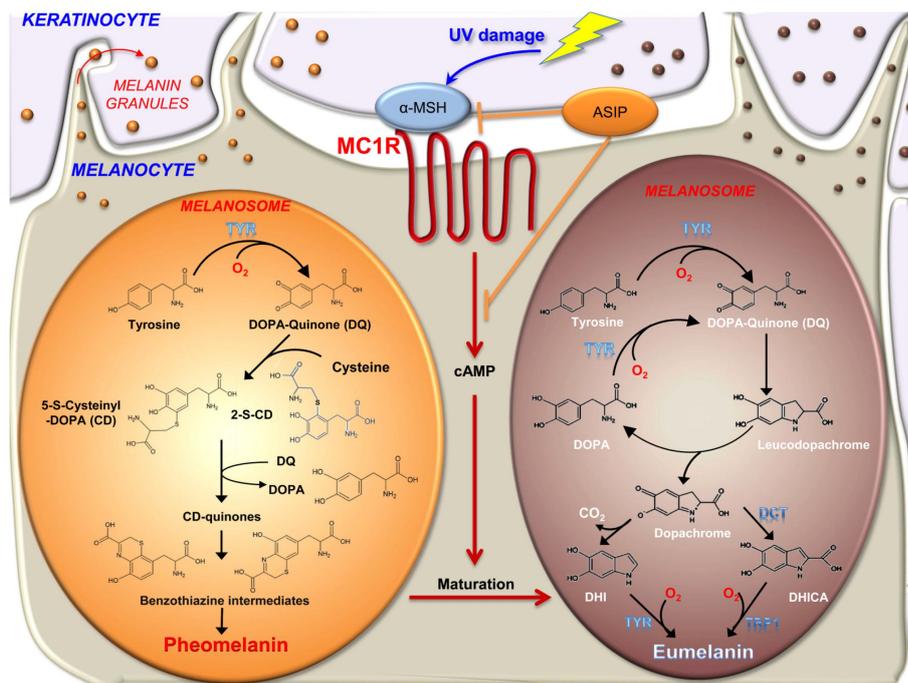


Figura 4. Síntesis de eumelaninas y feomelaninas. MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos; péptido de señalización Agouti, ASIP (en humanos) y ASP (en ratones); α -MSH, hormona estimulante de melanocitos (Nasti y Timares, 2015).

1.1.4.3. Papel de tirosinasa en la melanogénesis.

Las tres metaloenzimas tirosinasa, TRP-1 y TRP-2 están implicadas en el control catalítico de la melanogénesis en mamíferos (Jimbow *et al.*, 1994), siendo tirosinasa la más importante de las tres. Estas enzimas se sintetizan en el ribosoma, sufren modificaciones post-traduccionales en el retículo endoplásmico (formación de puentes disulfuro, N-glicosidación y oligomerización de proteínas) y son transportadas al aparato de Golgi, donde sufren más modificaciones y posiblemente adquieren el metal que actúa como cofactor. Posteriormente se empaquetan en vesículas hacia el

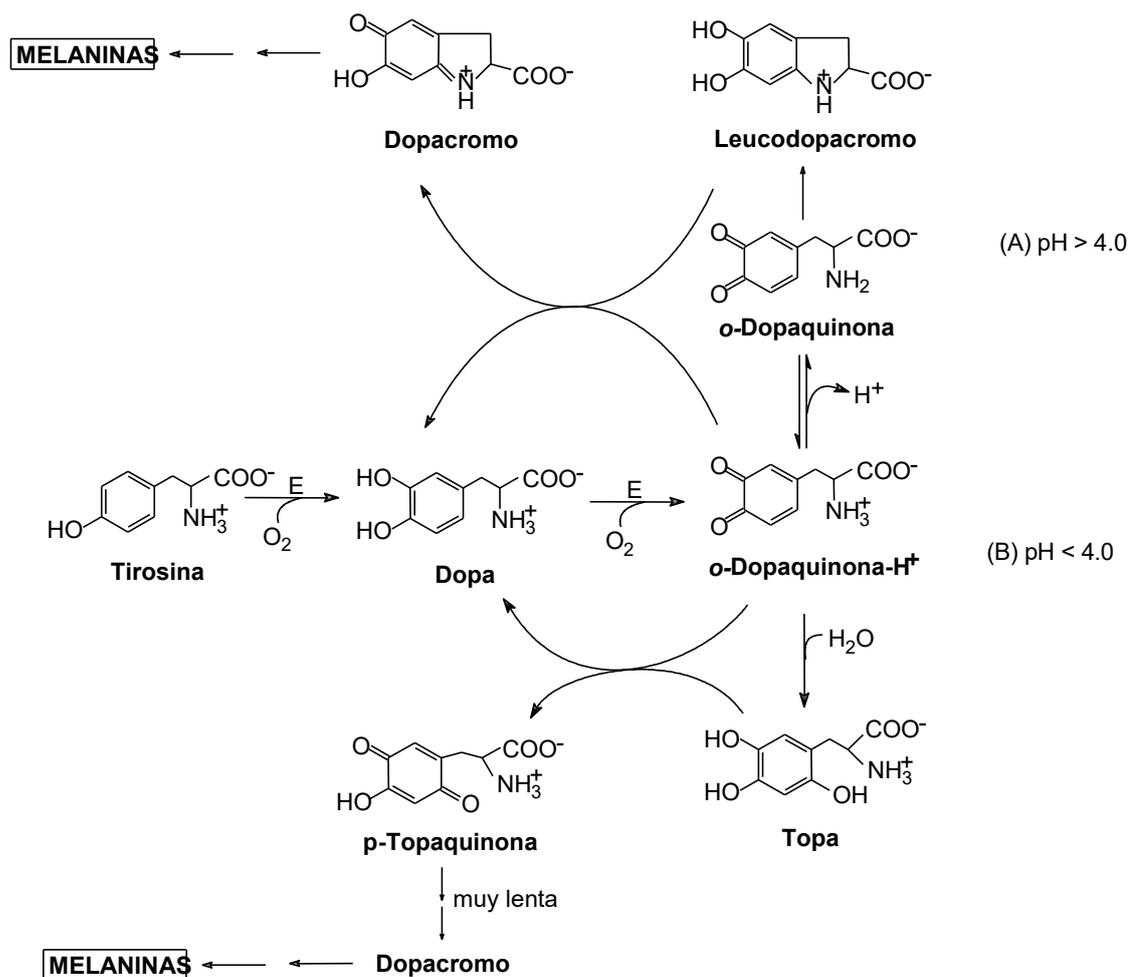
melanosoma. La proteína en el melanosoma tiene tres dominios, uno interno cuyos residuos están libres en el interior, uno transmembrana y otro citoplásmico (Park y Gilchrest, 1999). La proteína quinasa C β (PKC- β) se requiere como señal para la activación de tirosinasa (Park y Gilchrest, 1999), a través de la fosforilación de los residuos serina en el dominio citoplásmico C-terminal.

La melanogénesis comienza con la hidroxilación, por oxígeno molecular de monofenoles (L-tirosina) y la oxidación de *o*-difenoles (L-dopa), dando lugar a su correspondiente *o*-quinona (*o*-dopaquinona). Las *o*-quinonas son el intermedio clave en la ruta de la melanogénesis y evolucionan a través de reacciones no enzimáticas hacia la formación de melaninas (Robb, 1984). Se han descrito tres rutas de evolución:

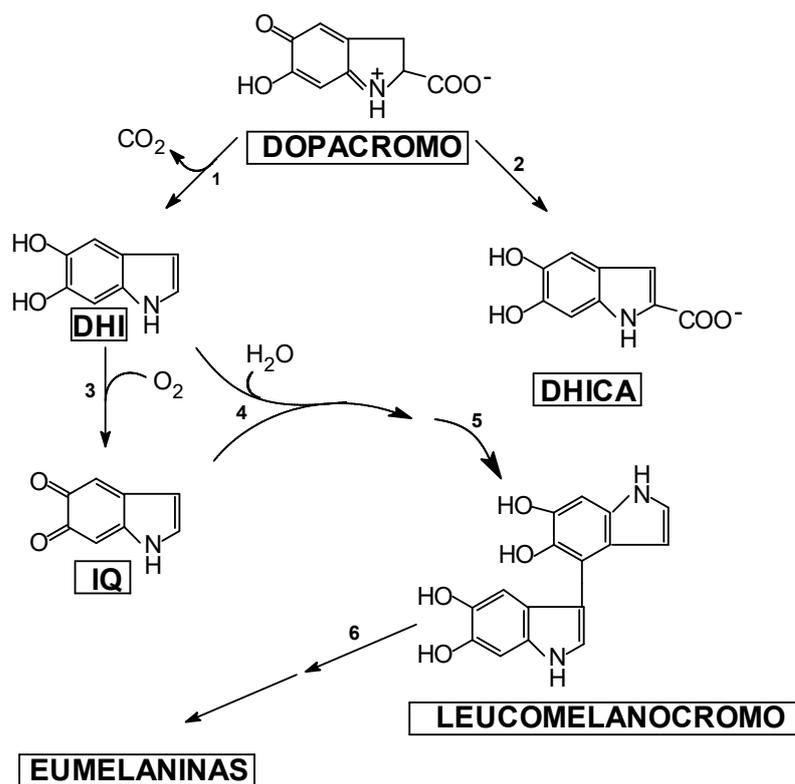
1. Ciclación de *o*-dopaquinona a leucodopacromo que es oxidado a dopacromo y posteriormente da lugar a eumelaninas.
2. Adición de compuestos tiólicos a *o*-dopaquinona, dando lugar a feomelaninas y tricocromos.
3. Adición de agua al anillo quinónico, formando compuestos trihidroxilados, que posteriormente son oxidados y evolucionan hasta polímeros.

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, que origina dopacromo y regenera L-dopa (Esquema 3) (Lerner y Fitzpatrick, 1950; García-Cánovas *et al.*, 1982; Serna-Rodríguez *et al.*, 1990; García-Moreno *et al.*, 1991; Rodríguez-López *et al.*, 1991a). Posteriormente, dopacromo se transforma lenta y espontáneamente en 5,6-dihidroxiindol (DHI), que se oxida a 5,6-indolquinona (IQ), en una reacción donde podría intervenir tirosinasa (Körner y Pawelek, 1980) o 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 conlleva la formación de eumelaninas (Esquema 4).



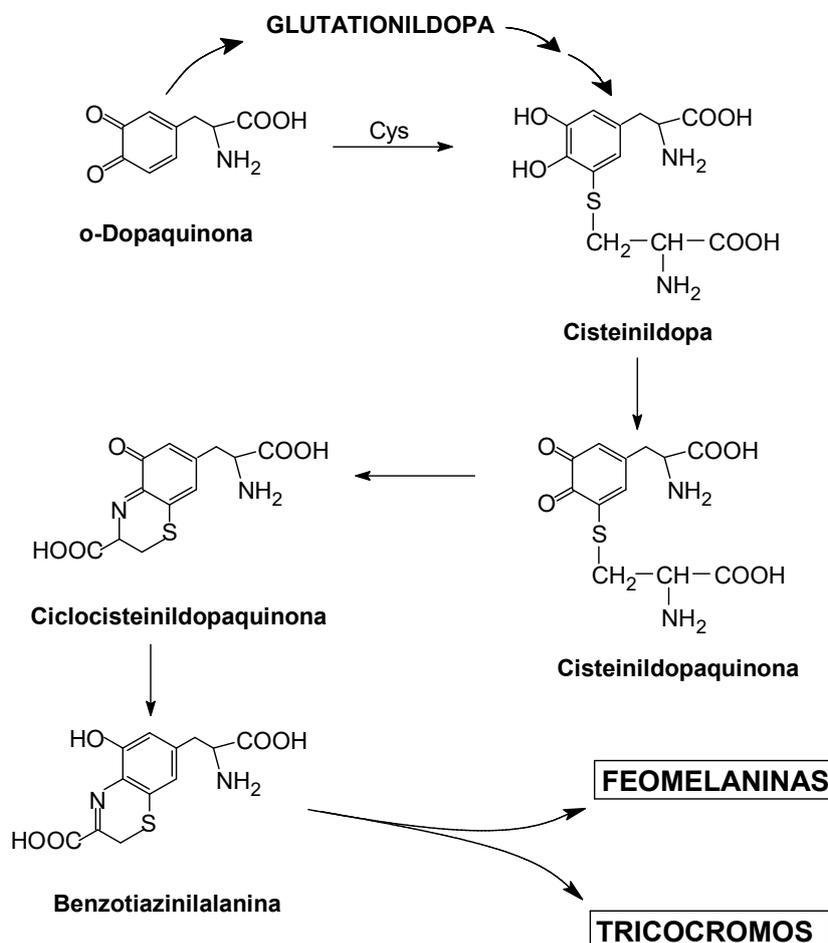
Esquema 3. Rutas propuestas para la oxidación de tirosina hasta dopacromo catalizada por tirosinasa a diferentes valores de pH. E = tirosinasa. A valores de pH > 4.0 predomina la contribución de la ruta de ciclación (A), mientras que a valores de pH < 4.0 participan significativamente las rutas de ciclación y de hidroxilación (A y B) (García-Cánovas *et al.*, 1982).



Esquema 4. 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 (TRP-2) (Barber *et al.*, 1984; Jiménez-Cervantes *et al.*, 1994), mientras que en la 3 sería tirosinasa o TRP-1 (Körner y Pawelek, 1982; Olivares *et al.*, 2001).

TRP-2 o dopacromo tautomerasa cataliza la reacción 2 y consigue por un lado la aceleración de la ruta de biosíntesis de melaninas (Jiménez-Cervantes *et al.*, 1994, 2001) y por otro afecta a las propiedades del pigmento melánico (Orlow *et al.*, 1992; Kushimoto *et al.*, 2001). La desviación de la ruta hacia la formación de DHICA evita la generación de compuestos citotóxicos como el DHI que puede incorporarse en el ADN provocando mutaciones puntuales (Miranda *et al.*, 1987; Olivares *et al.*, 2001). En la ruta de biosíntesis de melaninas se ha demostrado la formación de peróxido de hidrógeno (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2009b).

Síntesis de feomelaninas



Esquema 5. Ruta de formación de feomelaninas (Prota, 1980).

La existencia de compuestos con grupos tiólicos en el medio de reacción desvía la ruta de biosíntesis de melaninas desde *o*-dopaquinona hacia feomelaninas (Prota, 1988; Kondo y Hearing, 2011). La primera etapa en la biosíntesis de feomelaninas es la adición reductiva de cisteína a *o*-dopaquinona que da lugar a dos isómeros de cisteinildopa (CD), 2-cisteinildopa y 5-cisteinildopa, siendo más favorable la posición 5. La segunda etapa es una reacción redox entre CD y *o*-dopaquinona que origina cisteinildopaquinonas y dopa, y la tercera etapa corresponde a la ciclación de estas cisteinildopaquinonas y posterior deshidratación para originar *o*-quinoneiminas (Napolitano *et al.*, 2000). Las *o*-quinoneiminas se reagrupan con o sin descarboxilación

para formar intermedios de 1,4-benzotiazinas las cuales, finalmente, polimerizan para dar las feomelaninas (Wakamatsu *et al.*, 2009; Greco *et al.*, 2009) (Esquema 5). En la formación de feomelaninas no intervienen TRP-1 ni TRP-2, solo tirosinasa.

1.1.4.4. Regulación de la melanogénesis.

Son distintos los factores que participan en la regulación de la melanogénesis, a continuación se describen algunos de ellos:

A. Radiaciones ultravioleta.

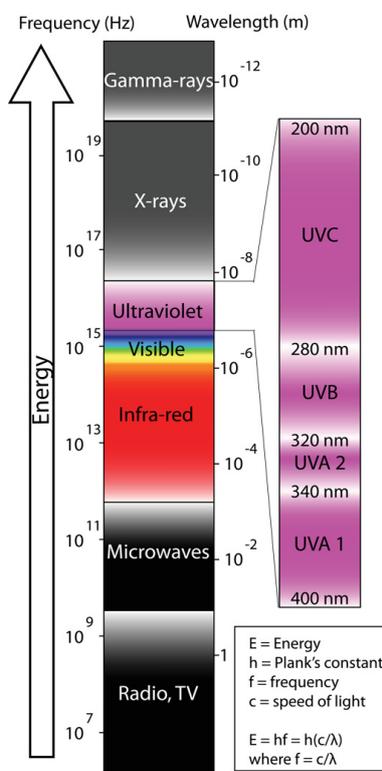


Figura 5. Espectro electromagnético (Maverakis *et al.*, 2010).

Exposiciones repetidas a radiación ultravioleta (Figura 5) producen un incremento de melaninas (Miyamura *et al.*, 2007). Estas radiaciones, tienen dos efectos sobre la pigmentación:

Tipo A (UVA, $\lambda = 320-400$ nm): producen una pigmentación inmediata, tras unos segundos de exposición, resultado de la translocación del melanosoma desde el área perinuclear al área de las dendritas.

Tipo B (UVB, $\lambda = 280-320$ nm): tras dos o tres días de exposición incrementan el número de melanocitos y el número de melanosomas en dichos melanocitos y queratinocitos. Su efecto es más tardío. Esta radiación es absorbida por el ADN celular de forma directa, con la consecuente formación de fotoproductos de ADN, como dímeros de timina (Hearing y Jiménez, 1987).

La proteína supresora de tumores p53 también participa activando la melanogénesis tras la exposición a la luz UV, mediante la estimulación de la expresión de proopiomelanocortina (POMC) en queratinocitos epidérmicos. POMC es fragmentada y produce la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), que es liberada por los queratinocitos y estimula a los melanocitos a través de su unión al receptor de melanocortina 1 (MC1R). Esto conduce a la elevación de los niveles de AMPc en los melanocitos induciendo el aumento de la expresión del factor de transcripción MITF (factor de transcripción asociado a microftalmia), que a su vez induce la expresión de los genes responsables de la síntesis de melanina y biogénesis de melanosomas. La melanina es sintetizada, empaquetada en los melanosomas y transportada hacia los queratinocitos, que disponen los melanosomas alrededor de su núcleo, para proteger su ADN de la luz UV (Figura 6) (Cui *et al.*, 2007; Oren y Bartek, 2007; Garibyan y Fisher, 2010).

Los niveles de ARNm de tirosinasa aumentan a través de un mecanismo dependiente de p53 cuando células de melanoma en cultivo son irradiadas con luz UV (Khlghatian *et al.*, 2002; Kondo y Hearing, 2011).

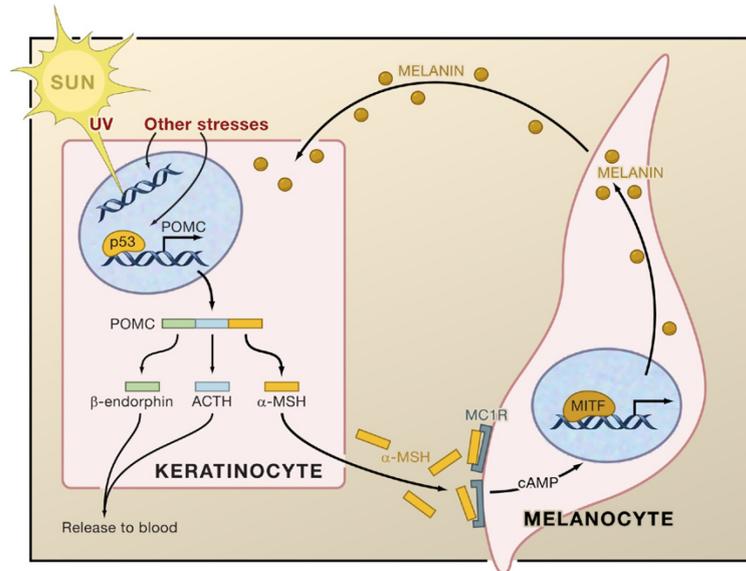


Figura 6. Estimulación de la síntesis de melanina por los melanocitos ante la radiación UV, papel de p53 (Oren y Bartek, 2007).

B. PKC- β y activación de tirosinasa.

Esta proteína quinasa regula la actividad de tirosinasa por fosforilación de residuos de serina del dominio citoplasmático (Park *et al.*, 1993; 1999). PKC- β activada se encuentra en la membrana melanosomal de los melanocitos (Park *et al.*, 1999). En la Figura 7 se muestra un esquema de la activación de tirosinasa por PKC- β . La radiación UV y 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 de la célula. PKC- β es activada por DAG y esta PKC- β activada (PKC- β_a) se une al receptor de la C-quinasa I (RACK-1) (Mochly-Rosen, 1995) formando el complejo PKC- β_a -RACK-1, que se transfiere al melanosoma y fosforila los residuos de serina de tirosinasa, activándola (Park *et al.*, 2004; 2009).

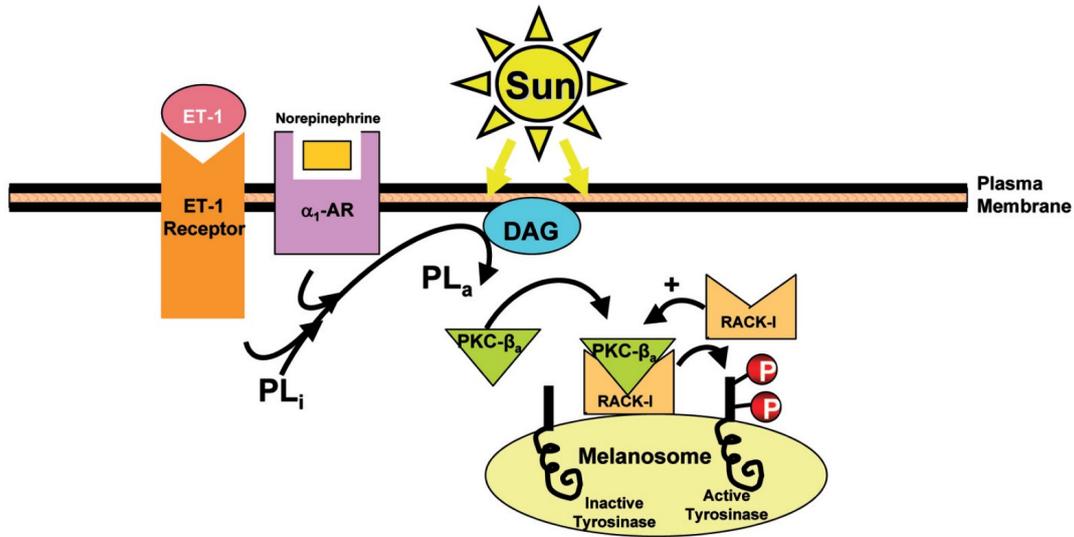


Figura 7. Activación de tirosinasa por PKC-β (Park *et al.*, 2009).

La fosforilación de tirosinasa parece que conduce a la formación de complejos entre tirosinasa y TRP-1 (Wu y Park, 2003), que estabilizan a tirosinasa y hacen que aumente su actividad enzimática (Kobayashi *et al.*, 1998). 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 melanocito e incrementa el nivel de DAG (Kausar *et al.*, 2003; Grando *et al.*, 2006), de este modo se induce la melanogénesis dependiente de la PKC- β . Los queratinocitos producen epinefrina que se une a los receptores β_2 de los melanocitos y aumentan los niveles de AMPc conduciendo a la síntesis de melaninas (Grando *et al.*, 2006).

C. Principales rutas señaladoras asociadas a tirosinasa, TRP-1 y TRP-2.

La expresión de tirosinasa, TRP-1 y TRP-2 está regulada por el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) mediante la unión a elementos consenso en promotores génicos (Yasumoto *et al.*, 1997, Goding, 2000; Park *et al.*, 2006). MITF es regulado por factores ambientales como la luz UV y por otros factores secretados por queratinocitos, fibroblastos y otras células (Yamaguchi *et al.*, 2007; Kondo y Hearing, 2011). Existen tres rutas principales implicadas en la regulación de la melanogénesis, en las que participa MITF (Figura 8) (Pillaiyar *et al.*, 2015):

1. Ruta de señalización dependiente de cAMP: el receptor de Melanocortina 1 (MC1R), controlador clave de la producción de melanina en melanocitos, está positivamente regulado por la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) y negativamente por la proteína señalizadora agouti (ASP) (Busca y Ballotti, 2000). Una vez α -MSH estimula MC1R, resulta en la producción de cAMP por la activación de adenilil ciclasa (AC). cAMP activa a la proteína quinasa A (PKA), que a su vez activa la expresión génica de MITF vía fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB) (Pawelek *et al.*, 1975; Shibahara *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2003; Widlund y Fisher, 2003). Finalmente, MITF regula la transcripción de genes cruciales que codifican proteínas relacionadas con la melanogénesis (MRPs) mediante interacciones con cajas M y E presentes en las regiones promotoras de tirosinasa (TYR), TRP-1 y TRP-2 (Figura 8). Además de α -MSH, otros péptidos derivados de POMC como β -MSH y la hormona adrenocorticotrópica, también estimulan la melanogénesis por la misma vía.

2. Ruta WNT o β -catenina: WNTs son glicoproteínas secretadas ricas en cisteína con funciones importantes en el desarrollo embrionario, especialmente en células de la cresta neural como los melanocitos (Ikeya *et al.*, 1997; Dorsky *et al.*, 1998). En esta ruta, WNT se une al receptor acoplado a proteína G (llamado Frizzled) y conduce a la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK- 3β), seguido de una acumulación de β -catenina y su traslocación al núcleo, donde forma un complejo con el factor potenciador linfoide (LEF) y el factor de células T (TCF) e incrementa la expresión del gen MITF (Cadigan y Nusse, 1997; Eastman y Grosschedl, 1999). Un aumento en el nivel de β -catenina nuclear, incrementa la expresión de MITF, que estimula la melanogénesis (Widlund *et al.*, 2002) (Figura 8).

3. Ruta de señalización ERK: también conocida como ruta de señalización MAPK, implica muchas proteínas, incluyendo MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos). La señal comienza cuando la molécula señalizadora SCF (factor de células madre) se une al receptor c-Kit sobre la superficie celular, donde Ras activa a la quinasa B-raf y por consiguiente a las MAP quinasas ERK1 y ERK2. Las MAP quinasas fosforilan a MITF dando lugar a su ubiquitinación y degradación, eliminando de este modo el mayor regulador transcripcional de la expresión de genes MRP (proteínas relacionadas con la melanogénesis) (Englaro *et al.*, 1998; Busca y Ballotti,

2000; Jordan y Jackson, 2000) (Figura 8). La activación del oncogen Ras inhibe la melanogénesis en melanocitos normales y malignos (Tsukamoto *et al.*, 1992; Englaro *et al.*, 1998). Además, el papel importante de c-Kit en la ruta ERK ha sido destacado en algunos informes (Hemesath *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003).

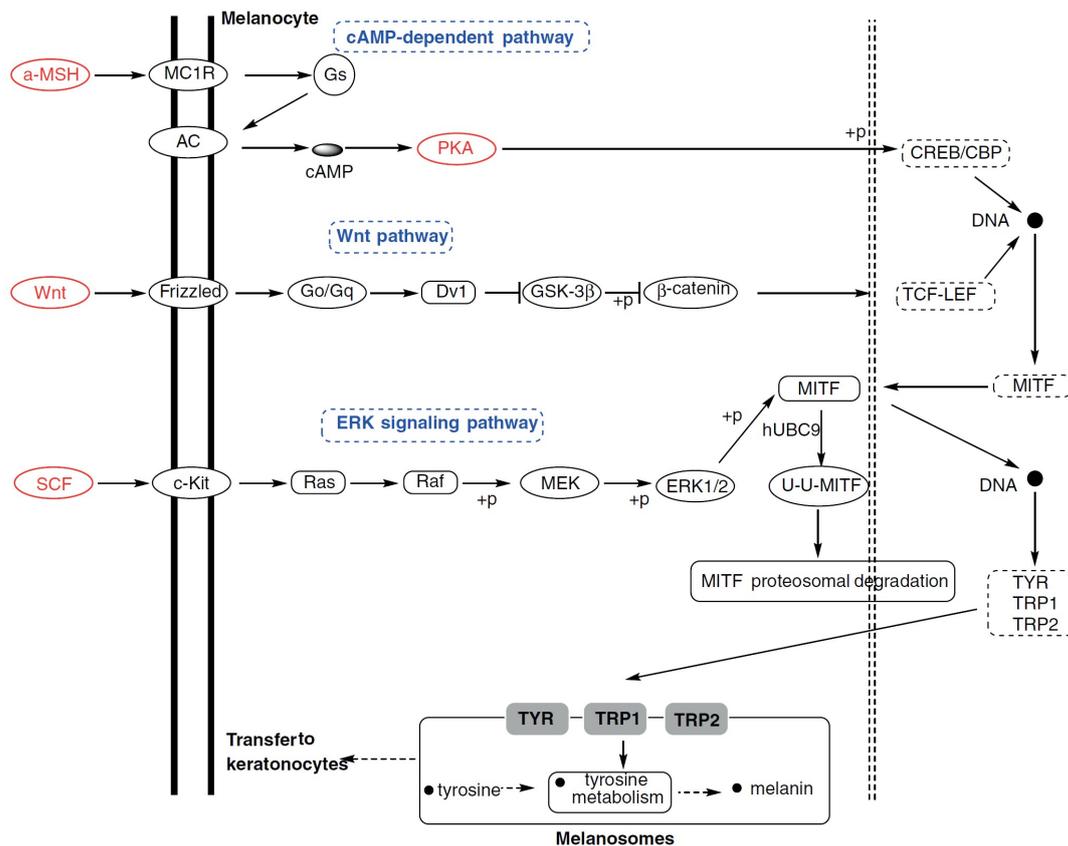


Figura 8. Regulación de la melanogénesis a través de las tres principales rutas de señalización (Te-Sheng, 2012; Pillaiyar *et al.*, 2015).

Otros factores reguladores de la melanogénesis que destacan son:

- Endotelina-1 (ET-1), que activa tirosinasa, aumenta los niveles de TRP-1 (Yada *et al.*, 1991; Imokawa *et al.*, 1992) y estimula la proliferación de melanocitos y la formación de dendritas (Hara *et al.*, 1995). ET-1 aumenta los niveles de MC1R e incrementa su afinidad por α -MSH (Funasaka *et al.*, 1988; Tada *et al.*, 1998).

- Mediadores inflamatorios como leucotrienos B4 y C4, que incrementan la síntesis de melaninas y estimulan la proliferación de melanocitos y su motilidad (Norris

et al., 1998), histamina, que produce dendricidad y regulación positiva de los niveles de tirosinasa (Gantz *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 2000), o la prostaglandina 2 α (PGF2 α), que estimula la dendricidad en melanocitos y la expresión y actividad de tirosinasa (Scott *et al.*, 2004; 2005).

- Otros como bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), que es mitógeno de melanocitos (Halaban *et al.*, 1987; 1988), el factor de crecimiento de queratinocitos (miembro de la familia FGF), que promueve la transferencia de melanosomas desde melanocitos a queratinocitos (Cardinali *et al.*, 2005), el óxido nítrico, que aumenta la actividad de tirosinasa (Roméro-Graillet *et al.*, 1997) y es producido por melanocitos y queratinocitos en respuesta a citoquinas antiinflamatorias (Heck *et al.*, 1992; Bécherel *et al.*, 1994; Joshi *et al.*, 1996; Fecker *et al.*, 2002) y la irradiación UV (Roméro-Graillet *et al.*, 1997).

D. pH del melanosoma.

El pH de los melanosomas es clave para determinar el color de la piel, y esto es debido a su efecto sobre la actividad catalítica de tirosinasa, que es la enzima que cataliza la etapa limitante en la melanogénesis. Esta enzima se encuentra en melanocitos en la membrana de los melanosomas. Se observó que en melanocitos de caucásicos (individuos de piel blanca) tirosinasa es inactiva, mientras que en melanocitos de individuos de piel oscura tiene una alta actividad catalítica.

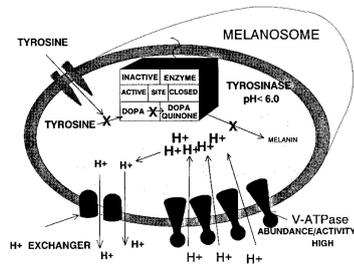
Estudios en los que se trataron los melanocitos de caucásicos y de individuos de piel oscura con distintos compuestos como el compuesto lisosomótopico cloruro amónico, los ionóforos nigericina y monesina y la bafilomicina (antibiótico inhibidor específico de V-ATPasa) (Shin *et al.*, 2014) resultaron en un rápido incremento en la actividad de tirosinasa en caucásicos, sin observar cambios en la actividad en melanosomas de individuos de piel oscura. Por otro lado, al teñir melanocitos de caucásicos con la base débil fluorescente naranja de acridina, se muestra que estos melanosomas 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 individuos de distintas razas, sino que la variación en el color de la piel puede ser debida a la cantidad de melanina

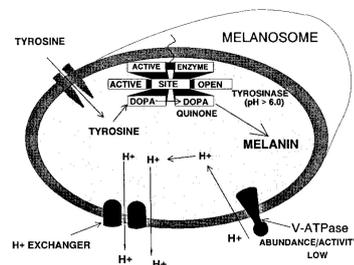
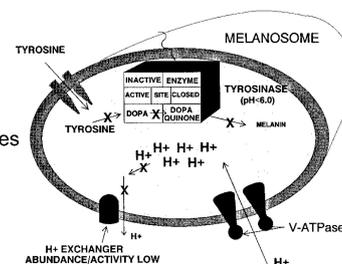
sintetizada por el mismo número de melanocitos (Staricco y Pinkus, 1957; Szabó, 1967). Estudios más recientes han demostrado que la actividad de tirosinasa en melanocitos de piel oscura es diez veces mayor que en los caucásicos (Iwata *et al.*, 1990; Abdel-Malek *et al.*, 1993). Posteriormente se demostró que los niveles de ARNm correspondiente a tirosinasa y los niveles de enzima no variaron (Fuller *et al.*, 2001).

En la Figura 9A se puede observar cómo los niveles de expresión de V-ATPasa controlan el pH del melanosoma y la actividad de tirosinasa. Los melanosomas de melanocitos caucásicos tienen alta actividad V-ATPasa, dando lugar a un medio ácido en los melanosomas. A este pH, la enzima es inactiva. En cuanto a melanocitos de individuos de piel oscura, tienen pocas moléculas V-ATPasa en la membrana del melanosoma, dando lugar a un pH más neutro y una alta actividad de tirosinasa. En la Figura 9B se muestra cómo los niveles de intercambiadores de protones controlan el pH del melanosoma y la actividad de tirosinasa. En melanosomas de individuos caucásicos existen pocos intercambiadores de protones, de manera que no pueden eliminar los protones introducidos por la V-ATPasa. Sin embargo, en melanosomas de individuos de piel oscura existen altos niveles de intercambiadores de protones, que pueden sacar los protones de la organela, manteniendo un pH cercano a la neutralidad (Fuller *et al.*, 2001).

A V-ATPase Levels Regulate Melanosome pH



B H⁺ Exchanger Levels Regulate Melanosome pH



Black Melanocytes

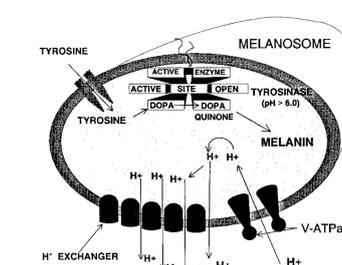


Figura 9. Modelos de control del pH del melanosoma y por tanto de la actividad de tirosinasa en individuos caucásicos y de piel oscura (Fuller *et al.*, 2001).

Nuestro grupo de investigación recientemente ha llevado a cabo un estudio del efecto del pH sobre la actividad catalítica de tirosinasa. Estos resultados se muestran en los artículos que componen esta tesis doctoral.

1.2. PATOLOGÍA.

1.2.1. Alteraciones de la pigmentación.

En humanos, las variaciones en el color de la piel vienen determinadas por la madurez de los melanosomas y no por el número de melanocitos. La relación de melanocitos/células basales varía dependiendo de la región del cuerpo, pero no dependiendo del origen étnico.

Los desórdenes de hipopigmentación se deben a una deficiencia de melanina (hipomelanóticos o amelanóticos) o a una reducción o ausencia del número de melanocitos (hipomelanocíticos o amelanocíticos). En cuanto a la hiperpigmentación, se puede producir por un exceso de melanina pero con población melanocítica normal (hipermelanóticos) o una proliferación melanocítica aumentada y melanina normal (hipermelanocíticos) (Dessinioti *et al.*, 2009).

1.2.1.1. Hiperpigmentación.

- Hiperpigmentación localizada adquirida:

El melasma (del griego, mancha negra) es una lesión adquirida de hiperpigmentación marrón clara u oscura en zonas expuestas, sobre todo en la cara, que afecta a millones de personas a nivel mundial (Grimes, 2005) (Figura 10). Es más común en mujeres que en hombres (Katsambas *et al.*, 2003). Son diversos los factores que pueden desencadenar este tipo de lesiones, siendo los más importantes la exposición a la luz solar y la predisposición genética. El embarazo, disfunción tiroidea, hormonas exógenas, cosméticos y determinados fármacos fototóxicos también pueden producir melasma (Sheth y Pandya, 2011).

Los tipos histológicos más comunes son epidérmico (cuando afecta a estratos basal y suprabasal de la epidermis) y dérmico (cuando la melanina se deposita en macrófagos perivasculares de los plexos vasculares).



Figura 10. Melasma moderado (Cestari *et al.*, 2014).

- *Hiperpigmentación localizada congénita:*

Se trata de las conocidas como manchas café con leche, lesiones benignas muy frecuentes que se pueden presentar de forma aislada o única, no se asocian con enfermedad sistémica, o de forma diseminada o múltiple, pudiendo ser marcador de síndromes genéticos como la neurofibromatosis (Figura 11) (Landau y Krafchilk, 1999; Pérez Hernández *et al.*, 2010).



Figura 11. Manchas café con leche en paciente con neurofibromatosis (Pérez Hernández *et al.*, 2010).

- Otras alteraciones hiperpigmentarias comunes son, entre otras, las conocidas manchas en la piel que se presentan en distintas patologías como el léntigo o efélides (Figura 12) y nevus.



Figura 12. Efélides en rostro.

1.2.1.2. Hipopigmentación.

Se han descrito múltiples desórdenes hipopigmentarios hasta el momento, entre ellos destacan el vitiligo, albinismo oculocutáneo, piebaldismo, y los síndromes de Waardenburg, Tietz, Hermansky-Pudlack, Chediak-Higashi y Griscelli.

- *Vitiligo*: se trata de una hipomelanosis adquirida que se manifiesta clínicamente por la aparición progresiva de máculas acrómicas en la piel y cabello de áreas afectadas, como resultado de la destrucción de melanocitos (Figura 13) (Zúñiga-Rosales *et al.*, 2014). Es una enfermedad multifactorial con componentes genéticos y ambientales (Alikhan *et al.*, 2011). Su etiología no está bien definida, pero existe fuerte evidencia de que puede ser clasificada como enfermedad autoinmune (Zúñiga-Rosales *et al.*, 2014). Recientes estudios han demostrado que tirosinasa puede actuar como autoantígeno en varios desórdenes autoinmunes. Se han encontrado anticuerpos antitirosinasa en el suero de pacientes de vitiligo, que pueden ser utilizados como marcadores de la enfermedad (Baharav *et al.*, 1996).



Figura 13. Manos afectadas por vitiligo.

Desórdenes en la síntesis de melanina:

- *Albinismo oculocutáneo (OCA)*: se trata de un desorden autosómico recesivo causado por una pérdida completa o una reducción de la biosíntesis de melanina en los melanocitos (Figura 14). Se produce por una mutación en genes OCA, por ejemplo en el gen de la tirosinasa (Tomita *et al.*, 1989; Kamaraj y Purohit, 2014). Existen distintos fenotipos para el albinismo oculocutáneo, siendo el subtipo OCA1 el más común en caucásicos, que supone aproximadamente el 50% de los casos de todo el mundo (Hutton y Spritz, 2008; Rooryck *et al.*, 2008). OCA1 se caracteriza por una ausencia completa de pigmentación en la piel, el pelo y los ojos, aunque algunos individuos pueden mostrar algún grado de pigmentación. OCA1 también produce una agudeza visual reducida, fotofobia (sensibilidad a la luz) y nistagmo (movimiento involuntario de los ojos) (Kamaraj y Purohit, 2014).

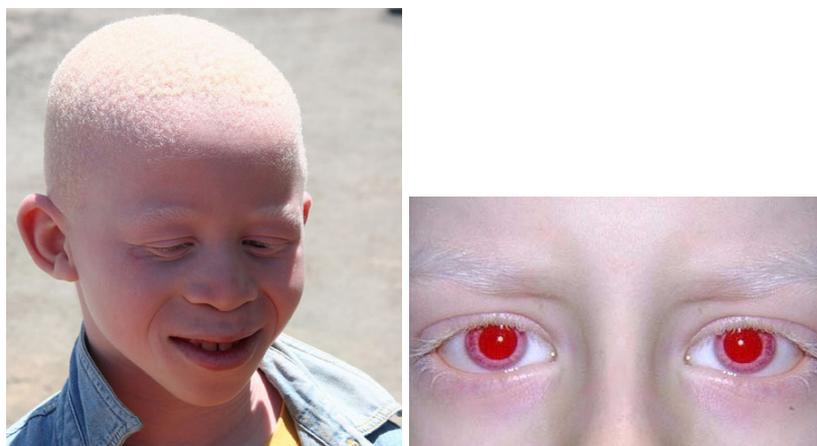


Figura 12. Albinismo oculocutáneo (OCA).

Desórdenes del desarrollo y migración de melanocitos:

- *Piebaldismo*: desorden autosómico dominante raro, con manchas despigmentadas congénitas en frente, pecho, abdomen y extremidades, donde no se encuentran melanocitos (Dessinioti *et al.*, 2009). Estas manchas pueden contener máculas hiperpigmentadas (Fleischman *et al.*, 1991; Giebel y Spritz, 1991).

- *Síndrome de Waardenburg*: desorden genético autosómico dominante caracterizado por piebaldismo y sordera neurosensorial. La sordera está asociada con ausencia de melanocitos derivados de la cresta neural en la estría vascular de la cóclea, debido a un fallo de los melanoblastos en migrar o sobrevivir (Spritz *et al.*, 2003; Dessinioti *et al.*, 2009).

- *Síndrome de Tiez*: desorden autosómico dominante raro caracterizado por los rasgos pigmentarios de albinismo oculocutáneo (despigmentación generalizada, ojos azules pero no nistagmo) y sordera congénita asociada con síndrome de Waardenburg (Dessinioti *et al.*, 2009).

Desórdenes en la formación de melanosomas y transferencia a queratinocitos:

- *Síndrome Hermansky-Pudlack*: se trata de un grupo genéticamente heterogéneo de condiciones autosómicas recesivas relacionadas, descritas en humanos y en ratones (Dessinioti *et al.*, 2009). Se conocen 8 genes humanos causantes de distintos subtipos de este síndrome (Wei, 2006). Defectos en las proteínas que codifican estos genes pueden afectar a la biogénesis y/o función de organelas intracelulares encontradas fundamentalmente en células secretoras, como son las células pigmentarias y las plaquetas. Es una forma de albinismo con desórdenes extrapigmentarios. El fenotipo pigmentario es muy variable, desde una mínima a una severa reducción en la pigmentación de la piel, pelo y ojos. Además estos pacientes sufren hemorragias prolongadas debido a anomalías en las plaquetas (Wei, 2006; Dessinioti *et al.*, 2009).

- *Síndrome de Chediak-Higashi*: desorden autosómico recesivo raro caracterizado por albinismo oculocutáneo y un brillo plateado en el pelo. Estos enfermos también presentan entre otros síntomas, una tendencia al sangrado, deficiencia neurológica primaria progresiva y deficiencia inmune severa debido a la falta de función de las células NK (Natural Killer) (Dessinioti *et al.*, 2009). Los melanocitos contienen melanosomas gigantes, lo que parece explicar la

hipopigmentación (Boissy y Nordlund, 1997). La mayoría de los casos resultan fatales, a menos que se traten con un trasplante de médula ósea (Spritz *et al.*, 2003).

- *Síndrome Griscelli*: desorden autosómico recesivo raro caracterizado por una dilución pigmentaria de la piel, brillo plateado-gris del pelo, grandes agregados de pigmento dentro de la fibra capilar y acumulación de melanosomas de última etapa grandes y anormales en el centro de los melanocitos (Ménasché *et al.*, 2003). Se dividen en tres subtipos, tipo 1, que manifiesta albinismo y deficiencia neurológica primaria severa con retraso mental, tipo 2, con albinismo y asociado a defectos inmunes potencialmente letales (Pastural *et al.*, 1997) y tipo 3, que solo presenta manifestaciones dermatológicas (Tomita y Suzuki, 2004).

1.2.2. Melanoma.

Melanoma es el nombre genérico de los tumores melánicos o pigmentados derivados de melanocitos epidérmicos activados o genéticamente alterados. El 90% de los casos afecta a la piel, pero también puede originarse en la coroides del ojo, las leptomeninges y los tractos genitourinario y gastrointestinal. Se trata de un tumor muy invasivo con gran capacidad para metastatizar y, a pesar de ser menos frecuente que los cánceres de piel de tipo no melanoma, es el responsable del 75 % de las muertes por cáncer de piel.

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 cada 100.000 habitantes (Cabanés Domenech *et al.*, 2009).

Por lo general el riesgo de contraer melanoma maligno viene determinado por factores ambientales y genéticos. La exposición al sol es uno de los más comunes, así como la aparición de nevus (se ha descrito que el 70% de melanomas tienen nevus preexistente en el lugar del tumor primario). Además, se ha descrito que el 10 % de los melanomas aparece en grupos familiares, como el “melanoma familiar”, producido por herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta, y el síndrome del lunar atípico (SLA) o “síndrome del nevus displásico” (SND), por herencia autosómica dominante con expresión y penetrancia incompleta. La piel blanca y pecosa esta asociada con un aumento del riesgo de padecer melanoma.

1.2.2.1. Principales rutas moleculares implicadas en la melanomagénesis.

Entre los distintos mecanismos moleculares implicados en la producción de melanoma destacan los siguientes:

Ruta dependiente de CDKN2A

CDKN2A (inhibidor de la quinasa 2 A dependiente de ciclina) codifica dos proteínas supresoras de tumores: p16^{CDKN2A} y p14^{CDKN2A} (Kamb *et al.*, 1994; Gil y Peters, 2006). En condiciones fisiológicas el sistema p16^{CDKN2A} inhibe CDK4/CCND1, (quinasa dependiente de ciclina 4 /ciclina D1) que afecta a la progresión del ciclo celular dependiendo de la proteína RB (de susceptibilidad a retinoblastoma) (Palmieri *et al.*, 2009) (Figura 15). Las principales alteraciones de esta ruta en el melanoma son la inactivación de p16^{CDKN2A} y amplificación de CCND1. Del mismo modo, p14^{CDKN2A} interfiere con la proteína MDM2 (proteína doble minuto murino 2) previniendo la degradación de p53 (proteína supresora de tumores) y favoreciendo su control en la progresión del ciclo celular (Box y Terzian, 2008) (Figura 15). La inactivación de p53 puede ser debida a mutaciones en p14^{CDKN2A} o al incremento de la expresión de MDM2, o de forma alternativa, al silenciamiento del gen TP53 (Box y Terzian, 2008; Palmieri *et al.*, 2009).

Ruta dependiente de MAPK

Las moléculas NRAS y BRAF pertenecen a la ruta de transducción de señales MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), que media la respuesta de células a estímulos mitóticos extracelulares y juega un papel central en la regulación del crecimiento celular, supervivencia y proliferación celular (Palmieri *et al.*, 2015). Mutaciones en NRAS (perteneciente a la familia de genes RAS) son las más detectadas en melanoma (Giehl, 2005; Thompson *et al.*, 2005; Goel *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2009). NRAS es capaz de activar a proteínas RAF y PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa) (Giehl, 2005) (Figura 15).

BRAF (proteína perteneciente a la familia RAF) induce la activación de la quinasa MEK en melanocitos, que activa a ERK, efector final de la cascada MAPK (Figura 15). El gen BRAF está mutado en melanoma en el 40-60% de los casos. La mutación más prevalente (aproximadamente el 90% de los casos) se produce por la sustitución de un ácido glutámico con una valina en el codón 600 (BRAF^{V600E}) (Michaloglou *et al.*, 2005). Mutaciones en este gen inducen estimulación continua de la

proliferación celular y crecimiento de tumores, a través de la fosforilación activante de ERK (Palmieri *et al.*, 2015).

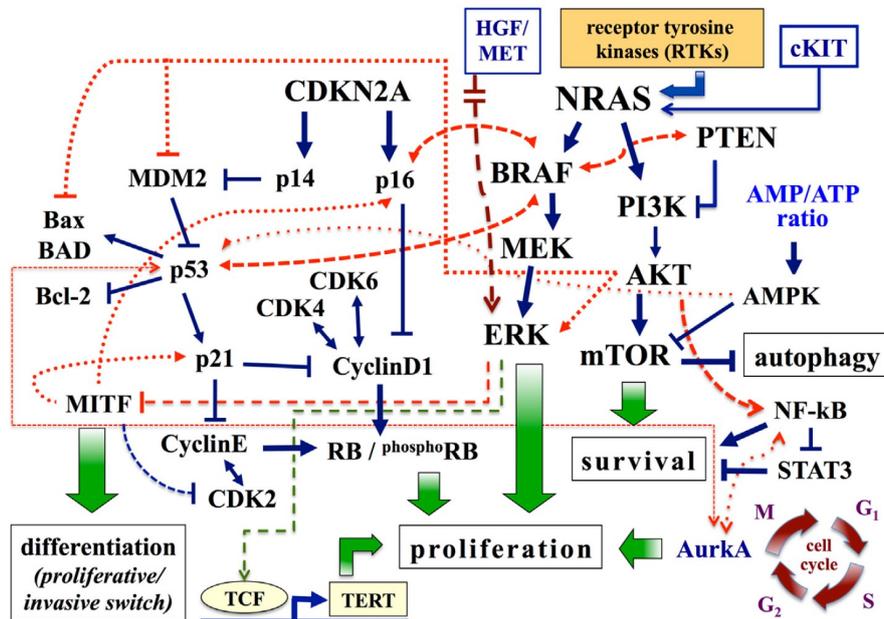


Figura 15. Principales rutas implicadas en el melanoma. Rutas asociadas con proliferación celular, supervivencia y diferenciación. Flechas, señales de activación; líneas interrumpidas, señales de inhibición; AMPK, proteína quinasa activada por AMP; Aurk, Aurora quinasa; BAD, BCL-2 antagonista de muerte celular; CDK4, quinasa dependiente de ciclina 4; CDKN2A, inhibidor de la quinasa 2 A dependiente de ciclina; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; MITF, factor de transcripción asociado a microftalmia; MEK, quinasa activada por mitógenos y regulada por señales extracelulares; PI3K, fosfatidilinositol 3 quinasa; PTEN, homólogo de la fosfatasa y la tensina; RB, proteína de retinoblastoma; TERT, telomerasa transcriptasa inversa (Palmieri *et al.*, 2015).

Ruta dependiente de PI3K

Como se ha visto en el apartado anterior, esta ruta depende de RAS para la regulación del crecimiento celular. Está constituida por la cascada de transducción de señales PTEN-PI3K-AKT (Giehl, 2005). En condiciones fisiológicas, PI3K aumenta los niveles intracelulares de los inositoles PIP2 y PIP3, mientras que PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa) los reduce (Arcaro y Guerreiro, 2007). El

gen PTEN (homólogo de la fosfatasa y la tensina) se encuentra mutado en una gran cantidad de melanomas.

Altos niveles de PIP3 activan a la quinasa AKT (principalmente AKT3 en melanoma) y su sustrato mTOR, modulando la síntesis de proteínas implicadas en el crecimiento celular y supervivencia así como en la apoptosis. La activación de AKT promueve la proliferación celular a través de la inducción y estabilización de CCND1 e inhibe la apoptosis por inactivación de muchas proteínas pro-apoptóticas como BAD (BCL-2 antagonista de muerte celular) (Curtin *et al.*, 2005; Palmieri *et al.*, 2009) (Figura 15).

El efecto combinado de la inactivación de PTEN y estimulación de PI3K-AKT resultan en un aberrante crecimiento de células neoplásicas con adquisición de resistencia a la apoptosis (Palmieri *et al.*, 2015).

MITF

MITF (factor de transcripción asociado a microftalmia) parece jugar un papel relevante en el melanoma (Wellbrock *et al.*, 2008). Además de su implicación en la pigmentación de la piel, MITF participa en el control de la proliferación y diferenciación de melanocitos (Steingrímsson *et al.*, 2004; Yajima *et al.*, 2011). Su actividad es compleja, una expresión baja o nula predispone a la apoptosis, niveles intermedios promueven la proliferación y supervivencia celular y su sobreexpresión induce diferenciación celular y posteriormente ejerce un efecto anti-proliferativo (Wellbrock *et al.*, 2008; Yajima *et al.*, 2011). Los niveles intracelulares de MITF dependen del estado de activación del gen BRAF, ya que se ha visto que una activación constitutiva de ERK está asociada a la degradación de MITF (Garraway *et al.*, 2005). Se han encontrado bajos niveles de MITF en melanomas invasivos y bajos niveles de este factor también se han asociado a un peor pronóstico y progresión clínica (Hoek *et al.*, 2008) (Palmieri *et al.*, 2015).

cKIT

El gen cKIT codifica un receptor tirosina quinasa cuyo ligando es el SCF (factor de células madre). Entre los efectores de la proteína cKIT se encuentran la cascada de las MAPK, PI3K y el factor de transcripción MITF, entre otros, por lo que la señalización a través de este receptor es esencial en el desarrollo, diferenciación,

proliferación y supervivencia celular (Hemesath *et al.*, 1998; Grichnik *et al.*, 2006). Se han detectado mutaciones activadoras y/o amplificaciones de cKIT en gran cantidad de melanomas. Muchas de las mutaciones en cKIT presentes en melanoma son mutaciones oncogénicas observadas en otros tipos de cáncer que inician una serie de eventos de señalización que resultan en proliferación celular y propagación del cáncer (Webster *et al.*, 2006).

1.2.2.2. Papel de las melaninas en el cáncer de piel.

Las personas que tienen la piel clara son 70 veces más propensas a desarrollar cáncer de piel que las personas de piel oscura (Halder y Bang, 1988). Se ha descrito que las melaninas tienen efectos beneficiosos, ya que protegen contra daños generados por la radiación ultravioleta en capas más profundas (Brenner y Hearing, 2008). Este efecto se debe principalmente a la presencia de eumelaninas, que dispersan y absorben entre el 50-75% de la radiación ultravioleta y eliminan los radicales libres generados por los rayos UV. En algunos individuos de piel clara, la fotoprotección está disminuida debido al aumento de la degradación de eumelanina por enzimas lisosomales (Szabó *et al.*, 1969; Brenner y Hearing, 2008).

Se realizaron estudios para comprobar si el mayor riesgo de cáncer de piel está asociado a una disminución de las eumelaninas o a la propia presencia de feomelaninas. Dichos estudios sugieren que nevus atípicos y melanomas presentan un mayor contenido en feomelaninas que los melanocitos normales de los mismos pacientes, aunque las células de melanoma tienen menos feomelanina que los nevus atípicos, lo que no se entiende muy bien. Algunos investigadores sugieren que la alta división de las células de melanoma diluye el pigmento (Pavel *et al.*, 2004).

Además, se ha observado que mutaciones inactivantes en MC1R (receptor de melanocortina) hacen que no se produzca más eumelanina y que se enriquezcan los melanosomas en feomelaninas, resultando en un aumento de melanoma espontáneo (Mitra *et al.*, 2012). Observando que ese modelo no depende de la exposición a agentes carcinogénicos como la radiación ultravioleta, se propuso que el aumento de la melanomagénesis podría deberse a un incremento en el daño oxidativo producido por feomelaninas (Mitra *et al.*, 2012). Esta idea también está de acuerdo con la disminución de la susceptibilidad a melanoma observada en ratones con el gen para tirosinasa eliminado, en los que tiene lugar una pérdida de la producción de feomelaninas.

La síntesis de feomelaninas está asociada con el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), por lo que lleva consigo una reducción en los retiradores de ROS como el glutatión (Galván y Moller, 2011; Galván *et al.*, 2012; Morgan *et al.*, 2013). Las feomelaninas también utilizan cisteína generada por el glutatión. La disminución en las reservas de glutatión relacionada con la síntesis de feomelaninas puede hacer a los melanocitos más vulnerables a sufrir daño en el ADN y a la inestabilidad genética.

La formación de ROS dependiente de feomelaninas ocurre con o sin radiación ultravioleta (Ranadive *et al.*, 1986; Morgan *et al.*, 2013). Se cree que el azufre en el anillo aromático de feomelaninas disminuye su potencial de ionización, haciéndolas menos estables y más eficientes para generar radicales libres, en comparación con eumelaninas (Ranadive *et al.*, 1986; Thody *et al.*, 1991; Ancans *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2013). Algunos investigadores sugieren que el zinc, que está presente en cantidad en el pelo rojo, puede ayudar a las feomelaninas a producir altos niveles de ROS, incluso en presencia de luz visible (Panzella *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2013). La detección de feomelaninas en los núcleos de las células de melanoma es controvertida y, por lo tanto, su capacidad para dañar directamente el genoma es discutible (Morgan *et al.*, 2013).

Otro mecanismo por el cual las feomelaninas pueden promover el desarrollo de tumores es a través de su efecto indirecto sobre el sistema inmune. La cisteína es un aminoácido esencial para la activación de células T, ya que estas células pierden la enzima cistationina- β -sintasa que convierte metionina en cisteína (Srivastava *et al.*, 2010). 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 otro lado, el incremento de las concentraciones de ROS asociado con feomelaninas inhibe la función de las células CD8⁺T, lo cual está indicado por expresión reducida 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 complejo de señalización del receptor de células T (TCR), inhibiendo de este modo la activación de células T (Gabilovich *et al.*, 2012). Las ROS son potentes en la diferenciación de macrófagos a fenotipo M2, asociado con TAMs (macrófagos asociados a tumor) (Figura 16). En la Figura 16 se puede observar que en individuos de piel oscura, después de exposición a luz ultravioleta se produce una ligera inflamación, menor producción de ROS y mayor actividad de células T (mayor respuestas de IFN- γ) que pueden eliminar 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), de la molécula de adhesión intercelular (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 microambiente 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 conduce a la inhibición de células T. Junto a una alta infiltración de neutrófilos y macrófagos genera un entorno que conduce a la propagación de células mutadas y desarrollo del tumor (Nasti y Timares, 2015).

Por otro lado, la eficacia de la penetración de la radiación ultravioleta en la piel esta influenciada por la pigmentación, entre otros factores (Aranow, 2011), esto tiene un gran efecto en la síntesis de vitamina D, que requiere la luz solar para activar a los precursores de su síntesis. La eumelanina absorbe radiación ultravioleta, por lo que tiene un gran efecto sobre la síntesis de precursores de la vitamina D desde 7-dihidrocolesterol (Aranow, 2011). La vitamina D puede afectar al sistema inmunitario de distintas maneras: por un lado 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 solo 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 desplazamiento en la diferenciación de las células T de fenotipo 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 así como la reparación del ADN en células de la piel) (Penna y Adorini, 2000; Gorman *et al.*, 2007).

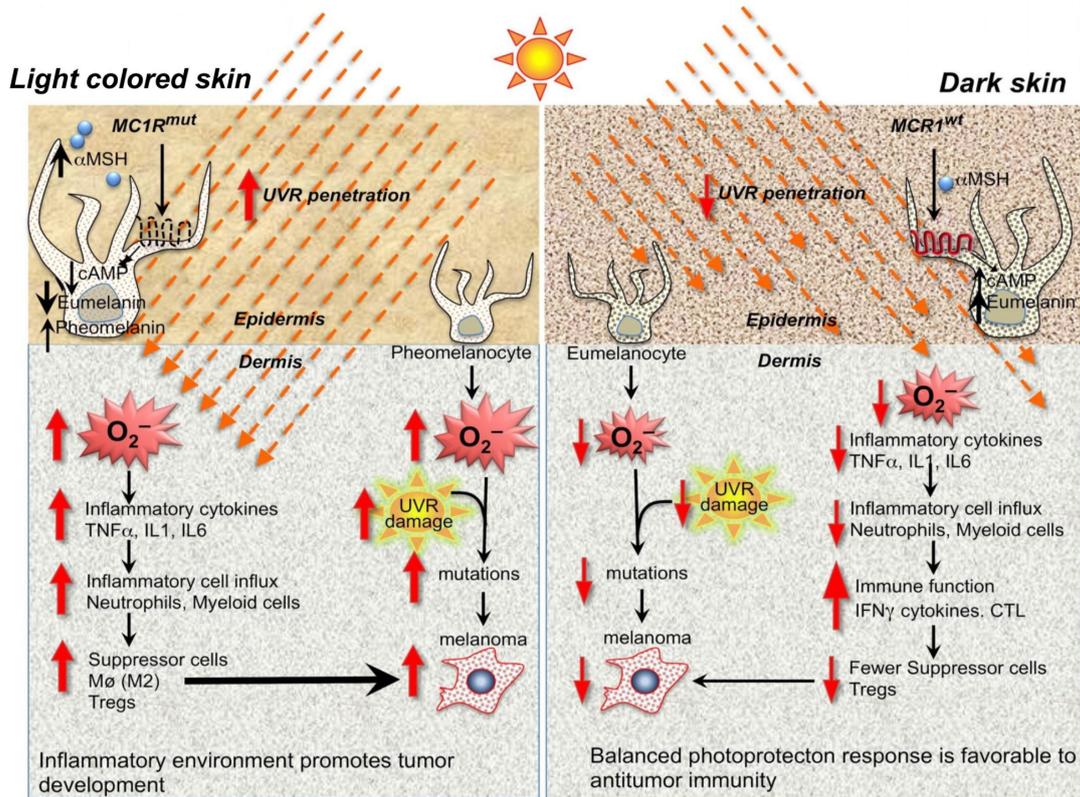


Figura 16. Sistema inmune en individuos con piel oscura y clara. (Nasti y Timares, 2015).

1.2.2.3. Diagnóstico.

Diagnóstico de visu: puede ser de ayuda una dermatoscopia o microscopía de epiluminiscencia, técnica no invasiva que permite examinar mejor las lesiones por debajo de la superficie cutánea amplificando *in vivo* la imagen sospechosa (Figura 17) (Duce, 2004).



Figura 17. Exámen dermatoscópico de lesión pigmentada

Las lesiones sospechosas se caracterizan por **A**simetría, **B**ordes irregulares, **C**olor heterogéneo, **D**íámetro mayor de 6mm y **E**volución, regla **ABCDE** (Garbe *et al.*, 2008) (Figura 18).

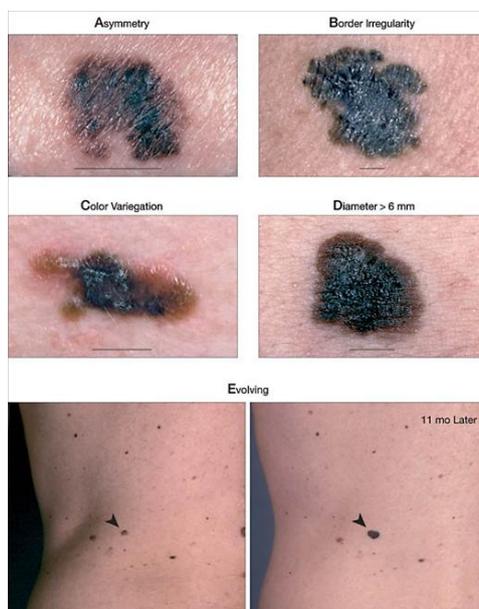


Figura 18. Criterios sospechosos de malignidad de una lesión pigmentada (Abbasi *et al.*, 2004).

Diagnóstico microscópico: con análisis anatómo-patológico de una biopsia. Se detecta por la presencia de proliferación de melanocitos atípicos en la unión dermoepidérmica, que desplaza la región basal. La aparición de agregados atípicos en la dermis papilar apunta hacia melanoma invasivo.

La fase de crecimiento es el determinante más importante del pronóstico del melanoma y puede ser radial (RGP) o vertical (VGP). En el melanoma RGP, tras la escisión del tumor existe una larga supervivencia libre de metástasis, pero cuando se inicia la fase de crecimiento vertical (VGP), se rompe la unión dermoepidérmica y se invade la dermis papilar, reticular y el tejido graso (Figura 19) (Lejeune *et al.*, 1994; Balch, 1998).

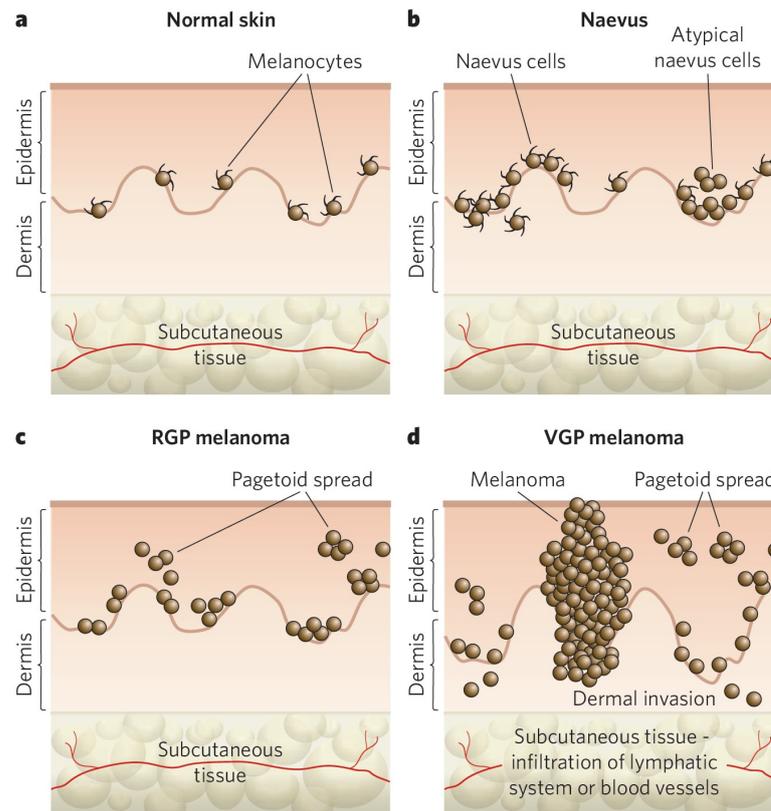


Figura 19. Progresión de la transformación de melanocitos. (a) Piel normal, (b) nevus, (c) fase de crecimiento radial (RGP) y (d) fase de crecimiento vertical (VGP) (Gray-Schopfer *et al.*, 2007)

Melanogénesis en el diagnóstico de melanoma: se estudia la capacidad para sintetizar melanina de los melanosomas, utilizada para el diagnóstico diferencial con otros tipos de tumores. La detección de melanina puede ser realizada por tinciones histoquímicas habituales o específicas como la de Fontana-Masson. La concentración y tipo de melanina se puede determinar por resonancia de espín electrónico (Sealy *et al.*, 1982). Estos datos proporcionan información útil acerca de las opciones terapéuticas. También se estudiará la ultraestructura de los melanocitos, cuyo marcador específico es la presencia de melanosomas. En lesiones malignas, la estructura del melanosoma es anormal (Ortega *et al.*, 1995; David *et al.*, 2013).

1.2.2.4. Clasificación histológica.

Existen cuatro subtipos histológicos de melanoma con características clínicas y de comportamiento biológico diferentes entre sí:

- *Melanoma superficial*: es el más común. Se trata de una lesión plana e irregular con tonos de pigmentación distintos (Figura 20 a).

- *Melanoma lentigo maligno*: es el menos agresivo, pueden pasar varios años hasta su progresión al melanoma invasivo (Figura 20 b).

- *Melanoma nodular*: tumor saliente con superficie lisa o vegetante de color negro-azulado o rojo azulado (algunos pueden ser amelánicos). Casi desde el inicio presenta crecimiento vertical e invasivo, con mucha tendencia a diseminarse (Figura 20 c).

- *Melanoma lentiginoso acral*: es la forma menos común. Empieza como una lesión macular con pigmentación irregular de distintos tonos y se extiende de forma radial para después hacerse infiltrante, queratósica, con lesiones elevadas o vegetantes en el centro. Es más común en personas de raza negra y aparece generalmente en palmas de las manos, plantas de los pies o bajo las uñas (Figura 20 d).

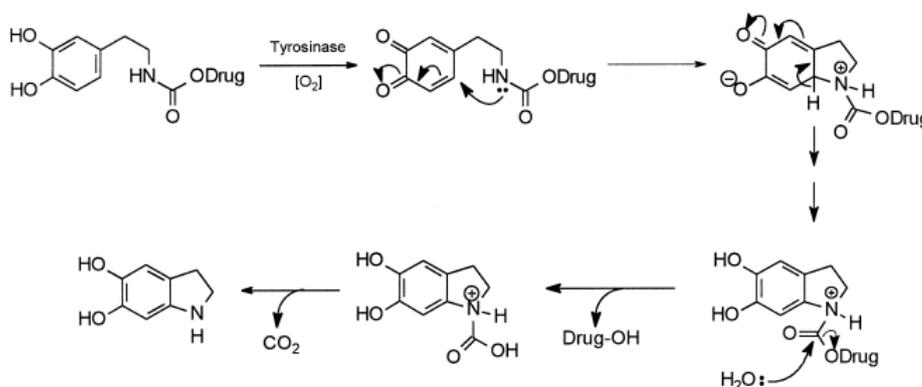


Figura 20. Ejemplos de melanomas cutáneos. (a) Melanoma superficial, (b) melanoma lentigo maligno, (c) melanoma nodular y (d) melanoma lentiginoso acral (Berrocal *et al.*, 2014).

1.2.2.5. Tratamiento.

Actualmente se siguen las siguientes estrategias como tratamiento al melanoma:

- Cirugía: extirpación del tumor primario.
- Radioterapia: utiliza radiación ionizante, fundamentalmente rayos X o rayos gamma, para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores.
- Tratamiento adyuvante:
 - Quimioterapia: los agentes quimioterapéuticos más usados son la dacarbacina, temozolomida, y nitrosureas como la carmustina, entre otros.
 - INF- α (interferón- α): ha demostrado claramente su efectividad tras la escisión del melanoma primario (Tarhini *et al.*, 2012).
 - MEDPT (Melanocyte-Directed Enzyme Prodrug Therapy): estrategia dirigida a la terapia del melanoma maligno (Jordan *et al.*, 1999; 2001). La expresión de tirosinasa aumenta durante la tumorigénesis, lo que permite utilizar terapias dirigidas hacia esta enzima. El compuesto o droga es un sustrato de tirosinasa, lo que permite que el fármaco activo se libere por actuación de esta enzima. Por tanto este compuesto debe tener una parte fenólica en su estructura, y además ser estable hasta que ocurra su liberación. Como un ejemplo, en el Esquema 6 se muestra la liberación del agente tóxico mediante la acción de tirosinasa. En publicaciones posteriores se han seguido diseñando compuestos con esta finalidad, para conseguir la introducción de fármacos en células diana (melanocitos), como productos derivados del 4-aminofenol y de la 6-amino dopamina, (Knaggs *et al.*, 2005).



Esquema 6. Mecanismo propuesto para la liberación de un agente tóxico mediante la acción de tirosinasa sobre un compuesto pro-fármaco.

- Inmunoterapia: estrategias terapéuticas que estimulan el sistema inmune para reconocer y destruir células tumorales con mayor eficacia. Ejemplos de agentes usados en inmunoterapia son IL-2 (interleuquina-2), IFN- α (terapia adyuvante), anticuerpos anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) como ipilimumab, y anticuerpos anti-PD-1 (programmed cell death) como pembrolizumab, entre otros (Vennepureddy *et al.*, 2016).

- Terapias dirigidas: Inhibidores de BRAF y MEK.

Se ha descrito que casi el 50% de los melanomas presentan mutaciones activantes en BRAF, que activan la ruta RAS-RAF-MEK-ERK y dan lugar a la proliferación del melanoma. Se han diseñado distintos inhibidores de BRAF, uno de los primeros fue sorafenib, inhibidor de multiquinasa, que no distingue entre mutante y tipo salvaje de BRAF (Eisen *et al.*, 2011; Hauschild *et al.*, 2009). Posteriormente se diseñaron una nueva generación de inhibidores selectivos para mutantes de BRAF, como por ejemplo vemurafenib (Figura 21) (Chapman *et al.*, 2012; da Rocha Dias *et al.*, 2013; Vennepureddy *et al.*, 2016), que fue aprobado por la US FDA (US Food and Drug Administration) y la Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency) para el tratamiento de melanomas no operables o melanoma metastásico con mutante BRAF^{V600E} (Ilieva *et al.*, 2014; Vennepureddy *et al.*, 2016). Drabafenib es otro inhibidor de la quinasa BRAF, que actúa de forma similar a vemurafenib (con fototoxicidad reducida) y ha demostrado tener actividad significativa en pacientes con melanoma avanzado comparado con la quimioterapia con dacarbacina (Figura 21). Fue aprobado por la US FDA en mayo de 2013 para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado que contienen la mutación BRAF^{V600E} (Hauschild *et al.*, 2012; Ballantyne y Garnock-Jones, 2013; Ilieva *et al.*, 2014; Vennepureddy *et al.*, 2016).

También se utilizan inhibidores de MEK como trametinib (Figura 21), que fue aprobado por la FDA en 2013 para el tratamiento de pacientes con melanoma no operable o metastásico con mutaciones BRAF V600E o V600K (Vennepureddy *et al.*, 2016).

- Terapias combinadas: estudios recientes demuestran que la combinación de terapias disminuye la aparición de cánceres secundarios, mientras retrasa la emergencia de resistencia e incrementa la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, comparado con la monoterapia (Mallarkey y Coombes, 2013; Aris y Barrio, 2015). La inhibición simultánea de MEK y BRAF, especialmente la combinación de inhibidores de BRAF con nuevas inmunoterapias como anticuerpos de

bloqueo de puntos de control, pueden mejorar aún más la activación inmune o contrarrestar las señales inmunosupresoras (Ilieva *et al.*, 2014).

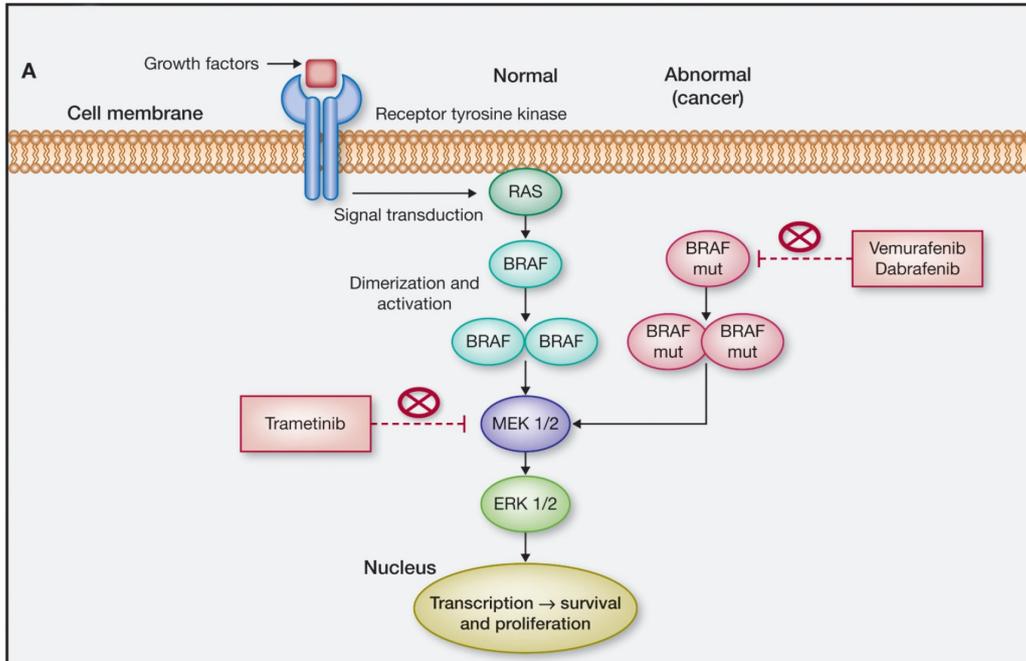


Figura 21. Inhibidores de la actividad de BRAF (vemurafenib y dabrafenib) y MEK (trametinib) (Ilieva *et al.*, 2014).

1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

Se conocen distintas aplicaciones biotecnológicas de la enzima tirosinasa. Entre ellas destaca su uso en la industria cosmética y alimentaria, en la producción de biopolímeros entrecruzados, detección y cuantificación de compuestos fenólicos, tioles y *o*-difenoles, detoxificación de aguas, así como en la síntesis de *o*-difenoles (L-dopa) y melanina. La enzima tradicionalmente usada ha sido la tirosinasa de *Agaricus bisporus* aunque actualmente hay un interés creciente en la utilización de tirosinasa de otros organismos, especialmente tirosinasas microbianas (Octavio de Faria *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2013; Zaidi *et al.*, 2014a).

1.3.1. Industria alimentaria.

Uno de los principales problemas que afectan a la industria alimentaria es el pardeamiento enzimático de frutas, hortalizas, hongos e incluso crustáceos. Este proceso afecta a las propiedades organolépticas de los alimentos y a la calidad de los mismos, reduciendo su vida útil y provocando grandes pérdidas económicas.

La enzima tirosinasa es responsable de este pardeamiento y por tanto se han seguido distintas estrategias para evitar su actuación:

- Utilización de compuestos inhibidores de la enzima, como es el caso de 4-hexilresorcinol, un compuesto catalogado como GRAS (Generally recognized as Safe) y ampliamente utilizado en la industria alimentaria con este fin (Frankos *et al.*, 1991; Dawley y Flurkey 1993; McEvily *et al.*, 1993). También el empleo de altas temperaturas, altas presiones, pH extremos o la exposición a microondas puede inactivar a la enzima.

- Eliminación de los compuestos fenólicos presentes con la utilización de especies complejantes y absorbentes como los carragenatos, ciclodextrinas y quitosanos, o bien su modificación añadiendo enzimas como las fenil-*o*-metiltransferasas (Billaud *et al.*, 2003). También se pueden utilizar atmósferas controladas con bajo contenido en oxígeno (Soliva-Fortuny *et al.*, 2001). De este modo estaríamos eliminando uno de los dos sustratos de la enzima, evitando, o al menos controlando su actividad.

- Reducción de los productos quinónicos con sulfito, cisteína o ácido ascórbico, entre otros, evitando así su polimerización (Billaud *et al.*, 2003; Kim y Uyama, 2005).

Recientemente se han estudiado distintas características de la melanina de *Nocardioopsis alba* MSA10, observando un efecto antioxidante, antimicrobiano y un potencial como colorante natural que podría ser usado como aditivo en la industria alimentaria, reduciendo los colorantes y antioxidantes artificiales o sintéticos. Esta melanina se puede utilizar para la síntesis de nanoestructuras de plata que se podrían aplicar para el envasado y almacenamiento de frutas y otros alimentos (Kiran *et al.*, 2014).

1.3.2. Industria cosmética.

En los últimos años se han estudiado gran cantidad de agentes despigmentantes, que pueden actuar de formas muy diversas:

1. Inhibiendo a la enzima tirosinasa, su maduración, o bien favoreciendo su degradación.
2. Inhibiendo a MITF.
3. Disminuyendo la actividad de MC1R.
4. Interferiendo en la maduración y transferencia de melanosomas.
5. Produciendo pérdida de melanocitos.
6. Produciendo descamación.

De todos ellos la aproximación más estudiada es la búsqueda de compuestos inhibidores de tirosinasa, ya que esta enzima cataliza la etapa limitante de la melanogénesis.

Se han caracterizado muchos inhibidores de la enzima hasta el momento, aunque solamente algunos de ellos pueden ser usados debido a sus posibles efectos secundarios y citotoxicidad (Maeda y Fukuda, 1991; Chang, 2009; Pillaiyar *et al.*, 2015). Los despigmentantes más usados son fenoles y derivados de hidroquinona.

Tirosinasa es una enzima con muy poca especificidad de sustrato, y el hecho de que muchos de los inhibidores usados como despigmentantes sean compuestos fenólicos, genera la posibilidad de que la enzima sea capaz de actuar sobre ellos en lugar de ser inhibida. Esto resalta la importancia del estudio en profundidad de estas moléculas, ya que en caso de ser sustratos alternativos de la enzima, generarían *o*-quinonas, moléculas muy reactivas cuyos efectos secundarios son desconocidos, y que podrían reaccionar con reactivos nucleofílicos como la cisteína y el glutatión, disminuyendo la capacidad antioxidante de las células en las que actúa tirosinasa (Galván y Moller, 2011; Galván *et al.*, 2012; Morgan *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que ciertos compuestos fenólicos usados como inhibidores inducen leucoderma mediante su activación a *o*-quinonas (Ito y Wakamatsu, 2015).

Algunos de los agentes más conocidos y usados comercialmente como agentes blanqueantes son hidroquinona, ácido kójico y sus derivados, arbutina, vitamina c, 4-alquilresorcinol (como el 4-butilresorcinol y el 4-hexilresorcinol), extracto de licoriza, aloesina, ácido azeláico, extracto de soja, y niacinamida, entre

otros (Toriyama *et al.*, 1990; McEvily *et al.*, 1993; Rendon y Gaviria, 2005; Solano *et al.*, 2006; Draelos, 2007; Chaudhuri, 2008; Zhu y Gao, 2008; Huber y Mujica-Fernaud, 2009; Kamakshi, 2012; Pillaiyar *et al.*, 2015).

Nuestro grupo de investigación ya demostró que algunas de las sustancias descritas como inhibidores de tirosinasa y aplicadas en productos cosméticos, como la hidroquinona, actúan realmente como sustratos alternativos (Morpurgo *et al.*, 2011; García-Molina *et al.*, 2014a; 2014b; 2014c). Se han descrito una gran cantidad de efectos adversos derivados del uso de hidroquinona, entre ellos se ha observado que afecta al metabolismo de distintos tipos celulares (Penney *et al.*, 1984; Draelos, 2007; Stratford *et al.*, 2012; Fabi y Goldman, 2013; Monteiro *et al.*, 2013), produce pigmentación ocular y, en un pequeño número de casos, daño corneal permanente (deCaprio, 1999). El uso de hidroquinona en altas concentraciones en productos cosméticos ha sido prohibido, en la Unión Europea, desde el año 2000, 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, como se ha mencionado anteriormente, puede reaccionar con compuestos nucleofílicos como la cisteína y el glutatión (Galván y Moller, 2011; Galván *et al.*, 2012; Morgan *et al.*, 2013).

Entre los artículos que componen esta tesis doctoral, se describe el comportamiento de sustrato alternativo de tirosinasa para el 4-hexilresorcinol y el ácido elágico (usados actualmente en la industria cosmética como inhibidores de tirosinasa), así como el oxiresveratrol, propuesto recientemente como potencial agente blanqueante (Xu *et al.*, 2014).

Para poder usar todos estos compuestos como despigmentantes en cosméticos se deben considerar además de la citotoxicidad, otros aspectos como solubilidad, absorción cutánea, penetración y estabilidad.

1.3.3. Producción de biopolímeros entrecruzados.

Tirosinasa participa en el desarrollo de biopolímeros para su uso como emulsionantes o en alimentos con bajo contenido en calorías y grasas. Las o-quinonas producidas por la enzima producen biopolímeros al reaccionar con nucleófilos. Tirosinasa se ha utilizado por ejemplo, para producir conjugados de sericina, péptido

presente en aguas de desecho de la industria textil de la seda (Anghileri *et al.*, 2007). También se ha usado para introducir residuos fenólicos (Lenhart *et al.*, 1998) y protéicos (Aberg *et al.*, 2004) en quitosano, un polisacárido obtenido principalmente de los exoesqueletos de crustáceos. Estos biopolímeros de quitosanos tienen gran interés, ya que con ellos se obtienen: (a) hidrogeles como sustitutivos de la piel (Kane *et al.*, 1996), (b) adhesivos (Peppas y Shalin, 1996) y (c) matrices para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos (Lee y Mooney, 2001; Mallapragada y Narasimhan, 2008).

También se ha descrito el entrecruzamiento catalizado por tirosinasa de un biopolímero (polisacárido-proteína) obtenido con gelatina y quitosano (Chen *et al.*, 2002). Tirosinasa oxida a residuos de L-tirosina de la gelatina y estos residuos reaccionan con grupos amino del quitosano. Las propiedades de este gel gelatina-quitosano son diferentes de las de la gelatina original.

Finalmente, se mostró la capacidad de tirosinasas de hongos de polimerizar varias proteínas en presencia de polifenoles entrecruzantes de baja masa molecular (Hurrell *et al.*, 1982; Thalmann y Lötzbeyer, 2002). En este caso, el fenol actúa como sustrato para el proceso de entrecruzamiento, facilitando la interconexión entre proteínas (Matheis y Whitaker, 1984).

1.3.4. Biosensores enzimáticos para la detección y cuantificación de compuestos.

Las aguas residuales pueden contener residuos fenólicos procedentes de industrias papeleras, textiles y petroquímicas, entre otras (Yamada *et al.*, 2005). Actualmente, el campo de los biosensores enzimáticos está tomando fuerza como sustituto de los métodos cromatográficos y espectrofotométricos tradicionalmente usados para detectar y cuantificar este tipo de compuestos, siendo una de sus principales ventajas la posibilidad de determinarlos *in situ*.

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; Singh, 2011; Song *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). En muchos casos, para su determinación se recurre a la medida del consumo de oxígeno por parte de la enzima o a la reducción electroquímica de la *o*-quinona liberada como producto de reacción (Tembe *et al.*, 2006).

Los biosensores de tirosinasa también son utilizados para la determinación de compuestos inhibidores de su actividad catalítica como por ejemplo compuestos organofosforados (Vidal *et al.*, 2006), ácido benzoico (Sánchez-Paniagua y López-Ruiz, 2011; Kochana *et al.*, 2012) y el ión fluoruro (Asav *et al.*, 2009). También se han utilizado para llevar a cabo la detección de otras sustancias como bisfenol A (Wu *et al.*, 2012), norepinefrina (Mohammadi *et al.*, 2011) y epinefrina (Apetrei *et al.*, 2013).

Se han diseñado otros biosensores en los que participa tirosinasa, que permiten determinar hidroquinona y catecol al mismo tiempo, mediante voltametría diferencial de pulso (Tang *et al.*, 2013), catecol en muestras de té, utilizando un método amperométrico y aplicando la técnica “capa por capa” (“layer-by-layer”, LbL) (Karim *et al.*, 2014), carbamatos, utilizando biosensores de lacasa y tirosinasa (Oliveira *et al.*, 2014), fenol, utilizando como biosensor el champiñón liofilizado y el electrodo de oxígeno de Clark (Silva *et al.*, 2014) y cuantificación de la capacidad antioxidante de plantas (Rodríguez-Sevilla *et al.*, 2014).

1.3.5. Biorremediación.

Los compuestos fenólicos son importantes contaminantes orgánicos, que confieren al agua un mal sabor y un mal olor, además de ser muy tóxicos. Estos compuestos aparecen en el agua principalmente por vertidos de industrias de carbón, petróleo, pintura, fármacos, insecticidas y curtidos. Para la descontaminación de aguas se utilizan métodos que consisten en la extracción con disolventes, oxidación química, degradación microbiana o utilización de enzimas como peroxidasas, lacasas y tirosinasas (Durán y Espósito, 2000; Rodríguez-López *et al.*, 2000b; López-Molina *et al.*, 2003; Octavio de Faria, 2007). La enzima tirosinasa ha sido utilizada con estos fines, tanto en disolución como inmovilizada, con la ventaja de su posible reutilización. Por ejemplo, tirosinasa inmovilizada ha permitido la eliminación de fenol (Ensuncho *et al.*, 2005; Dinçer *et al.*, 2012), bisfenoles (Niccoluci *et al.*, 2011) y alquilfenoles (Tamura *et al.*, 2010).

Generalmente, los productos *o*-quinónicos formados dan lugar a reacciones de polimerización, obteniéndose compuestos insolubles que se pueden eliminar por filtración o precipitación. Se ha utilizado tirosinasa para oxidar fenol, 4-metilfenol, 4-metoxifenol y 4-clorofenol, que actuando junto a quitosano permite retirar los compuestos quinónicos originados tras su polimerización (Saitoh *et al.*, 2011). También se han utilizado agregados de tirosinasa entrecruzados en la eliminación de

p-metilfenol, *p*-clorofenol, fenol y bisfenol (Xu y Yang, 2013). Además, se ha conseguido la eliminación de naftoles y dihidroxinaftalenos mediante el uso de tirosinasa de champiñón y quitosano (Kimura *et al.*, 2014) y la eliminación de paracetamol mediante agregados de una combinación de tirosinasa y lacasa actuando de forma conjunta (Ba *et al.*, 2014).

1.3.6. Producción de *o*-difenoles.

El *o*-difenol L-dopa es utilizado para el tratamiento del Parkinson. Al año se calcula que se consumen aproximadamente 250 toneladas de este medicamento. Se suele producir mediante síntesis química, a partir de vanillina e hidantoína en un proceso muy laborioso (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 (Pialis *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2000; Seetharan y Saville, 2002; Ho *et al.*, 2003; Chuang *et al.*, 2005; Ates *et al.*, 2007; Norouzian *et al.*, 2007; Algieri *et al.*, 2012). Sin embargo, las productividades obtenidas en estos intentos son bajas, hecho que se atribuye principalmente a dos factores (Octavio de Faria *et al.*, 2007):

1. La conversión de L-tirosina en L-dopa es incompleta (menos del 30% es consumida durante el proceso).
2. Parte del L-dopa producido vuelve a reaccionar con tirosinasa produciendo *o*-dopaquinona, que cicla espontáneamente a leucodopacromo, el cual mediante una reacción de oxidación/reducción con una segunda molécula de *o*-dopaquinona regenera una molécula de L-dopa, pero también genera una molécula de dopacromo, que evoluciona hacia melaninas (Figura 22).

Para evitar que se produzcan melaninas en el proceso, se puede añadir ácido ascórbico al medio, el cual reduce *o*-dopaquinona a L-dopa en una reacción no enzimática instantánea (Figura 22). Sin embargo, se necesitarían elevadas cantidades de ácido ascórbico y se ha demostrado que estas 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).

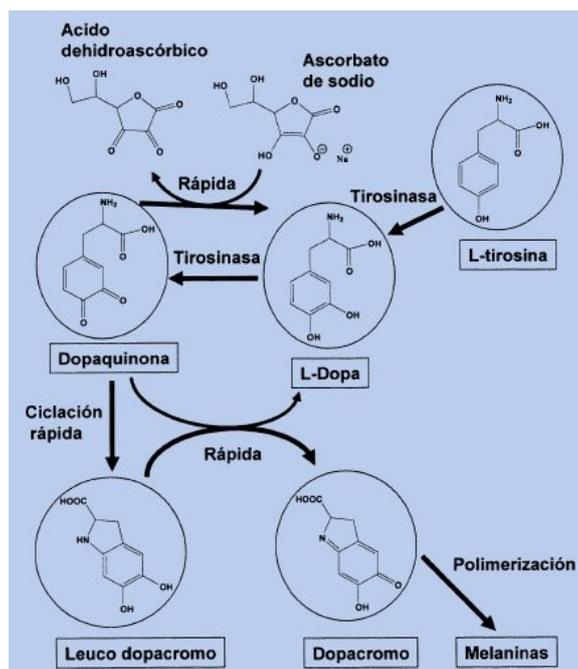


Figura 22. Acción de tirosinasa sobre L-tirosina y L-dopa en presencia de ácido ascórbico (Marín-Zamora *et al.*, 2009).

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 utilización de tirosinasa inmovilizada en distintos medios junto a la técnica Layer-by-Layer para sintetizar varios *o*-difenoles (Guazzaroni *et al.*, 2012a, 2012b; Subrizi *et al.*, 2014). Del mismo modo se ha avanzado en la utilización de microorganismos para producir L-dopa (Surwase y Jadhav, 2011; Surwase *et al.*, 2012; Min *et al.*, 2015), en concreto se están desarrollando métodos que utilizan microorganismos con actividades tirosinasa, tirosina fenol liasa o *p*-hidroxifenilacetato-3-hidroxilasa para su producción.

Nuestro Grupo de Investigación (GENZ) llevó 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*-difenol da lugar a un complejo estable borato-difenol (Mochizuki *et al.*, 2002; Yamazaki e Itoh, 2003; Waite, 1984), que mejora la acumulación de *o*-difenol al impedir que sea oxidado por tirosinasa. Para la formación del complejo, el medio debe

ser muy básico (pH 9.0) y debe contener hidroxilamina, para facilitar que la forma metatirosinasa pase a desoxitirosinasa (cerrando así el ciclo catalítico), y ácido ascórbico, para reducir la *o*-quinona a *o*-difeno. En este caso el ácido ascórbico prácticamente no inactiva 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*-difenoles de diferentes características y cargas como el 4-*terc*-butilcatecol, 4-metilcatecol, 4-metoxicatecol, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y L-dopa, a partir de sus monofenoles correspondientes (4-*terc*-butilfenol, 4-metilfenol, 4-metoxifenol, ácido *p*-hidroxifenilpropiónico, ácido *p*-hidroxifenilacético y L-tirosina), consiguiendo rendimientos muy altos en todos los casos (88-96%). Además, 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*-difenoles utilizando tirosinasa de champiñón inmovilizada sobre soportes de cinamato (García-Ruiz *et al.*, 2009).

1.4. ESTRUCTURA DE TIROSINASA.

Las tirosinasas son metaloenzimas pertenecientes a la familia de proteínas de cobre tipo-3, que contienen dos átomos de cobre en el sitio activo (Solomon *et al.*, 1992). Se pueden encontrar en bacterias, plantas, hongos, artrópodos y mamíferos, y son responsables de la pigmentación y protección frente a la radiación, entre otras funciones (Mayer, 2006). Tirosinasa lleva a cabo dos reacciones enzimáticas secuenciales, la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de estos últimos a *o*-quinonas (actividad difenolasa). Las *o*-quinonas polimerizan espontáneamente a melaninas (Ramsden y Riley, 2014). Dentro de esta familia de proteínas también están las catecol oxidasas, que se encuentran principalmente en plantas y solo muestran actividad difenolasa (Gasparetti *et al.*, 2010; Kanteev *et al.*, 2015).

Los miembros de esta familia de proteínas de cobre tipo-3 tienen un sitio activo conservado, con seis residuos de histidina, que están localizados en un haz de cuatro hélices, coordinando los dos iones de cobre, Cu_A y Cu_B (Figura 23) (Decker *et al.*, 2006). Nótese el alto grado de similitud de los sitios activos representados en la Figura 23.

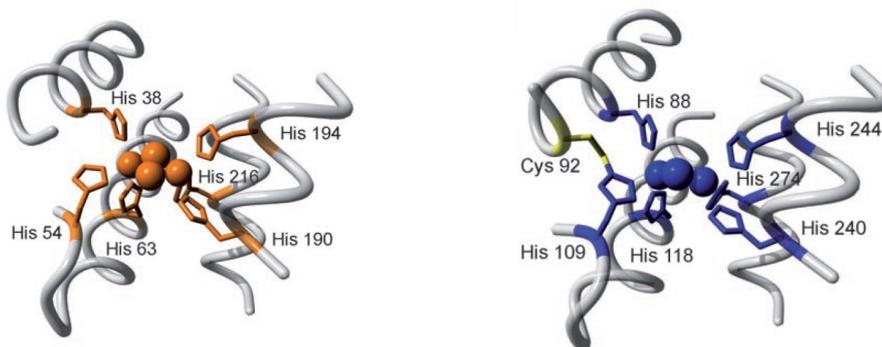


Figura 23. Sitio activo de la tirosinasa bacteriana de *Streptomyces castaneoglobisporus* (izquierda, color naranja) (Decker *et al.*, 2006; Matoba *et al.*, 2006) y de la catecol oxidasa de *Ipomoea batatas* (derecha, color azul) (Klabunde *et al.*, 1998; Decker *et al.*, 2006). Los residuos de histidina de unión a los cobres están unidos a las hélices α y bucles (color gris). Las uniones Cys-His se muestran en color amarillo.

Distintos estudios cristalográficos y de mecanismo han confirmado que las propiedades espectroscópicas de los iones de cobre son similares en todas las proteínas de cobre de tipo-3, lo que sugiere que las diferencias en actividad pueden ser atribuidas a la arquitectura y accesibilidad del sustrato de las distintas proteínas (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Decker *et al.*, 2006; Ramsden y Riley, 2014).

1.4.1. Estructura general.

La estructura de tirosinasa puede ser dividida en tres dominios: el dominio central, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal (van Gelder *et al.*, 1997).

El dominio central, que está compuesto por seis residuos de histidina conservados, contiene los iones Cu_A y Cu_B . Es el dominio más conservado entre las tirosinasas. Investigaciones bioquímicas de tirosinasas de distintas especies han mostrado la implicación de los residuos de histidina conservados en la unión a los átomos de cobre (Nakamura *et al.*, 2000; Olivares *et al.*, 2002; Schweikardt *et al.*, 2007; Kaintz *et al.*, 2015). Se ha encontrado una unión tioéter inusual entre el segundo residuo de histidina coordinado con el Cu_A y un residuo de cisteína adyacente en catecol oxidasa de patata (*Ipomoea batatas*) y en tirosinasa de *Aspergillus oryzae* (Figuras 23 derecha y 24 C, respectivamente), pero no se encuentra en tirosinasa de

Streptomyces castaneoglobisporus, *Bacillus megaterium*, de ratón ni humana (Figura 23). En la Figura aparece la unión Cys-His en color amarillo (Matoba *et al.*, 2006; Decker *et al.*, 2007; Sendovski *et al.*, 2011). Se propuso que la función de esta unión tioéter es estabilizar el segundo residuo de histidina del sitio activo que se encuentra en el bucle flexible, en contraste con las otras cinco histidinas del sitio activo que se encuentran en una región estable de la hélice α (Marusek *et al.*, 2006; Kanteev *et al.*, 2015).

El dominio N-terminal es un péptido de tránsito que determina la ubicación final de la enzima y después se lleva a cabo su eliminación proteolítica (Olivares *et al.*, 2002; Mayer, 2006; Kaintz *et al.*, 2014). En las tirosinasas de plantas, el péptido N-terminal, dirige la enzima al cloroplasto y en humanos y ratón se ha sugerido que está implicado en la transferencia al melanosoma (Lerch, 1988). Las tirosinasas de hongos son enzimas citoplasmáticas, de manera que no contienen el péptido, aunque en algunos casos están asociadas a la pared celular (Marusek *et al.*, 2006). En tirosinasas bacterianas fue identificado un péptido señal TAT, responsable de la secreción de proteínas, en el dominio N-terminal en *Streptomyces* y *Verrucomicrobium spinosum* (Schaerlaekens *et al.*, 2001; Fairhead y Thöny-Meyer, 2010).

El estado latente de tirosinasa (pro-tirosinasa) está formado por el dominio central y el dominio C-terminal. El dominio C-terminal bloquea la entrada al sitio activo a través de un residuo “guardián” que entra en el sitio activo de forma similar a un sustrato o un inhibidor (Figura 24) (Kanteev *et al.*, 2015). La activación *in vivo* de las pro-tirosinasas tiene lugar por la escisión proteolítica del dominio C-terminal, e *in vitro* se puede conseguir con el uso de detergentes que producen cambios conformacionales (Mayer, 2006). La enzima tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* no presenta dominio C-terminal, pero el sitio activo está cubierto por un “guardián” de una proteína *caddie* asociada (Figura 24 B) (Matoba *et al.*, 2006; Kanteev *et al.*, 2015). La tirosinasa de *Bacillus megaterium* no tiene dominio C-terminal, y al contrario de lo que ocurre con la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* el sitio activo está expuesto y la enzima siempre se encuentra en forma activa (Figura 24 A y B) (Sendovski *et al.*, 2011; Kanteev *et al.*, 2015).

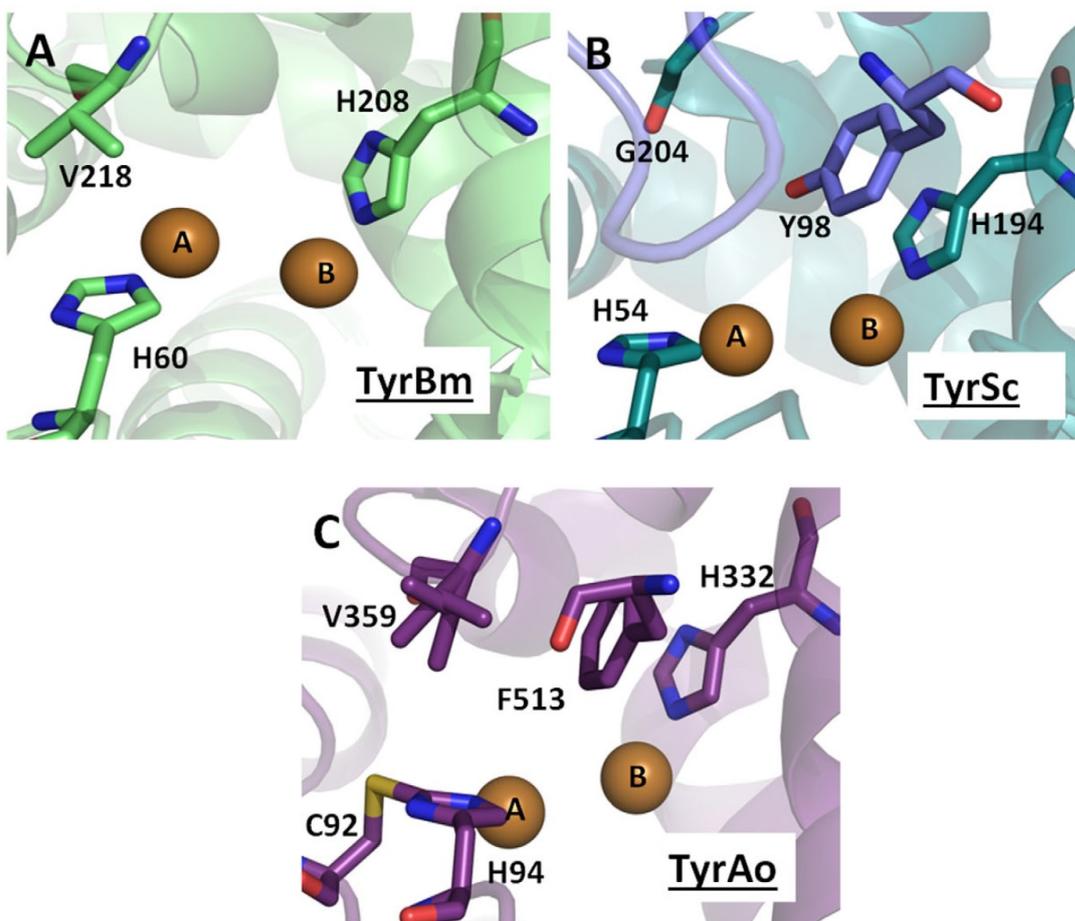


Figura 24. Sitio activo de la tirosinasa de (A) *Bacillus megaterium* (TyrBm), (B) *Streptomyces castaneoglobisporus* (TyrSc) y (C) *Aspergillus oryzae* (TyrAo) (Kanteev *et al.*, 2015). (A) El sitio activo de TyrB y su residuo bloqueante, Val218, aparecen en color verde. (B) El sitio activo de TyrSc y su residuo bloqueante Gly204 aparecen en color verde azulado y residuo “guardián” Tyr98 de la proteína *caddie*, en azul. (C) El sitio activo de TyrAo, incluyendo la Cys92 y la His94, que forman el enlace tioéter, un residuo bloqueante, Val359 y un residuo “guardián”, Phe513, están representados en color púrpura.

Gracias a los recientes avances en el campo de la cristalografía y en la determinación de la estructura de proteínas, se ha podido llevar a cabo la cristalización de gran cantidad de tirosinasas y catecol oxidasas, ya sea de bacterias, como la de *Streptomyces castaneoglobisporus* y *Bacillus megaterium*, hongos y plantas, como *Ipomoea batatas*, *Vitis vinifera*, *Agaricus bisporus* y *Aspergillus oryzae*, o bien artrópodos, como *Manduca sexta*. También se han descrito algunas características

estructurales de la enzima de mamíferos. A continuación, se detallan las estructuras tridimensionales de algunas de ellas:

1.4.1.1. Tirosinasas bacterianas.

Las tirosinasas bacterianas mejor caracterizadas son las del género *Streptomyces*. La primera tirosinasa que pudo ser cristalizada fue la de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba *et al.*, 2006; Matoba *et al.*, 2011). Matoba y colaboradores obtuvieron cristales de la enzima con la proteína *caddie* ORF378 con una resolución de 1.2-1.8 Å. El complejo de tirosinasa con la proteína ORF378 tiene una forma elipsoidal con unas dimensiones de 40 x 55 x 60 Å.

El sitio activo de la enzima está formado por un haz de cuatro hélices α (α_2 , α_3 , α_6 y α_7). Cada uno de los iones cobre está coordinado por tres residuos de histidina, que se encuentran en el haz de cuatro hélices α , excepto la His54. Un ión cobre (Cu_A) está coordinado por His38, His54 e His63. His38 e His63 se encuentran en medio de las hélices α_2 y α_3 , respectivamente. El segundo ión de cobre (Cu_B) está coordinado por las histidinas His190, His194 e His216. Los residuos His190 e His194 están localizados al principio y en medio de la hélice α_6 , respectivamente, mientras que His216 se encuentra en medio de la α_7 (Figura 23 izquierda y 24 B). Esta agrupación binuclear de cobre está localizada en el fondo de una larga concavidad, que funciona como un bolsillo para la unión de sustratos. Este bolsillo está formado por residuos hidrofóbicos. Además de la estructura de hélices α , tirosinasa tiene también algunas láminas β . Los extremos N- y C-terminal forman una estructura en lámina β .

Como se ha comentado anteriormente, la proteína *caddie*, se encuentra en la superficie de esta tirosinasa e impide la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima. Esta proteína está formada por seis láminas β , muy retorcidas en la lámina β_4 , y una hélice α , que está rodeada por una lámina β retorcida.

Se ha observado que tras la oxigenación, la distancia entre los iones de cobre disminuye, mientras que la posición de las histidinas permanece invariable (Matoba *et al.*, 2006), lo que indica que durante la catálisis los estados de oxidación del cobre y su localización cambian. La determinación de la estructura la tirosinasa de *S. castaneoglobisporus* en complejo con la proteína *caddie* revelan que mientras el Cu_B es estructuralmente estable en el sitio activo, el Cu_A y su residuo de histidina ligado (His54) son flexibles durante la catálisis (Figura 24 B). Los autores de este trabajo

postulan que puede ser esta histidina la que acepte el segundo protón del *o*-difenoil que se une a la enzima.

Posteriormente a la cristalización de la enzima de *Streptomyces castaneoglobisporus*, se ha discutido la posición de las histidinas axiales del sitio activo y su implicación en la catálisis (Decker *et al.*, 2006). En estos estudios se postula que la histidina axial unida al Cu_A no es la His54 sino la His63. Además, se indica que las dos histidinas axiales unidas a los cobres están en posición *cis* al contrario de la posición *trans* que propusieron Matoba y colaboradores (Matoba *et al.*, 2006).

Matoba y colaboradores proponen un mecanismo para el transporte de cobre en esta tirosinasa, que está favorecido por la proteína *caddie*, a la que denominan metalochaperona (Matoba *et al.*, 2011).

Otra importante tirosinasa bacteriana cristalizada es la *Bacillus megaterium* (Sendovski *et al.*, 2010; Sendovski *et al.*, 2011). Esta enzima no requiere la presencia de ninguna proteína *caddie* para su actividad (Shuster y Fishman, 2009). La estructura de esta tirosinasa ha sido determinada con una resolución de 2.0-2.3 Å. Se trata de un dímero con forma elipsoidal y unas dimensiones de 45 x 25 x 80 Å (Figura 25). Al igual que en el caso de la enzima de *S. castaneoglobisporus*, su sitio activo (Figura 24 A) está formado por un haz de cuatro hélices α (α_2 , α_3 , α_7 y α_8) y cada ión de cobre está coordinado por tres residuos de histidina. El Cu_A está coordinado por la His41 (α_2), la His69 (α_3) y la His60 (localizada en un gran lazo entre dos hélices α). El Cu_B está coordinado por las histidinas His204 (α_7), His208 (α_7) y la His231 (α_8).

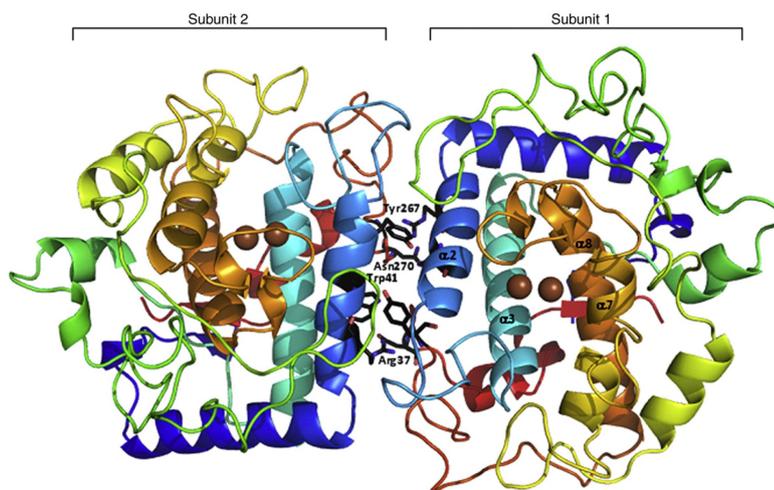


Figura 25. Visión del conjunto de la estructura de tirosinasa de *Bacillus megaterium* (Sendovski *et al.*, 2011). Los iones de cobre del sitio activo se representan en color marrón y las interacciones entre ambas subunidades en color negro (Trp41-Tyr267 y Arg37-Asn270). Las cuatro hélices α principales del sitio activo de la enzima se muestran en color azul oscuro (α_2), azul claro (α_3), amarillo (α_7) y naranja (α_8).

Aunque la enzima cristalizada es un dímero, en disolución existen las dos formas (monomérica y dimérica). Al aumentar la concentración de enzima, el equilibrio se desplaza transformándose toda la enzima en dimérica.

En el estudio de la cristalización de tirosinasa de *Bacillus megaterium*, también se ha demostrado la plasticidad que existe en el modo de unión de los iones cobre al sitio activo de la enzima. La enzima se pudo cristalizar solo con el Cu_A en el sitio activo, perdiéndose el Cu_B , lo que sugiere que éste último es lábil en su unión. El Cu_A estuvo presente en todas las estructuras cristalinas encontradas, lo que indica que su unión es más fuerte.

Se ha propuesto que el transporte del Cu_A está facilitado por los residuos Met61 y Met184, que transfieren los iones de cobre a la His60 flexible, que posiciona el ión de cobre en el sitio activo (Figura 26) (Kanteev *et al.*, 2013; 2015). Por otro lado, se ha propuesto que el Cu_B entra en el sitio activo a través de dos residuos conservados Asn205 y Phe197. El papel del residuo Asn205, altamente conservado, es estabilizar la His204, permitiendo la correcta coordinación del Cu_B en el sitio activo (Kanteev *et al.*, 2013; 2015).

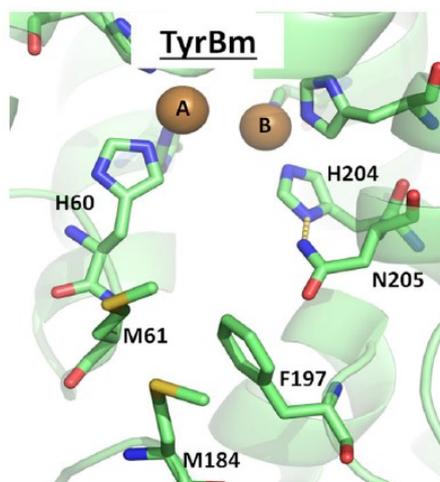


Figura 26. Sitio activo de *Bacillus megaterium* con los residuos implicados en el transporte del cobre (Kanteev *et al.*, 2015).

Se ha sugerido que en la actividad de tirosinasa los sustratos monofenólicos se unen al Cu_A y los difenólicos al Cu_B (Olivares *et al.*, 2002; Ramsden *et al.*, 2014). Sin embargo, esta hipótesis ha sido refutada recientemente, tras la cristalización de tirosinasa de *Bacillus megaterium* unida a sustratos monofenólicos y difenólicos (Figura 27) (Goldfeder *et al.*, 2014). Se demostró que tirosina y L-dopa se orientaban de manera similar hacia el Cu_A mediante interacciones π - π con el segundo residuo de histidina coordinado al Cu_B, His208 (Cuff *et al.*, 1998; Deeth y Diedrich, 2010). El extremo carboxilo de los sustratos forma interacciones polares con la arginina Arg209, que se vio era importante para la actividad. Se observó que para permitir la entrada del sustrato, el residuo bloqueante Val218 se desplaza 1.4 Å, confirmando su papel en la orientación del sustrato (Goldfeder *et al.*, 2014). Además, a partir de este estudio, Goldfeder y colaboradores sugieren que para que tenga lugar la actividad monofenolasa, una molécula de agua es activada por dos residuos conservados, Glu195 y Asn205, y actúa como base retirando el protón de los monofenoles (Goldfeder *et al.*, 2014). Esta hipótesis ha sido demostrada experimentalmente por Solem y colaboradores (Solem *et al.*, 2016).

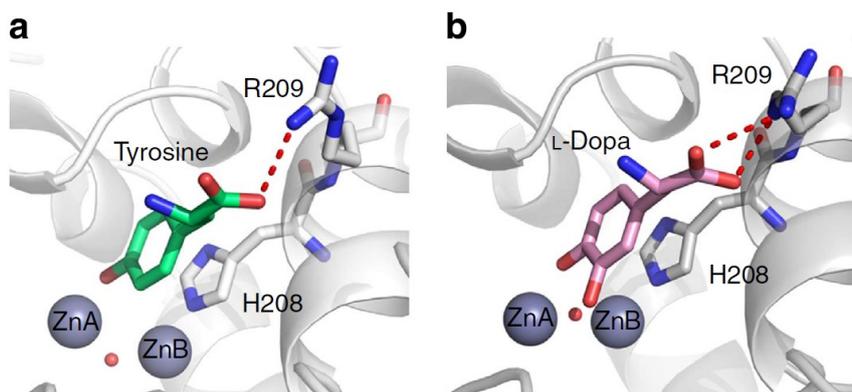


Figura 27. (a) Tirosina (verde) y (b) L-dopa (rosa) en el sitio activo de tirosinasa de *Bacillus megaterium*. El extremo carboxilo forma puentes de hidrógeno con la arginina R209. Este ensayo se realizó tras bañar los cristales en $ZnCl_2$ antes de añadirlos a la disolución con los sustratos, para poder atrapar los sustratos dentro del sitio activo de tirosinasa de *Bacillus megaterium* en el cristal (Goldfeder *et al.*, 2014). Previamente se mostró que se podían reemplazar iones Cu^{2+} con iones Zn^{2+} en esta tirosinasa sin consecuencias estructurales, mientras que la presencia de iones Zn^{2+} inhiben la actividad de tirosinasa sobre monofenoles y difenoles (Han *et al.*, 2007; Sendovski *et al.*, 2011). Esto permitió obtener por primera vez estructuras de alta resolución con una densidad electrónica clara para L-tirosina y L-dopa en el sitio activo de tirosinasa (2.2Å de resolución) (Goldfeder *et al.*, 2014).

1.4.1.2. Tirosinasas de plantas y de hongos.

Como ejemplo de estas tirosinasas vamos a describir la estructura de la tirosinasa de la patata dulce (*Ipomoea batatas*), de *Vitis vinifera* y finalmente del hongo *Agaricus bisporus*, utilizada como enzima modelo en ensayos de inhibición.

En el caso de tirosinasas de plantas, la primera cristalizada fue la de *Ipomoea batatas*, aunque realmente es una catecol oxidasa, puesto que no presenta actividad monofenolasa (Klabunde *et al.*, 1998; Gerdemann *et al.*, 2002). La enzima está formada por un monómero con forma elipsoidal de 55 x 45 x 45 Å (Klabunde *et al.*, 1998). Un haz de cuatro hélices α (α_2 , α_3 , α_6 y α_7) forma el sitio activo y está apoyado por dos hélices α más (α_1 y α_4) y por láminas β cortas (Figura 28 A). El Cu_A está coordinado por tres histidinas, His88 (en medio de de la hélice α_2) y la His109 y la His118 (al comienzo y en medio de la hélice α_3). El Cu_B está coordinado por la His240, His244 e His274, que se encuentran en mitad de las hélices α_6 y α_7 (Figuras 23

derecha y 28 B). Se demostró la existencia de un puente tioéter entre la His109 y la Cys92, en el CuA (Figuras 23 derecha y 28 B).

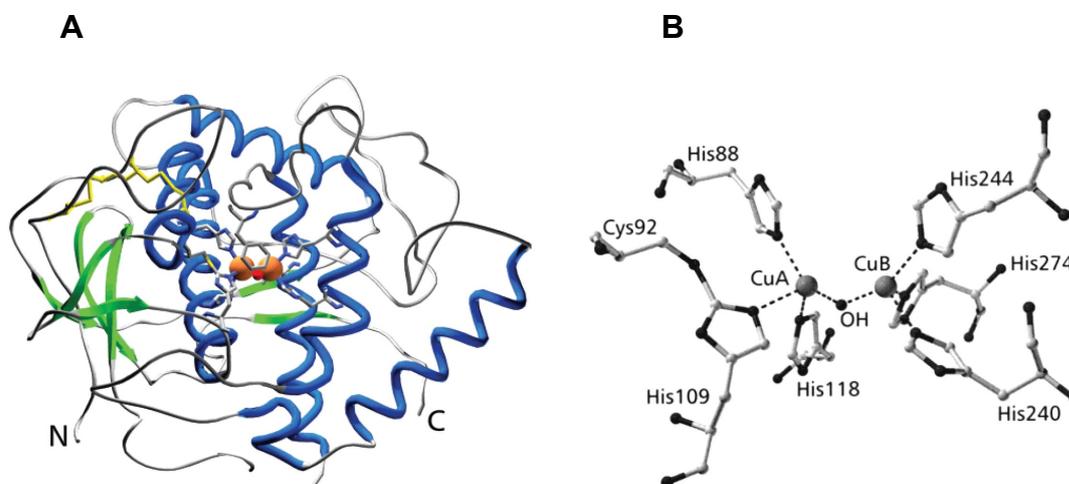


Figura 28. (A) Estructura general de catecol oxidasa de *Ipomoea batatas*. Los átomos de cobre aparecen en color naranja, las hélices α en azul, las láminas β en verde y los puentes disulfuro en amarillo (Gerdemann *et al.*, 2002). (B) Esfera de coordinación del centro binuclear de cobre en la forma *meta* de la enzima (Gerdemann *et al.*, 2002).

Se ha descrito en la bibliografía una posición que cubre el sitio activo, localizada sobre el Cu_A, como residuo bloqueante (Kaintz *et al.*, 2014; Kanteev *et al.*, 2015). En la catecol oxidasa de *Ipomoea batatas*, una fenilalanina voluminosa (Phe261) en esta posición podría dificultar la actividad monofenolasa. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que un glutamato altamente conservado y una asparragina unen y activan una molécula de agua para desprotonar a los monofenoles. La ausencia de la asparragina podría ser la causante de la falta de actividad monofenolasa en catecol oxidasas (Goldfeder *et al.*, 2014; Kanteev *et al.*, 2015; Solem *et al.*, 2016).

Al igual que ocurre en el caso de *S. castaneoglobisporus*, en la enzima de *Ipomoea batatas* se ha visto que tras la oxigenación la distancia entre los iones de cobre disminuye, mientras que la posición de las histidinas permanece constante (Klabunde *et al.*, 1998), lo que indica que, durante la catálisis los estados de oxidación del cobre y su localización cambian.

Se ha observado un motivo conservado C₅₂₂XXC₅₂₅, similar al encontrado en chaperonas de cobre, en el dominio C-terminal, por lo que se ha propuesto que el

papel del dominio C-terminal no solo es controlar la actividad enzimática sino también facilitar el transporte de cobre al sitio activo, al igual que las chaperonas (Fujieda *et al.*, 2013a; Kanteev *et al.*, 2015).

La estructura tridimensional de tirosinasa, o también llamada polifenoloxidasasa, de uva (*Vitis vinifera*), se obtuvo en 2010 (Figura 29) (Virador *et al.*, 2010a; 2010b). Es una estructura monomérica de forma elipsoidal de 38.4 KDa y unas dimensiones de 56.7 x 48.0 x 48.3 Å. Al igual que la enzima de *Ipomoea batatas*, la enzima de uva tiene un sitio activo formado por un haz de cuatro hélices α (α_4 , α_5 , α_{12} y α_{14}) y tres residuos de histidina unidos a cada cobre, His243 (α_{12}), His272 (α_{12}) e His239 (α_{14}), para el Cu_B, y la His87 (α_4), His117 (α_5) e His108 (α_5), para el Cu_A. La His108 se encuentra unida a un residuo de cisteína (Cys91) de forma análoga a como ocurre en la catecol oxidasa de *Ipomoea batatas*.

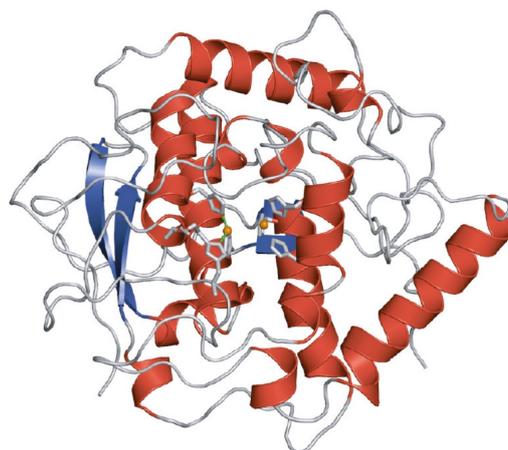


Figura 29. Estructura general de polifenol oxidasa de *Vitis vinifera*. Se muestra la forma elipsoidal con dos láminas β y el centro con dos átomos de cobre dentro de un haz de cuatro hélices (Virador *et al.*, 2010b).

En cuanto a hongos, la enzima más estudiada es la del champiñón *Agaricus bisporus*, cuya estructura tridimensional ha sido recientemente determinada (Ismaya *et al.*, 2011a; 2011b). Esta enzima está formada por la unión de dos heterodímeros HL para formar un tetrámero H₂L₂ (Figura 30 A) (Strothkamp *et al.*, 1976; Ismaya *et al.*, 2011a). Ambas subunidades HL están interconectadas mediante multitud de uniones como puentes salinos y puentes de hidrógeno.

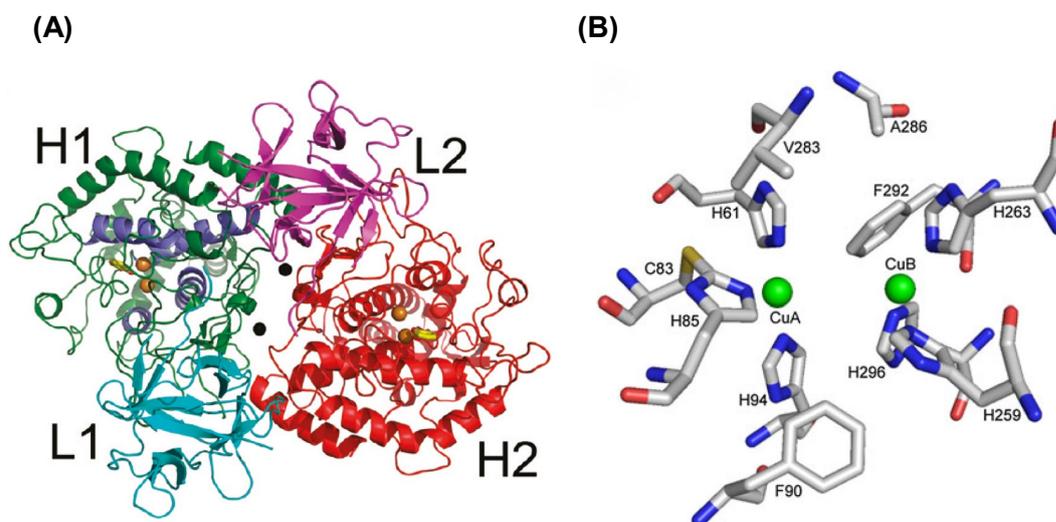


Figura 30. (A) Estructura tetramérica de tirosinasa de *Agaricus bisporus* compuesta por H₂L₂. (Ismaya *et al.*, 2011a). (B) Centro activo de la forma desoxitirosinasa de *Agaricus bisporus*, Protein Data Bank entrada 2Y9W (Fujieda *et al.*, 2013b).

El sitio activo está localizado en el centro de dos parejas de hélices α (α_3 - α_4 y α_{10} - α_{11}), que están enfrentadas una a otra en 90°. Los dos átomos de cobre, que se encuentran dentro de la subunidad H, están coordinados con tres residuos de histidina, His61 (α_3), His85 (entre la α_3 y la α_4) e His94 (α_4), en el caso del Cu_A, y la His259, His263 (ambas en α_{10}) e His296 (α_{11}) con el Cu_B (Figura 30 B). Además, existe un puente tioéter entre la His85 del Cu_A y la Cys83, que se encuentra próxima a este cobre (Figura 30 B). Este sitio activo se encuentra localizado en el fondo de una cavidad hidrofóbica superficial de la enzima, por tanto, esta cavidad está accesible al sustrato y al disolvente.

Se conocen actualmente seis isoenzimas del hongo *Agaricus bisporus* (AbPPO) (Wu *et al.*, 2010; Weijn *et al.*, 2013; Wichers *et al.*, 2003). Wichers y colaboradores, 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 y colaboradores, 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 separan 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, las secuencias 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. Actualmente se encuentran disponibles las estructuras tridimensionales de la tirosinasa activa PPO3 y la latente PPO4 (Isamaya *et al.*, 2011a; 2011b; Mauracher *et al.*, 2014b; 2014c).

En las estructuras de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (AbPPO4) también se ha observado flexibilidad del cobre. En este caso el Cu_A fue estructuralmente estable, mientras que el Cu_B mostró flexibilidad y una conformación adicional junto a un cuarto residuo de histidina (His282) (Mauracher *et al.*, 2014c). Es posible que esta flexibilidad del Cu_B sea debida a la sustitución de una asparragina conservada con un aspártico, Asp252, que no forma interacciones polares con His251 que coordina al Cu_B en el sitio activo (Kanteev *et al.*, 2015).

Recientemente se ha determinado la estructura cristalina de una pro-tirosinasa del hongo *Aspergillus oryzae* a una resolución de 1.39 Å (PDB ID: 3W6W) (Fujieda *et al.*, 2013b).

1.4.1.3. Tirosinasas de artrópodos.

La primera tirosinasa de artrópodos (también llamada fenoloxidasa) cristalizada y cuya estructura tridimensional ha sido determinada es la fenoloxidasa de *Manduca sexta* (Li *et al.*, 2009). En concreto, se ha determinado la estructura de la pro-fenoloxidasa, su precursor inactivo, que pasa a forma activa por proteólisis específica vía una cascada serina proteasa. La pro-fenoloxidasa de *Manduca sexta* es un heterodímero que consiste en dos cadenas polipeptídicas homólogas, PPO1 de 685 aminoácidos y PPO2 de 695 (Jiang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2009) (Figura 31). Existen dos puentes disulfuro en cada monómero.

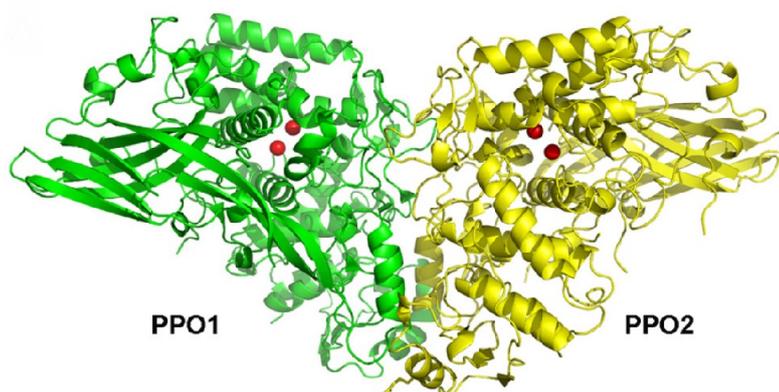


Figura 31. Estructura dimérica tridimensional de la pro-fenoloxidasa de *Manduca sexta* (Li *et al.*, 2009).

Las subunidades PPO presentan una estructura compacta que se puede dividir en cuatro dominios: la región pro, el dominio I no contiguo, dominio II y dominio III. La región pro contiene el sitio de ruptura proteolítica (Arg-51) (Figura 32).

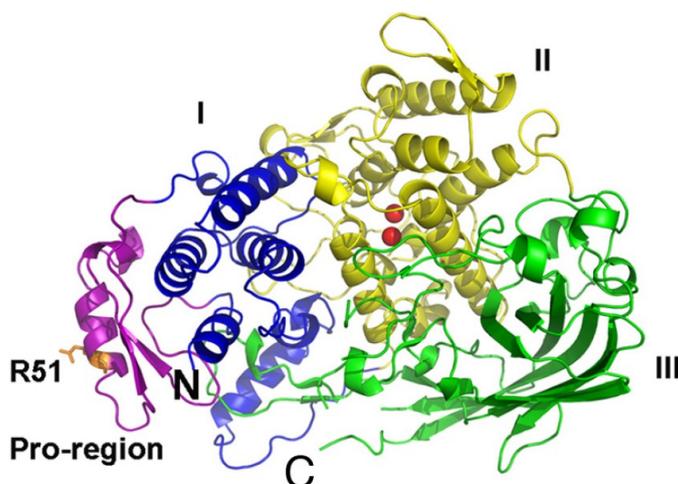


Figura 32. Dominios de la subunidad PPO2 de la pro-fenoloxidasa de *Manduca sexta*. La región pro está representada en color púrpura, el dominio I en azul, dominio II en amarillo y dominio III en verde. Los átomos de cobre se encuentran en el dominio II y están representados como esferas rojas (Li *et al.*, 2009).

El sitio activo de la enzima contiene dos átomos de cobre (Cu_A y Cu_B), cada uno coordinado por tres residuos de histidina. En el primer monómero (PPO1), el Cu_A está coordinado por la His209, His213 e His239, mientras que el Cu_B lo está por His366, His370 e His406. El segundo monómero (PPO2) tiene también otra agrupación binuclear de cobre, donde el Cu_A está coordinado por His215, His219 e His245, mientras que el Cu_B lo está por His368, His372 e His408. En esta enzima, el sitio activo está ocluido en el centro de la enzima, no está expuesto al exterior.

Existe un residuo de fenilalanina conservado en cada subunidad, Phe85 en PPO1 y Phe88 en PPO2, que está considerado como “guardián” para los sustratos fenólicos. Sorprendentemente hay un único residuo glutámico, Glu395, en PPO2 (no está en PPO1), localizado cerca del Cu_A y muy cercano a la Phe88. Estos autores proponen que este Glu395 podría ser el encargado de aceptar el protón proveniente del sustrato monofenólico, lo cual es fundamental para la *orto*-hidroxilación. Esto explicaría por qué sólo el monómero PPO2 presenta actividad monofenolasa (Li *et al.*, 2009).

1.4.1.4. Tirosinasa de mamíferos.

No se tiene mucha información sobre la estructura de tirosinasa de mamíferos. Los estudios realizados se han llevado a cabo por homología de secuencias de aminoácidos entre las tirosinasas de distintos organismos.

La estructura de todas las tirosinasas de mamíferos presenta (Olivares y Solano, 2009):

- (a) Un péptido señal N-terminal, importante en el tráfico y procesado.
- (b) Unos dominios ricos en cisteínas.
- (c) Un segmento transmembrana hidrofóbico C-terminal.
- (d) Una cola citoplasmática corta.

La cola citoplasmática y el segmento transmembranal son necesarios para dirigir la enzima al melanosoma.

En cuanto al sitio activo, podría ser un bolsillo hidrofóbico, dentro de un haz de cuatro hélices α (Figura 33). Existirían dos regiones encargadas de la unión de los átomos de cobre, ricas en histidina, llamadas Cu_A y Cu_B , cada una de las cuales contendría tres residuos de histidina (muy conservados en la escala filogenética). El Cu_A tiene el motivo His-x(n)-His-x(8)-His, y Cu_B tiene el motivo His-x(3)-His-x(n)-His,

siendo n un número variable de residuos. De las histidinas, solo la segunda del Cu_A (localizada en un lazo) sería flexible, las otras cinco histidinas estarían localizadas en fragmentos de hélice α adyacentes (García-Borrón y Solano, 2002; Inoue *et al.*, 2008; Olivares y Solano, 2009).

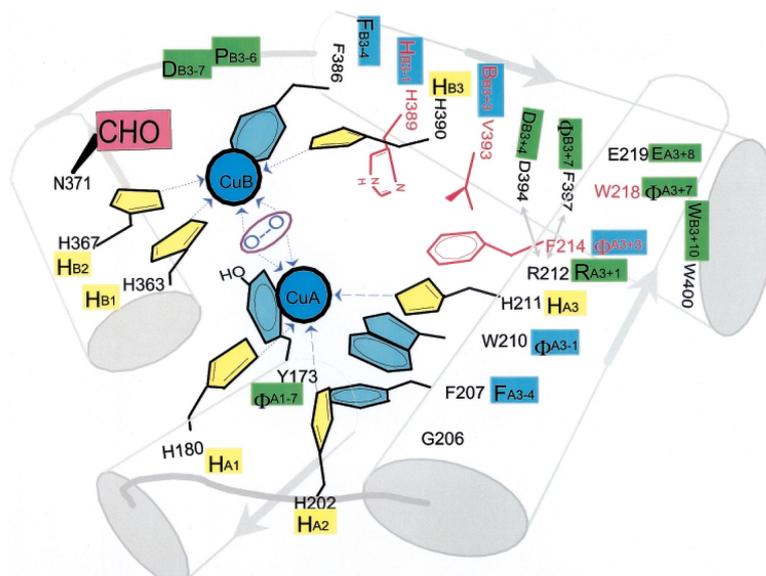


Figura 33. Modelo propuesto para el sitio activo de tirosinasa de mamíferos (García-Borrón y Solano, 2002).

Estudiando mutaciones en el sitio activo de tirosinasa se ha propuesto un modelo tridimensional (Schweikardt *et al.*, 2007). Estos autores concluyen que además de las seis histidinas coordinadas a los dos cobres, existen otros aminoácidos importantes. Debido a la estrecha homología entre la tirosinasa de ratón (mTir) y la 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.

Las tirosinasas de mamíferos reciben los cobres de chaperonas y transportadores que usan motivos de cisteína y metionina para la incorporación de los cobres (Wang y Hebert, 2006; Robinson y Winge, 2010).

1.4.2. Estados de oxidación del cobre del sitio activo.

El estado del cobre del sitio activo ha sido objeto de mucha discusión, desde que se descubriera como el cofactor de la enzima (Kubowitz, 1938). Actualmente, está aceptado que existen tres formas enzimáticas de tirosinasa, dependiendo del estado de oxidación del cobre: metatirosinasa, oxtirosinasa y desoxitirosinasa.

Metatirosinasa (E_m , Figura 34)

Forma enzimática completamente diamagnética que presenta los cobres en estado de oxidación Cu^{2+} (Makino *et al.*, 1974). Esta forma presenta absorción en la región visible del espectro y dicroísmo circular. Por analogía con metahemocianina (Solomon *et al.*, 1996), el modelo estructural propuesto para metatirosinasa se puede describir como dos iones Cu^{2+} tetragonales unidos por un puente endógeno de proteína.

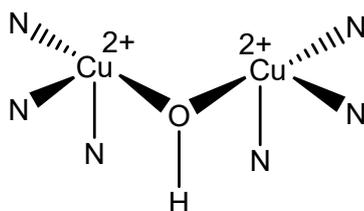


Figura 34. Sitio activo de la forma metatirosinasa.

Oxtirosinasa (E_{ox} , Figura 35)

Esta forma presenta un máximo de absorción a 345 nm (Makino *et al.*, 1974) que desaparece en presencia de sustratos monofenólicos y *o*-difenólicos, indicando que oxtirosinasa es un intermedio catalítico. Se puede obtener a partir de las otras formas enzimáticas mediante la adición de peróxido de hidrógeno a la forma metatirosinasa, o mediante la unión reversible de una molécula de oxígeno a la forma desoxitirosinasa. Recientemente se han descrito algunas propiedades del sitio activo de tirosinasa en su forma oxi, mediante modelado molecular con ordenador (Deeth y Diedrich, 2010). Esta forma tiene un grupo peróxido unido a los cobres, que tienen estado de oxidación Cu^{2+} .

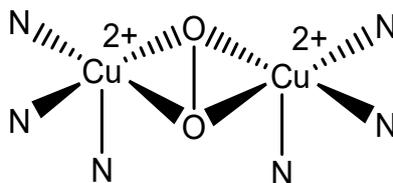


Figura 35. Sitio activo de la forma oxitirosinasa.

Desoxitirosinasa (E_d , Figura 36)

En esta forma los cobres se encuentran en estado de oxidación Cu^+ . En un estudio reciente se ponen de manifiesto algunas propiedades de la desoxitirosinasa obtenida en condiciones anaerobias (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010a). Se demostró experimentalmente la existencia de una transición lenta, desde una desoxitirosinasa relajada hasta una forma tensa donde, probablemente debido a la repulsión de cargas, hay una separación de los iones cobre desde 3.5 Å, existente en la forma relajada, hasta 4.6 Å en la forma tensa, por analogía con desoxihemocianina (Metz y Solomon, 2001). Así, en tiorosinasa de *Agaricus bisporus*, se ha propuesto que ocurre una transición similar (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010a).

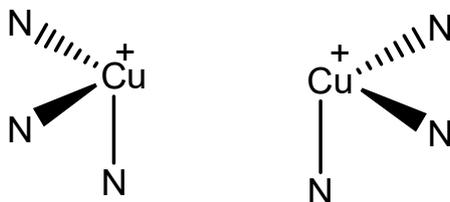


Figura 36. Sitio activo de la forma desoxitirosinasa.

Forma inactiva de la enzima (Figura 37)

Se ha descrito una cuarta forma inactiva de la enzima en base al estado de oxidación de los cobres del centro activo. Cuando un *o*-difenoil se une a la forma oxitirosinasa se produce la transferencia de un protón del grupo hidroxilo del C-1 al peróxido del sitio activo, y el fenolato ataca a un átomo de cobre. A partir de aquí existe la posibilidad de que el hidroxilo del C-2 ceda un protón al peróxido protonado, permaneciendo como C-O^- . La coplanaridad del anillo del sustrato, el oxígeno del C-1

y el átomo de cobre favorecen la oxidación simultánea del sustrato a *o*-quinona y la reducción de un átomo de Cu^{2+} a cobre (0) a través del anillo, mientras el Cu (0) y el peróxido de hidrógeno son liberados y la enzima es inactivada como consecuencia (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010c; 2012a). Este proceso se explicará en mayor detalle en el apartado 1.7 de regulación enzimática de tirosinasa.

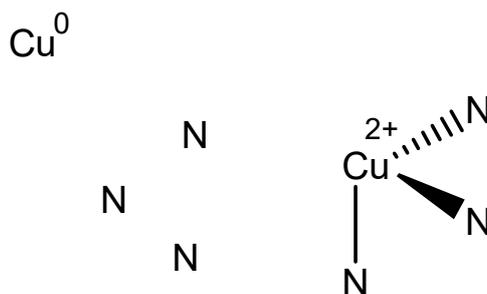


Figura 37. Sitio activo de la forma inactiva de tirosinasa.

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).

Las tres formas enzimáticas metatirosinasa, desoxitirosinasa y oxitirosinasa están relacionadas en el ciclo catalítico de la enzima como se muestra en la Figura 38 (Jackman *et al.*, 1992).

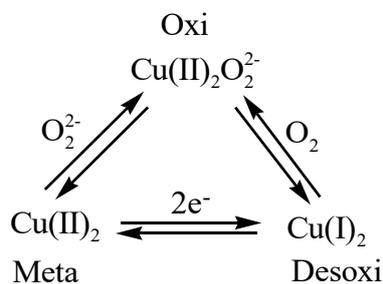


Figura 38. Equilibrio entre las formas meta, desoxi y oxi de tirosinasa (Jackman *et al.*, 1992).

1.5. ACTIVIDADES CATALÍTICAS DE TIROSINASA.

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

Los primeros estudios sobre tirosinasa pusieron de manifiesto la actividad difenolasa en todas las fuentes biológicas, por el contrario, esto no ocurrió para la actividad monofenolasa, más específica y complicada. Estos estudios llegaron a a la conclusión errónea de que estas enzimas eran 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). Nuestro grupo de investigación identificó y caracterizó correctamente por primera vez la actividad monofenolasa de tirosinasa de distintas frutas y hortalizas (Espín *et al.*, 1995; 1996; 1998a; 1998b; 1998c).

Estudios estructurales de tirosinasa de *Agaricus bisporus* demostraron que el sitio activo de la enzima se encuentra en la superficie y posee una cavidad amplia, por lo que gran cantidad de moléculas análogas a los sustratos fundamentales pueden acceder a él, 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).

Debido a su baja especificidad de sustrato, tirosinasa presenta gran cantidad de actividades (además de la monofenolasa y difenolasa), entre las que destacan:

- Actividad ascorbato oxidasa: oxida ácido ascórbico a dehidroascórbico (Ros *et al.*, 1995; 1996; Espín *et al.*, 2000a; Muñoz-Muñoz *et al.*, 2009a).
- Actividad catalasa: descompone el peróxido de hidrógeno (Yamazaki *et al.*, 2004; García-Molina *et al.*, 2005a).
- Oxidación de tetrahidropterinas (García-Molina *et al.*, 2007b; 2009; 2010a; Muñoz-Muñoz *et al.*, 2011a).
- Oxidación de NADH (García-Molina *et al.*, 2010b).
- Oxidación del ácido tetrahidrofólico (García-Molina *et al.*, 2011).

este proceso están implicados dos electrones), reduciéndose el Cu^{2+} a Cu^{1+} y originándose la forma enzimática desoxitirosinasa. En la siguiente etapa la desoxitirosinasa reacciona con el oxígeno molecular y forma oxitirosinasa, volviendo los cobres del centro activo al estado de oxidación Cu^{2+} . Finalmente, la oxitirosinasa une otra molécula de *o*-difenoil que se oxida a *o*-quinona, el peróxido de hidrógeno del sitio activo se reduce a agua y la enzima se regenera como metatirosinasa, cerrando el ciclo catalítico (Esquema 7). Cuando el sustrato *o*-difenílico es L-dopa (sustrato fisiológico de la enzima), dos moléculas de la *o*-quinona generada (*o*-dopaquinona), dan lugar a una molécula de *o*-difenoil y una molécula de dopacromo (etapas no enzimáticas, Esquema 7).

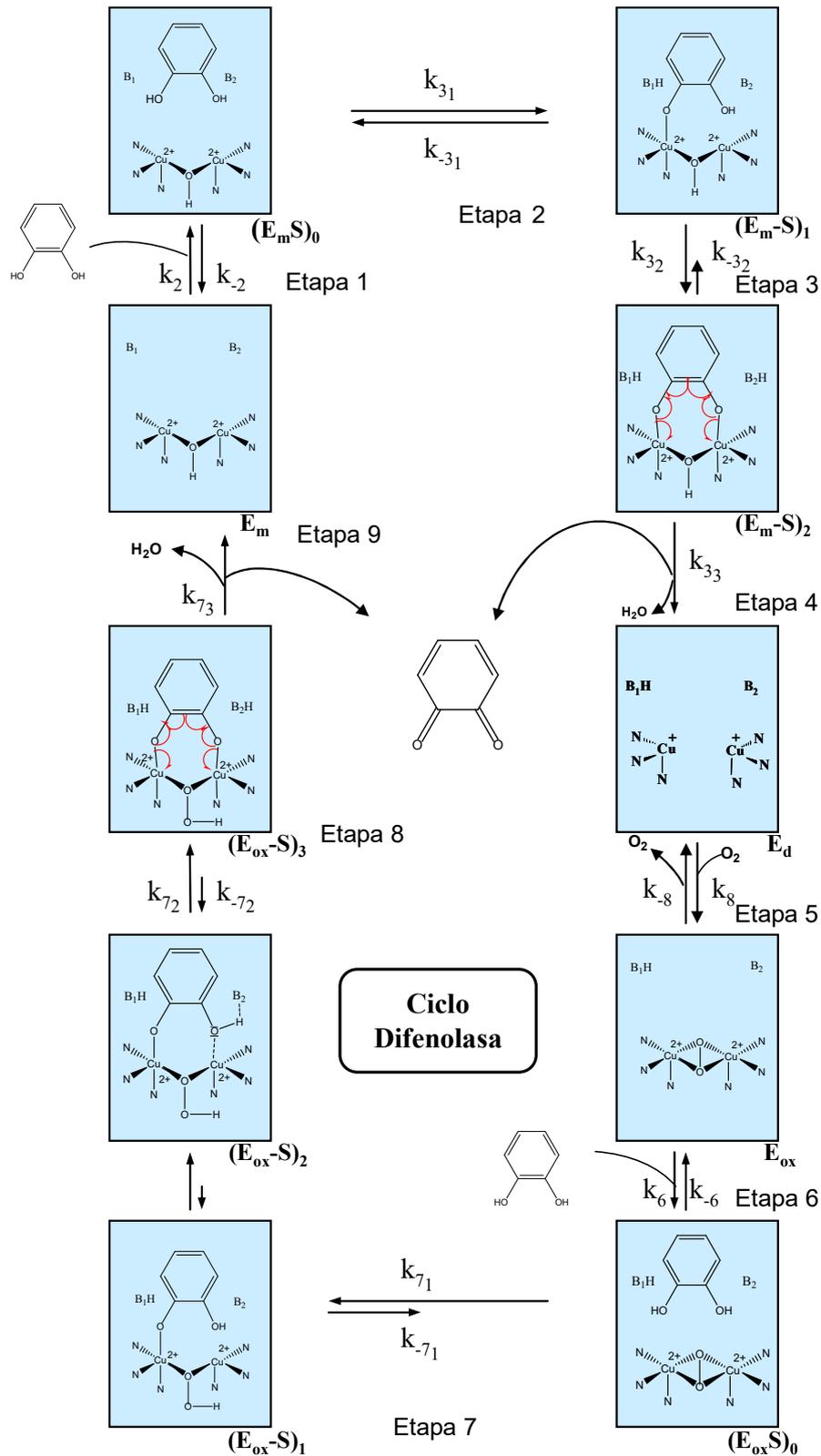
La etapa determinante del proceso catalítico es la controlada por k_7 , como se ha demostrado por estudios de efecto isotópico (Peñalver *et al.*, 2003; Fenoll *et al.*, 2004a). Los *o*-difenoles son mejores nucleófilos que los monofenoles, lo que repercute en una mayor rapidez de catálisis. La afinidad de unión de los distintos sustratos comprende, en cambio, etapas de enlace y transformación.

La cadena lateral y la hidrofobia o hidrofilia de los sustratos *o*-difenílicos es importante para el acceso de los mismos al sitio activo de oxitirosinasa. La importancia del impedimento estérico se pone de manifiesto mediante el cálculo de k_6 , la constante de unión a oxitirosinasa (Rodríguez-López *et al.*, 2000a). Los datos obtenidos mediante estudios de estado estacionario y fase de transición muestran que los *o*-difenoles se unen con mayor rapidez a la forma metatirosinasa que a la oxitirosinasa ($k_2 \gg k_6$) (Rodríguez-López *et al.*, 2000a). Esto podría deberse a la existencia de una base desprotonada en la forma metatirosinasa, que capta un protón del grupo hidroxilo del sustrato, mientras que en la oxitirosinasa debe transferirse 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 la forma metatirosinasa se encuentran en estado de oxidación Cu^{+2} y por lo tanto, son más positivos que en la forma oxitirosinasa y el ataque del fenolato está más favorecido (Etapas 2 y 7, Esquema 8).

La constante catalítica de tirosinasa con respecto a sus sustratos *o*-difenílicos es variable (Solomon *et al.*, 1996; Espín *et al.*, 2000b; Rodríguez-López *et al.*, 2000a). Los sustratos sin cadena lateral tienen la constante catalítica más alta, seguidos por

los *o*-difenoles con cadena lateral hidrofóbica y, posteriormente, por los de cadena lateral hidrofílica.

Se ha demostrado mediante estudios cristalográficos que las histidinas axiales están en posición *cis* (Decker *et al.*, 2006; Deeth y Diedrich, 2010; Sendovski *et al.*, 2011). Las histidinas unidas a los cobres son rígidas y su enlace no se rompe en la catálisis, por lo que se postula la existencia de dos bases capaces de aceptar los protones del *o*-difenol en el sitio activo (Etapas 3 y 8, Esquema 8). Además, esta hipótesis está apoyada por estudios recientes en los que se demuestra la existencia de dos pK_{as} cinéticamente significativos en el sitio activo de la enzima (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010a; 2012a).



Esquema 8. Mecanismo estructural propuesto para la actividad difenolasa de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2012a).

Como se puede observar en el mecanismo estructural propuesto por nuestro grupo de investigación (Esquema 8), en la Etapa 1 el *o*-difenol se une a la forma metatirosinasa (E_m), probablemente formando un enlace por puente de hidrógeno con la base B_1 . Posteriormente, en la Etapa 2, el sustrato se une a uno de los átomos de cobre en posición axial, quizás al Cu_A (Goldfeder *et al.*, 2014) y se transfiere un protón a un residuo proteico B_1 . La Etapa 3 consiste en la coordinación bidentada del *o*-difenol y está acompañada de una segunda transferencia de protón, probablemente a una segunda base B_2 , próxima al Cu_B . Esta unión bidentada explicaría que la enzima no sea capaz de oxidar a los *p*-difenoles. En la Etapa 4, se produce la transferencia electrónica a partir del *o*-difenol y se forma la *o*-quinona y la forma enzimática desoxitirosinasa (E_d). Posteriormente, en la Etapa 5, se une el oxígeno en el plano ecuatorial de los cobres dando lugar a la forma oxitirosinasa (E_{ox}), en la cual el peróxido está coordinado a los dos iones de cobre oxidados, Cu^{2+} . En las Etapas 6 y 7 una segunda molécula de *o*-difenol se une a la forma oxitirosinasa, coordinándose con uno de los iones de cobre del sitio activo y transfiriéndose un protón al grupo peróxido (Etapa 7). Esto 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). Esta coordinación se ha propuesto que se produce de manera diaxial, puesto que el plano ecuatorial estaría ocupado por el peróxido. Para la coordinación bidentada del *o*-difenol se transfiere un segundo protón, por transferencia a una segunda base B_2 próxima al Cu_B , 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_{as} en la enzima (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010a; 2012a). En la Etapa 8, la transferencia electrónica del *o*-difenol al grupo peróxido origina la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno, la formación de una molécula de agua y la correspondiente *o*-quinona, regenerándose la forma enzimática metatirosinasa (Etapa 9). En esta última etapa, los residuos proteicos B_1 y B_2 actúan como ácidos proporcionando los protones necesarios para la liberación de la molécula de agua. A altas concentraciones de *o*-difenol surgen desviaciones de la cinética Michaeliana (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010d; 2011c).

1.5.2. Actividad monofenolasa.

Se trata de la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles. Esta actividad ha sido muy estudiada (Mason, 1956; Osaki, 1963; Vanneste y Zubersbühler, 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.*, 2002; Fenoll *et al.*, 2004b).

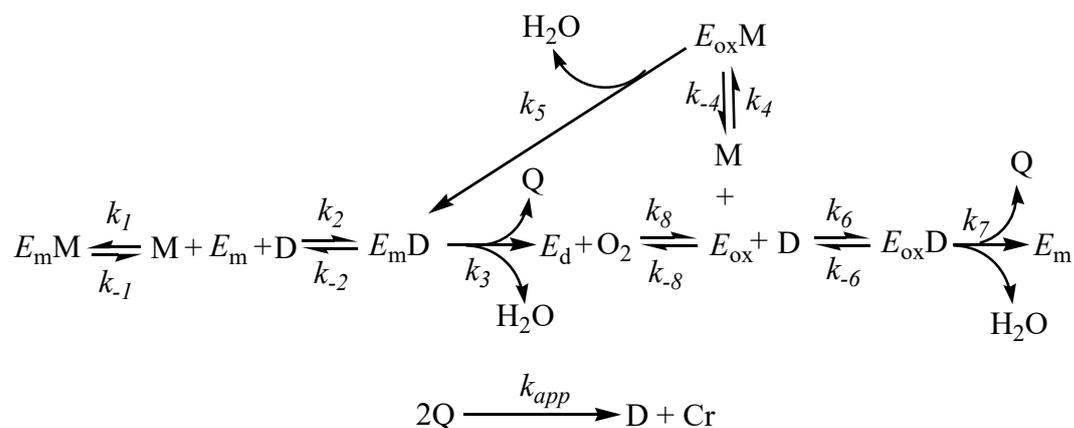
La actividad monofenolasa se expresa junto a la difenolasa, ya que el *o*-difenol producto de su actividad es sustrato en la difenolasa. Del mismo modo, las etapas no enzimáticas desde *o*-quinona hasta aminocromo son las mismas en ambas actividades.

Existe un período de retardo característico de esta actividad, en la acumulación del producto dopacromo antes de llegar al estado estacionario (Pomerantz, 1966; Duckworth y Coleman, 1970; García-Molina *et al.*, 2005b; 2005c), que depende de la naturaleza y concentración tanto de la enzima como del sustrato. Nuestro grupo de investigación ha establecido el significado del período de retardo y ha obtenido una expresión analítica aproximada para cuantificarlo (Rodríguez-López *et al.*, 1992b; Fenoll *et al.*, 2001; García-Molina *et al.*, 2007a). La presencia de *o*-difenoles y 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 ácido tetrahidrofólico (García-Molina *et al.*, 2011) pueden eliminar el período de retardo.

El Esquema 9 y el Esquema 10 muestran el mecanismo cinético y el estructural, respectivamente, propuestos para las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa.

En la actividad monofenolasa, la forma oxirosinasa reacciona con un monofenol, forma un complejo ternario ($E_{ox}M$) y se hidroxila el monofenol a *o*-difenol (E_mD). En este punto puede que el *o*-difenol: (1) se oxide a *o*-quinona dando lugar a la forma desoxitirosinasa, o (2) se libere, liberando al mismo tiempo la forma metatirosinasa (Mason, 1956; Fenoll *et al.*, 2001; Muñoz-Muñoz *et al.*, 2012b). En el primer caso la desoxitirosinasa se une rápidamente a oxígeno dando lugar a la forma oxirosinasa, mientras que en el segundo, la metatirosinasa se une a otra molécula de *o*-difenol oxidándolo a *o*-quinona y liberando desoxitirosinasa, que se une a oxígeno y vuelve a dar lugar a la forma oxi de la enzima. La necesidad de mantener un nivel adecuado de *o*-difenol en el estado estacionario de la actividad monofenolasa para

poder realizar la hidroxilación, hace pensar que el *o*-difenol actúa como un cosustrato en lugar de un activador (Cabanés *et al.*, 1987a; Rodríguez-López *et al.*, 1992b; Ros *et al.*, 1994a; 1994b). Cuando la enzima actúa sobre monofenoles, necesita acumular una cantidad determinada de su *o*-difenol correspondiente, de tal forma que debe cumplirse la relación $R = [D]_{ss} / [M]_{ss}$ (Rodríguez-López *et al.*, 1992b; 2001; Ros *et al.*, 1993a; 1993b; 1994a). En esta situación, la enzima realiza dos ciclos en la ruta monofenolasa por uno en la difenolasa, de tal manera que la concentración de *o*-difenol no varía (Fenoll *et al.*, 2001; Peñalver *et al.*, 2005).



Esquema 9. Mecanismo cinético propuesto para la actividad monofenolasa y difenolasa de tirosinasa de *Agaricus bisporus*. E_m = metatirosinasa, E_d = desoxitirosinasa, E_{ox} = oxitirosinasa, D = *o*-difenol, M = monofenol, Q = *o*-quinona, Cr = dopacromo (Rodríguez-López *et al.*, 1992b).

Según el mecanismo estructural propuesto en el Esquema 10, cuando el monofenol se enlaza a la forma oxitirosinasa (Etapa 13) se produce la desprotonación del monofenol, transfiriendo el protón del grupo hidroxilo del C-4 al peróxido (Etapa 14) y posteriormente, se une en axial al átomo de cobre, probablemente al Cu_A (Goldfeder *et al.*, 2014). A continuación, el oxígeno del peróxido lleva a cabo un ataque electrofílico al anillo en C-3, dando lugar a un intermedio $(E_m - D)_3$, en el cual el *o*-difenoil está unido en axial/ecuatorial. En este punto, debido a la falta de coplanaridad de los orbitales, la oxidación / reducción no se puede producir y el *o*-difenoil puede romper el enlace con el cobre Cu_A (Etapa 16), originando la especie $(E_m - D)_4$. A partir de $(E_m - D)_4$ se puede originar la especie $(E_m - D)$ que es un intermedio de la actividad difenolasa. Por otro lado, la especie $(E_m - D)_3$ puede romper el enlace con el cobre Cu_B (Etapa 17), dando lugar al intermedio $(E_m - D)$ que conecta con el ciclo difenolasa. Un punto muy importante de este mecanismo es que a partir del intermedio $E_m - D$ se puede liberar *o*-difenoil al medio (Etapa 1).

En la ruta muerta, la forma enzimática metatirosinasa une al monofenol y forma el complejo E_mM , pero como no tiene oxígeno no puede reaccionar. Esta unión es reversible.

1.5.3. Estereoespecificidad de las actividades monofenolasa y difenolasa.

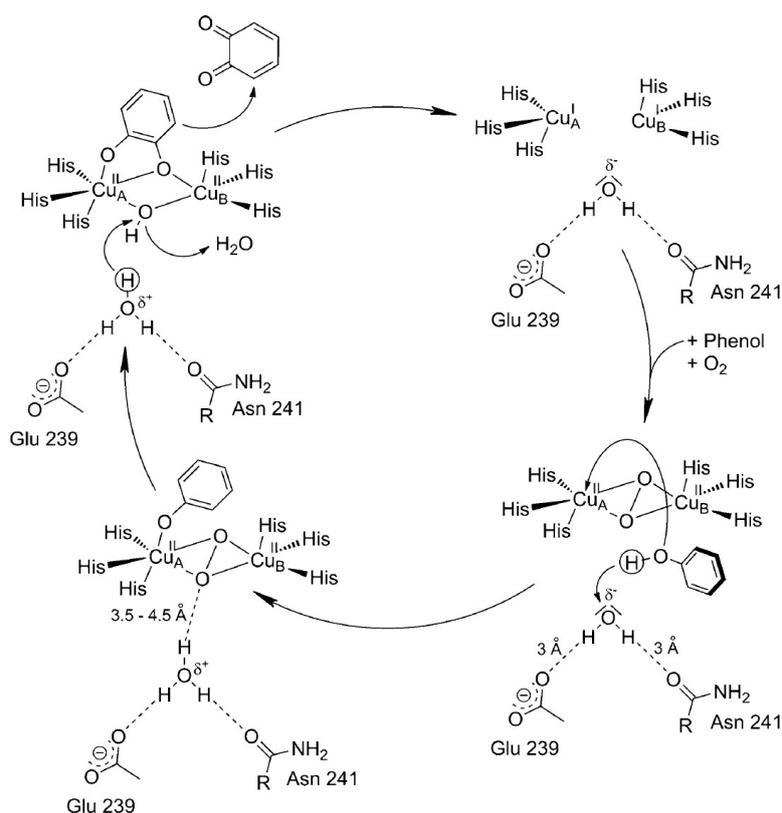
Tirosinasa muestra estereoespecificidad de enlace. La constante de Michaelis para los isómeros L es menor que para los isómeros D, sin embargo, la rapidez de catálisis es la misma. Por otro lado, para los dos isómeros los valores de los desplazamientos químicos de los carbonos 3 y 4 del sustrato son los mismos, 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). En cuanto 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).

1.5.4. Diferencias entre catecol oxidasas y tirosinasas.

Tanto las tirosinasas como las catecol oxidasas se denominan polifenoloxidasas (van Holde *et al.*, 2001). Estas enzimas tienen sitios activos similares con dos átomos de cobre (Cu_A y Cu_B), que están coordinados por seis histidinas. Como se ha comentado en apartados anteriores, tirosinasa es capaz de hidroxilar monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y posteriormente oxida estos últimos a *o*-quinonas (actividad difenolasa). Sin embargo, las catecol oxidasas solo pueden llevar a cabo la reacción de oxidación (actividad difenolasa) (Rolff *et al.*, 2011). Aunque este hecho tiene gran importancia biológica, médica y económica, la base molecular de la discriminación funcional entre tirosinasa y catecol oxidasas no está clara (Olivares y Solano, 2009; Rolff *et al.*, 2011; Goldfeder *et al.*, 2014; Kanteev *et al.*, 2015).

En un estudio reciente, el grupo de Fishman presentó estructuras cristalizadas de tirosinasa de *Bacillus megaterium* con y sin sustrato monofenólico y difenólico unido (Goldfeder *et al.*, 2014; Kanteev *et al.*, 2015). Se sugirió que un glutamato altamente conservado y una asparragina unen y activan una molécula de agua que ayuda a la desprotonación de monofenoles, etapa necesaria para que tirosinasa actúe sobre estos sustratos. Esta hipótesis ha sido experimentalmente probada, por primera vez, por Solem y colaboradores (Solem *et al.*, 2016). Estos autores demuestran que una polifenoloxidasas que presenta actividad difenolasa puede ser transformada en una tirosinasa (con las dos actividades) por una mutación que introduzca una asparragina. Tanto la asparragina como el glutamato conservado son necesarios para orientar el agua conservada para extraer el protón del monofenol y que tenga lugar la actividad monofenolasa (Esquema 11). En ausencia de la asparragina, solo se observa actividad difenolasa. Estos resultados proporcionan evidencias directas de la importancia crucial de la desprotonación para la actividad de tirosinasa.

Nuestro grupo de investigación en cambio sugiere, que la función de la tríada Glu-H₂O-Asn no es extraer el protón del monofenol, sino orientar al sustrato y por otro lado potenciar la nucleofilia del oxígeno del grupo hidroxilo. El oxígeno atacaría al cobre y el protón se transferiría al peróxido, no al agua, como se puede ver en el mecanismo descrito en el Esquema 10.



Esquema 11. Desprotonación de un sustrato fenólico en el ciclo catalítico de tirosinasa (Solem *et al.*, 2016).

1.5.5. Acción de tirosinasa sobre *meta*-difenoles y *para*-difenoles.

Como se ha comentado en apartados anteriores, tirosinasa solo muestra actividad difenolasa sobre *orto*-difenoles. Sin embargo, si el sustrato fenólico es un *meta* o un *para*-difenol y la estructura de la molécula lo permite, podría ser hidroxilado por la enzima (actividad monofenolasa), como si se tratara de un monofenol.

De las tres formas enzimáticas libres de tirosinasa (E_m , E_d y E_{ox}), solamente oxitirosinasa es capaz de hidroxilar a los monofenoles. Cuando metatirosinasa se une a un monofenol entra en la ruta muerta (como no tiene oxígeno no puede reaccionar), y en cuanto a la forma desoxitirosinasa, se une al oxígeno molecular para dar oxitirosinasa. Por lo tanto, para que la enzima muestre actividad monofenolasa, la presencia de la forma enzimática E_{ox} es necesaria.

Cuando tirosinasa actúa sobre L-tirosina (sustrato fisiológico de la enzima), se regenera *o*-difenol (L-dopa) en el medio a partir de la *o*-dopaquinona (Fenoll *et al.*, 2001), de manera que se produce la forma E_{ox} de manera continua y el sustrato

monofenólico puede ser hidroxilado. Sin embargo, si la enzima actúa sobre *m*-difenoles o *p*-difenoles hidroxilándolos, se genera un compuesto trihidroxilado, que puede ser: (a) liberado al medio, donde rápidamente evolucionaría, o (b) oxidado a hidroxi-*o*-quinona, que isomerizaría de forma espontánea a hidroxi-*p*-quinona (Grundmann, 1977; Kuttyrev y Moskva, 1991), más estable (Patai y Rappoport, 1988; Smith, 2013). En cualquier caso, no se acumularía *o*-difenoel en el medio, no se regeneraría la forma E_{ox} y la catálisis se detendría.

Aunque en la forma nativa de la enzima existe una mezcla de E_m y E_{ox} (entre el 2-30% de forma oxitirosinasa) (Lerch, 1981), cuando la forma E_{ox} hidroxila al compuesto (monofenol, *p*-difenoel o *m*-difenoel), se transforma en E_m (inactiva sobre este tipo de moléculas).

La actividad monofenolasa de tirosinasa sobre *m*-difenoles o *p*-difenoles (no acumulan *o*-difenoel) se puede conseguir añadiendo al medio de reacción distintos compuestos (Jiménez y García-Carmona, 1996; García-Molina *et al.*, 2012; 2013; 2014a; 2014c):

(a) Un reductor, como el ácido ascórbico, que transforma la forma E_m en E_d que con oxígeno genera E_{ox} .

(b) Peróxido de hidrógeno, que transforma la forma E_m en E_{ox} .

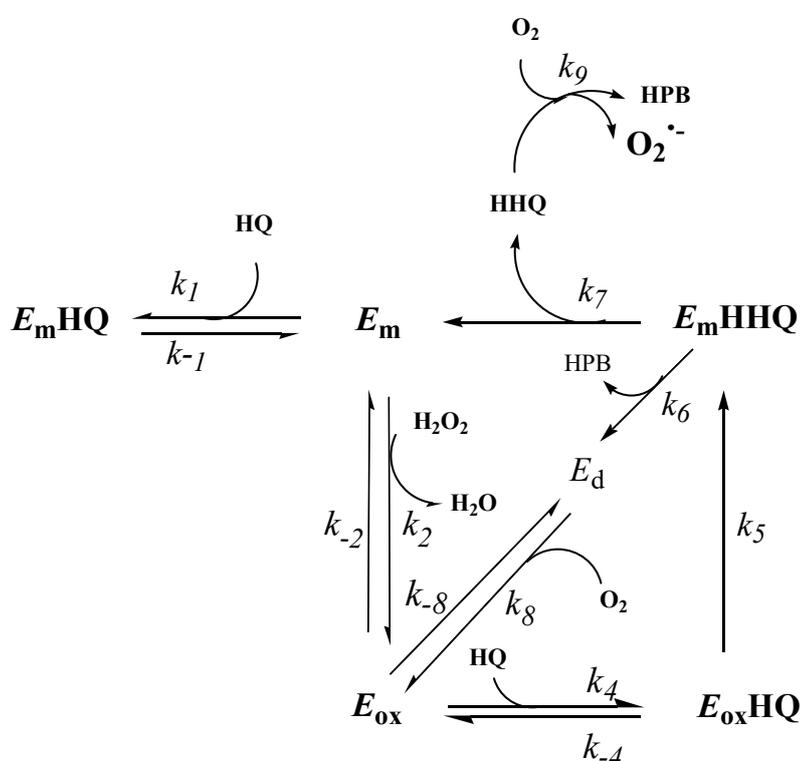
(c) Concentraciones catalíticas de *o*-difenoel, para transformar la forma E_m en E_d que con oxígeno da lugar a E_{ox} , y un reductor como el ácido ascórbico o el NADH para mantener la cantidad de *o*-difenoel constante en el medio y que de este modo se pueda generar de forma continua la forma enzimática E_{ox} .

Con ayuda de estos tres métodos, nuestro grupo de investigación ha identificado como sustratos alternativos de tirosinasa algunos compuestos que habían sido descritos como inhibidores en la bibliografía. Estos compuestos, al no acumular *o*-difenoel y agotarse la forma E_{ox} en el medio de reacción, aparentemente no eran hidroxilados por tirosinasa, no se observaba actividad, pero utilizando estos tres métodos, se demostró su acción sobre ellos. Este es el caso de hidroquinona (*p*-difenoel) (García-Molina *et al.*, 2014a; 2014c), y hexilresorcinol y oxiresveratrol (*m*-difenoles), cuyo estudio se muestra en los artículos que componen esta memoria.

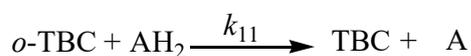
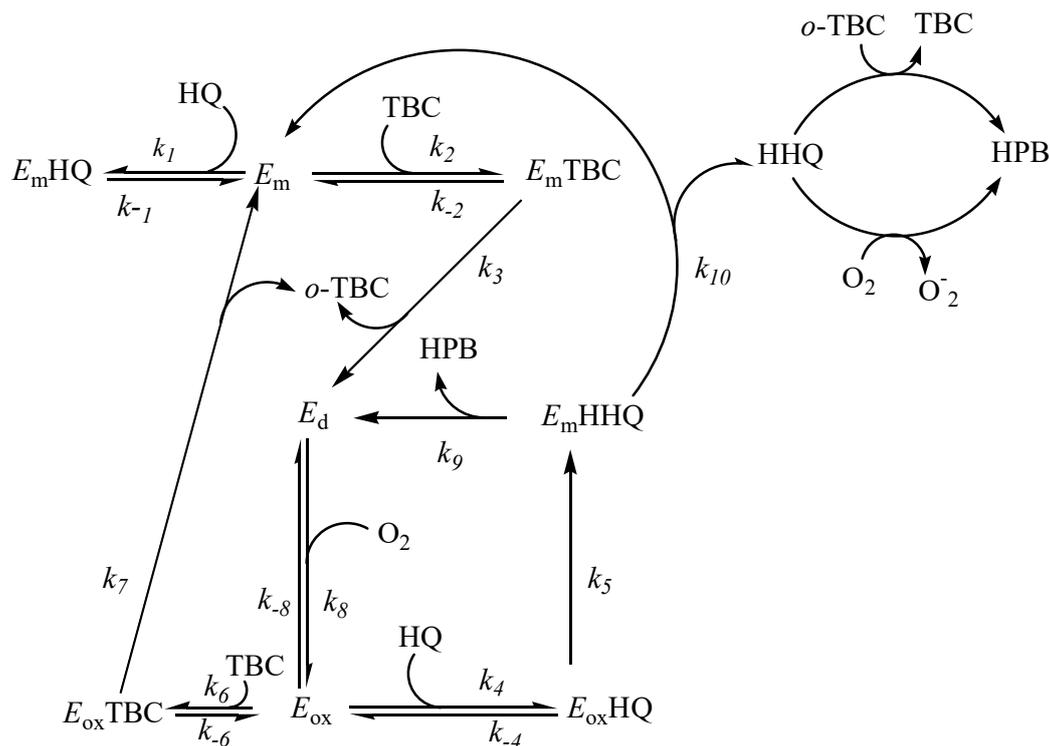
El ácido ascórbico y otros reductores como el NADH pueden ser usados en estos ensayos gracias a la imposibilidad de los mismos para reducir el producto de reacción, en este caso una *p*-quinona. Cuando se utiliza *o*-difenoel catalítico y un

reductor, por ejemplo *o*-*tert*-butilcatecol y ácido ascórbico, éste último reduce la *o*-*tert*-butilquinona, de esta manera genera de forma continua el *o*-difenol. Sin embargo, si también reduce el producto de la reacción del compuesto bajo estudio, no podría ser usado.

En los Esquemas 12, 13, y 14, se muestra la acción de tirosinasa sobre hidroquinona (HQ) en presencia de peróxido de hidrógeno, *o*-*tert*-butilcatecol y ácido ascórbico y finalmente ácido ascórbico.



Esquema 12. Acción de tirosinasa sobre HQ en presencia de H_2O_2 . E_m , metatirosinasa; E_d , desoxitirosinasa; E_{ox} , oxirosinasa; HQ, hidroquinona; HHQ, 2-hidroxi-*p*-benzoquinona; HPB, 2-hidroxi-*p*-benzoquinona. (García-Molina *et al.*, 2014a).



Esquema 13. Acción de tirosinasa sobre hidroquinona en presencia de *o*-difenol catalítico. E_m , metatirosinasa; E_d , desoxitirosinasa; E_{ox} , oxitirosinasa; HQ, hidroquinona; HHQ, 2-hidroxi-hidroquinona; HPB, 2-hidroxi-*p*-benzoquinona; TBC, 4-*tert*-butilcatecol; *o*-TBC, *o*-*tert*-butilquinona; AH_2 , ácido ascórbico; A, ácido dehidroascórbico (García-Molina *et al.*, 2014c).

1.6. REGULACIÓN ENZIMÁTICA DE TIROSINASA.

La actividad de la enzima tirosinasa se puede regular de distintas formas, mediante la acción de inhibidores o inactivadores de forma externa, o bien de manera interna (inactivación suicida).

1.6.1. Inhibidores.

La identificación de los inhibidores de tirosinasa es confusa ya que, en la mayoría de los casos, estas moléculas se estudian midiendo espectrofotométricamente la acción de la enzima sobre L-tirosina o L-dopa en presencia del compuesto de interés. En muchos casos, en lugar de una interacción verdadera enzima / inhibidor, la ruta de biosíntesis de melaninas se puede desviar por distintos mecanismos. De este modo, los inhibidores de tirosinasa se pueden clasificar de forma experimental en los siguientes tipos:

- Agentes reductores como el ácido ascórbico, que producen la reducción de *o*-dopaquinona a L-dopa, impidiendo, por tanto, la formación de dopacromo.

- Compuestos que eliminan *o*-dopaquinona, reaccionando con esta y formando compuestos coloreados. Este es el caso de compuestos tiólicos como la cisteína, que forma un aducto con la *o*-quinona ralentizando la formación de eumelaninas hasta que se consume.

- Sustratos alternativos de la enzima. En este caso encontramos a los compuestos fenólicos que, actuando como sustratos de tirosinasa, dan lugar a un producto quinónico que absorbe en una longitud de onda distinta a la de dopacromo. Cuando la enzima tiene alta afinidad por estos compuestos, la velocidad de formación de dopacromo disminuye y son clasificados erróneamente como inhibidores.

- Inactivadores no específicos. Este es el caso de los ácidos y bases, que desnaturalizan a la enzima de forma inespecífica, inactivándola.

- Inactivadores específicos. 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.

- Inhibidores específicos de tirosinasa. Son aquellos inhibidores que se unen reversiblemente a la enzima reduciendo su actividad catalítica.

De todos estos tipos de inhibidores, solo los dos últimos se pueden considerar 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) competitivos, (b) acompetitivos, (c) mezcla y (d) no competitivos. El ácido kójico, (Cabanés *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1991), la tropolona (Espín y Wichers, 1999) y la L-mimosina (Cabanés *et al.*, 1987b) son considerados inhibidores clásicos de referencia de tirosinasa (Figura 39).

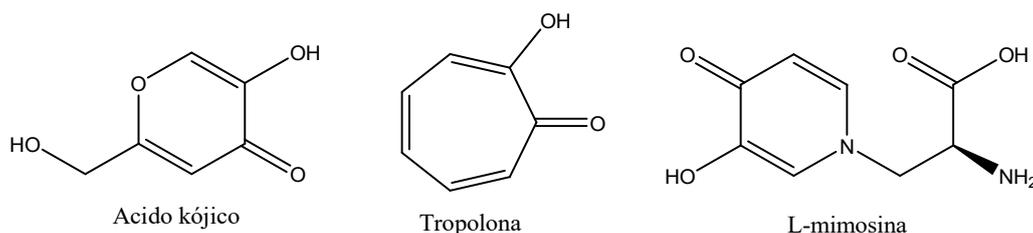


Figura 39. Estructuras químicas de los inhibidores clásicos de referencia de la enzima tirosinasa: ácido kójico, tropolona y L-mimosina.

Hasta el momento, se han aislado e identificado un gran número de inhibidores tanto de fuentes naturales como sintéticos (Rescigno *et al.*, 2002; Solano *et al.*, 2006; Parvez *et al.*, 2007; Chang, 2009; Peng *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Sardana y Ghunawat, 2015; Ullah *et al.*, 2016).

Los inhibidores de tirosinasa se pueden clasificar en 5 clases principales: (1) polifenoles, (2) derivados del benzaldehído y del benzoato, (3) lípidos (triacilglicéridos) de cadena larga y esteroides, (4) péptidos y (5) inactivadores (inactivadores suicidas e inhibidores irreversibles).

1.6.1.1. Polifenoles.

Representan un grupo muy diverso. Los polifenoles pueden ser considerados sustratos o inhibidores de tirosinasa en función de la posición de los grupos hidroxilos en la molécula. Los flavonoides son los polifenoles más numerosos aislados y estudiados como sustratos / inhibidores de tirosinasa, están ampliamente distribuidos en las hojas, raíces, semillas y flores de plantas y se dividen en siete grandes grupos, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonoides, chalconas y cumarinas (Chang, 2009).

- *Flavonoles*: son inhibidores muy débiles de tirosinasa por lo que son poco usados en la industria alimentaria y cosmética como antipardeantes o agentes despigmentantes, respectivamente.

- *Flavonas, flavanonas y flavanoles*: entre ellos destacan la nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona), naringina (5,7,4'-trihidroxiflavanona) y neohesperidina (5,7,3'-trihidroxio-4'-metoxiflavona). Sin embargo, estos compuestos también muestran, en general, una inhibición débil comparada con inhibidores de referencia como el ácido kójico. Dentro de este grupo podemos destacar como potentes inhibidores el mulberrósido F (procedente de extractos de especies de *Morus*), que es 4.5 veces más potente que el ácido kójico, la norartocarpentina (flavona, Figura 40), 40 veces más potente ($K_I = 1.35 \mu\text{M}$) que el ácido kójico (Ryu *et al.*, 2008), y la estreptogenina (flavanona), con una inhibición similar a la anterior.

Se ha sugerido que la mitad 3-hidroxi-4-ceto del flavonoide es fundamental para la unión a los átomos de cobre del sitio activo de tirosinasa y que el número y la posición de los grupos hidroxilos son claves en el grado y tipo de inhibición.

- *Isoflavonoides*: dentro de este grupo tenemos a la glabridina (Figura 40), primer compuesto estudiado y caracterizado como inhibidor de tirosinasa, que mostró una potencia inhibitoria 15 veces superior al ácido kójico y un modo de inhibición no competitivo (Yokota *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que la posición y el número de grupos hidroxilos en el anillo A de la isoflavona afectan a la potencia y al modo de inhibición del compuesto. Así, una isoflavona con grupos hidroxilos en C6 y C7 del anillo A (6,7,4'-trihidroxiisoflavona) incrementa unas diez veces su grado de inhibición y la afinidad de la enzima por ella. Además, cuando los grupos hidroxilos se encuentran en las posiciones C7 y C8 del anillo A (7,8,4'-trihidroxiisoflavona y 5,7,8,4'-tetrahidroxiisoflavona), se cambia el modo de inhibición del compuesto de competitivo reversible a inactivación suicida irreversible (Chang, 2009).

- *Chalconas*: en este grupo podemos destacar tres derivados de chalconas, licurasida, isoquiritina y licochalcona (procedente de raíces de *Glycyrrhiza*), inhibidores competitivos de la actividad monofenolasa de tirosinasa de *Agaricus bisporus*. La licochalcona, tiene una potencia inhibitoria 5.4 veces más fuerte que el ácido kójico (Fu *et al.*, 2005). Otro importante inhibidor es la 2,4,2',4'-tetrahidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-chalcona (TMBC, procedente de *Morus nigra*, Figura 40), que muestra un grado de inhibición de la actividad difenolasa de tirosinasa 26 veces superior al ácido kójico, con una $K_I = 1-1.5 \mu\text{M}$ (Zhang *et al.*, 2009). Se ha descrito que el hidroxilo del

C4 del anillo B del esqueleto de la chalcona es muy importante para el modo y grado de inhibición de esta (Nerya *et al.*, 2004), probablemente debido a que la estructura resultante es muy similar a la del sustrato natural de la enzima L-tirosina. Una acción similar ocurre cuando se encuentra el grupo N-bencilbenzamida en el esqueleto de la chalcona.

El compuesto floretina (Figura 41) también se ha descrito como un potente inhibidor de tirosinasa de champiñón, mostrando un bajo valor de IC₅₀ (37.5 μM) (Zuo *et al.*, 2014). Del mismo modo, su derivado el glicósido floricina (Figura 41) se ha caracterizado como inhibidor competitivo de la enzima de champiñón, siendo más efectivo que el ácido kójico (Fang *et al.*, 2011). Estos dos compuestos han sido estudiados como inhibidores de las actividades monofenolasa y difenolasa de champiñón en los artículos que componen esta memoria, resultando ser sustratos alternativos de tirosinasa en lugar de inhibidores, aunque disminuyen la velocidad de acción de la enzima sobre sus sustratos (L-tirosina y L-dopa) al producir *o*-quinonas distintas de *o*-dopaquinona.

- *Cumarinas*: son lactonas del ácido fenilpropanoico con un núcleo *H*-bezopiranona. Dentro de este grupo, destaca como inhibidor la aloesina (Figura 40), procedente del *Aloe vera* (Jones *et al.*, 2002). Se han sintetizado híbridos de cumarina y resveratrol (Fais *et al.*, 2009) y se ha incorporado a la estructura de estos compuestos un fragmento de tirosina (Matos *et al.*, 2012) para mejorar su potencia inhibidora.

- *Resorcinoles o meta-difenoles*: los derivados del resorcinol han generado una atracción considerable como agentes despigmentantes, especialmente los 4-alquilresorcinoles no sustituidos, como es el caso del 4-butilresorcinol o rucinol (Figura 40), hasta 10 veces más potente que el ácido kójico (Kolbe *et al.*, 2013), y del 4-hexilresorcinol (Figura 41) (Torihara *et al.*, 1990; Frankos *et al.*, 1991; Dawley y Flurkey, 1993). Estos dos compuestos son considerados inhibidores muy potentes de la enzima tirosinasa y son ampliamente usados en la industria cosmética (rucinol y 4-hexilresorcinol) y alimentaria (4-hexilresorcinol) como agentes blanqueantes o antipardeantes. En los artículos que componen esta memoria, se demuestra la acción de tirosinasa sobre 4-hexilresorcinol, que se comporta realmente como sustrato alternativo de la enzima en lugar de inhibidor.

- *Estilbenos*: Oxiresveratrol (2,4,3',5'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno, Figura 41), gnetol (2,6,3',5'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno) y piceatanol (3,5,3',4'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno) son compuestos destacables como inhibidores de tirosinasa dentro de este

grupo. El oxiresveratrol, caracterizado como inhibidor no competitivo sobre las actividades monofenolasa y difenolasa, mostró 32 veces más inhibición que el ácido kójico (Shin *et al.*, 1998), el gnetol, 30 veces superior sobre la actividad difenolasa (Ohguchi *et al.*, 2003), y el piceatanol, unas 32.7 veces mayor sobre la actividad monofenolasa de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Yokozawa *et al.*, 2007).

Al igual que otros de los compuestos nombrados anteriormente, nuestro grupo de investigación ha conseguido demostrar que el oxiresveratrol es realmente un sustrato alternativo de la tirosinasa de champiñón. Los ensayos realizados para llegar a esta conclusión se describen en las publicaciones que componen esta memoria.

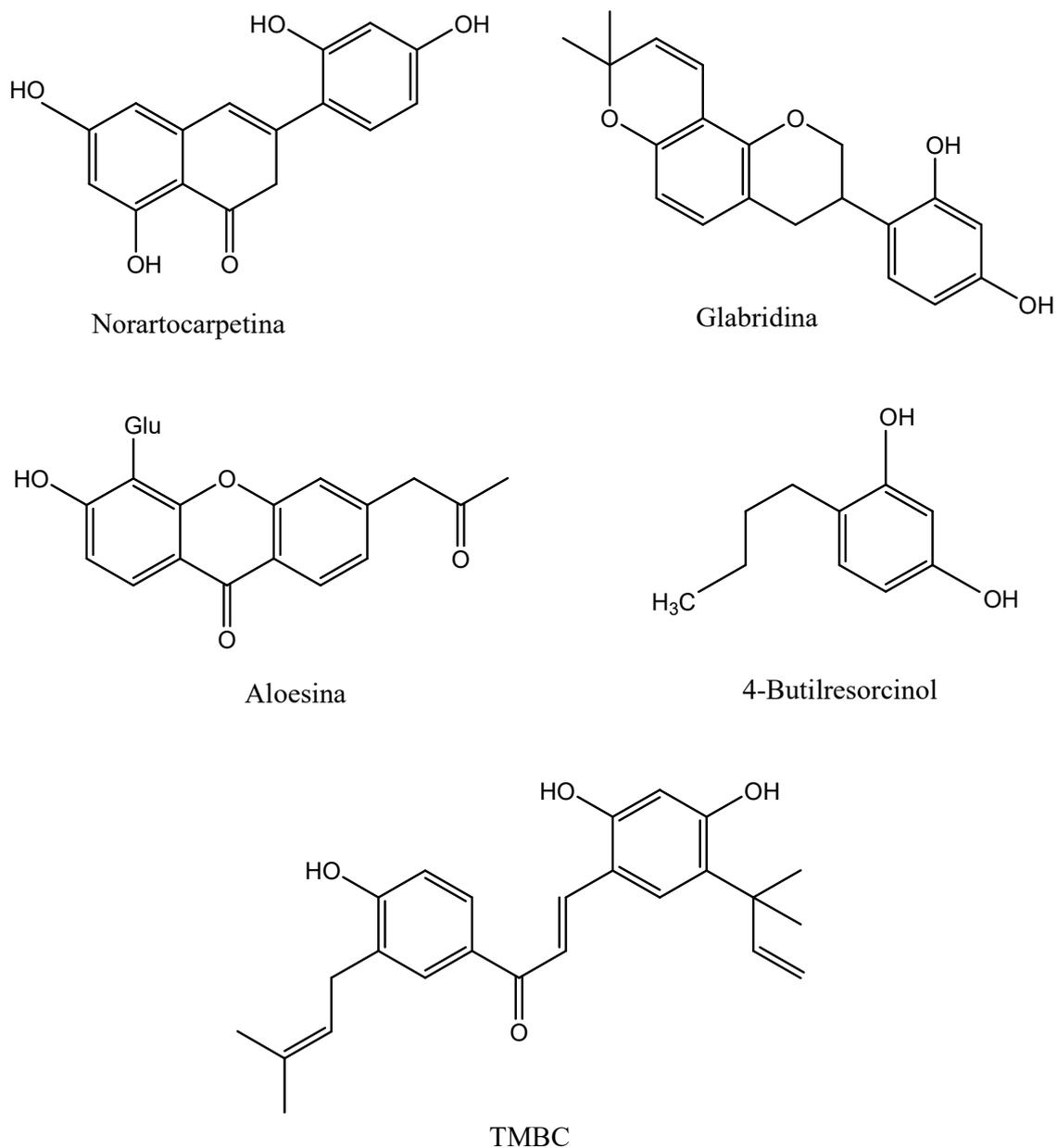


Figura 40. Estructuras químicas de algunos de los principales compuestos polifenólicos inhibidores de tirosinasa.

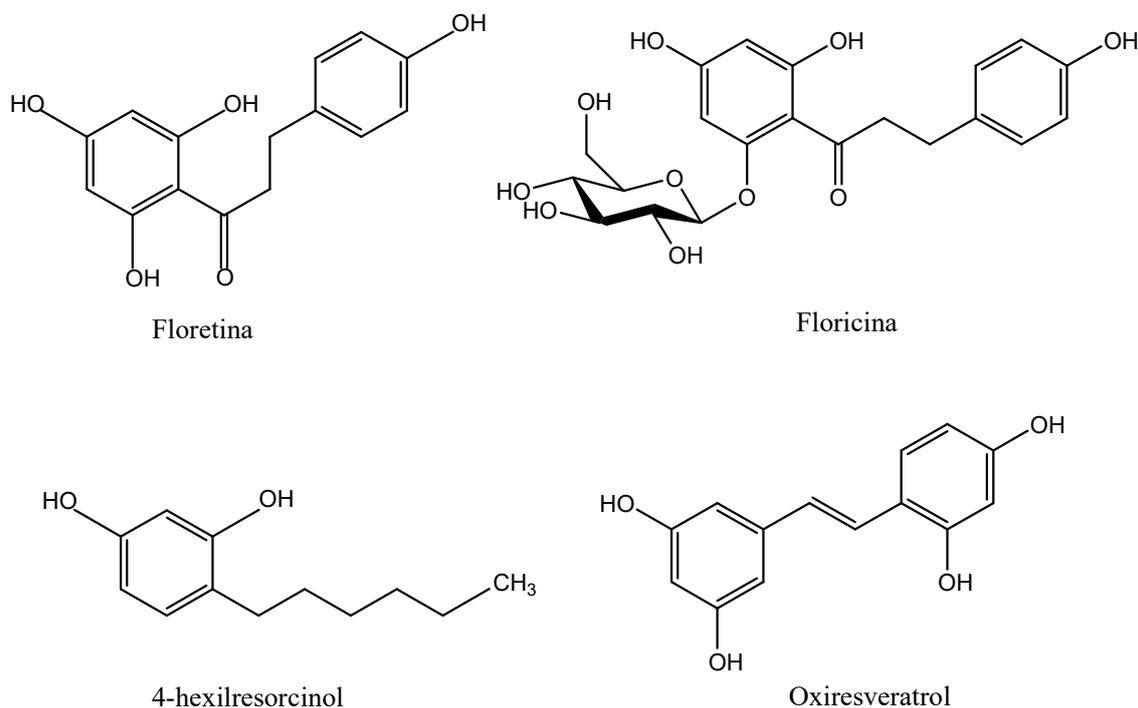


Figura 41. Estructuras químicas de algunos de los compuestos polifenólicos que han sido descritos como inhibidores de tirosinasa en la bibliografía y que actúan realmente como sustratos alternativos de la enzima.

1.6.1.2. Derivados del benzaldehído y benzoatos.

Un inhibidor clásico conocido de tirosinasa es el ácido benzoico. Gran cantidad de compuestos derivados del ácido benzoico y del benzaldehído, como el ácido cinámico, ácido anísico, anisaldehído y el ácido metoxicinámico (Lee, 2002), actúan como inhibidores de tirosinasa. Los derivados del ácido benzoico inhiben a la enzima uniéndose a los átomos de cobre del sitio activo (Conrad *et al.*, 1994), mientras que los derivados del benzaldehído, probablemente lo hacen por su capacidad de formar bases de Schiff con un grupo amino primario en la enzima (Kubo *et al.*, 2000).

En los artículos que componen esta tesis doctoral se realiza la caracterización cinética del ácido benzoico y ácido cinámico como inhibidores de las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa.

1.6.1.3. Lípidos (triacilglicéridos) de cadena larga y esteroides.

En este grupo de compuestos destacan el ácido trans-geránico (Masuda *et al.*, 2008) y la trilinoleína (triacilglicerol del ácido linoleico) (Jeon *et al.*, 2006), caracterizados como inhibidores de potencia similar al ácido kójico. Los esteroides también muestran un efector inhibitorio de la enzima tirosinasa bastante potente. Entre ellos podemos destacar el estigmast-5-en-3 β ,26-diol y el 2 β (2S)-hidroxi-7(E)-tritriacontenoato, que mostraron 7 y 12.3 veces (respectivamente) mayor inhibición que el ácido kójico (Khan *et al.*, 2005).

1.6.1.4. Péptidos con actividad inhibidora de tirosinasa.

Los oligopéptidos se están estudiando y utilizando recientemente como candidatos para el tratamiento de distintos desórdenes de la piel (Abu Ubeid *et al.*, 2009). Por ejemplo, se ha probado que el octapéptido (Arg-Ala-Asp-ser-Arg-Ala-Asp-Cys) y el decapeptido (Tyr-Arg-ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr) inhiben la actividad de tirosinasa de champiñón y humana mostrando unos valores de IC₅₀ de 123 y 40 μ M, respectivamente. Además estos oligopéptidos no muestran ningún efecto citotóxico (Abu Ubeid *et al.*, 2009).

1.6.1.5. Inactivadores.

A. Inhibidores irreversibles.

Este tipo de compuestos producen la inactivación permanente de la enzima tirosinasa, normalmente actuando en el sitio activo de la enzima. Entre ellos destacan captopril (Figura 42), que forma un complejo con el cobre a través de su grupo tiol libre provocando la quelación del cobre (Espín y Wichers, 2001), el anión 3,5-dihidroxifenil decanoato y el cardol trieno (Figura 42), inhibidor de tipo competitivo con una IC₅₀ de 8 μ M (Zhuang *et al.*, 2010). Estudios recientes demuestran que el captopril actúa también como inhibidor de tipo competitivo con un valor de K_i de 294 μ M (Kuo y Ho, 2013).

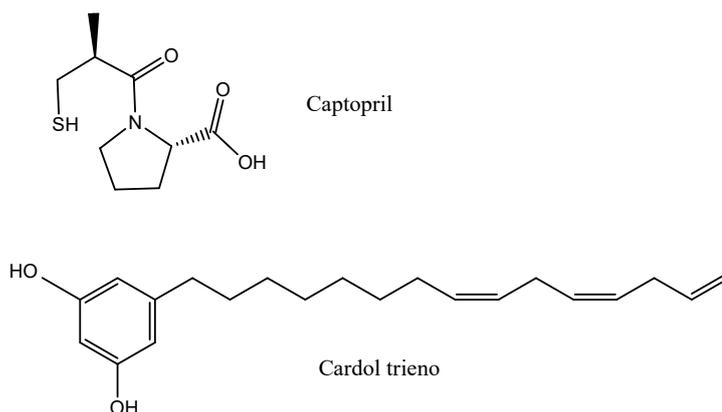


Figura 42. Estructuras químicas de captopril y cardol trieno, inhibidores irreversibles de tirosinasa.

B. Inactivadores suicidas.

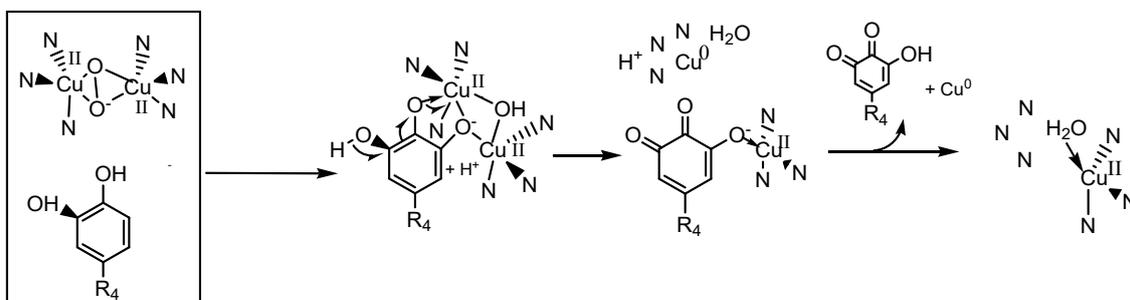
La inhibición suicida es un proceso de inactivación que sufre tirosinasa cuando reacciona con sus sustratos (Ingraham *et al.*, 1952; Lerch, 1983). Recientemente, ha aumentado el estudio de sustratos suicidas (inhibidores basados en el mecanismo) gracias a sus posibles aplicaciones farmacológicas (Silverman, 1995; Zhong y Groutas, 2004; Ghanbari *et al.*, 2006).

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

1. Ataque de la *o*-quinona, producto de reacción, sobre un grupo del sitio activo (Ingraham *et al.*, 1952).
2. Ataque mediante radicales libres generados durante el ciclo catalítico (ROS, especies reactivas del oxígeno) sobre el sitio activo de la enzima (Seiji *et al.*, 1978).
3. 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 mecanismos 1 y 2 han sido descartados, ya que esta inactivación también ocurre en presencia de NADH o ácido ascórbico que reducen las *o*-quinonas a *o*-difenoles. Además, al proteger a la enzima con eliminadores de radicales libres, se comprobó que la inactivación suicida seguía ocurriendo (Dietler y Lerch, 1982). En cuanto al mecanismo 3, que 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; Land *et al.*, 2008; Ramsden *et al.*, 2009; Ramsden y Riley 2010a; 2010b) (Esquema 15).



Esquema 15. Mecanismo propuesto para explicar la inactivación suicida de tirosinasa durante su actividad monofenolasa cuando actúa sobre *o*-difenoles (Land *et al.*, 2007).

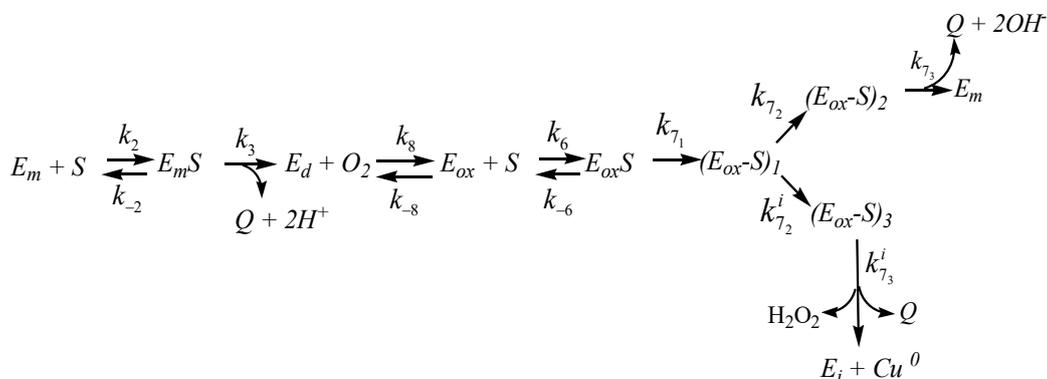
La estructura química de los sustratos es muy importante en el mecanismo de inactivación suicida. Según el mecanismo propuesto en el Esquema 15, cuando el sustrato es un trihidroxibenceno (por ejemplo pirogalol), o cuando tiene sustituyentes en C3 y C6 del anillo fenólico, la enzima no sufriría inactivación suicida. Por último, este mecanismo tampoco explicaría la inactivación suicida ocasionada cuando tirosinasa actúa sobre otras moléculas no fenólicas, como el peróxido de hidrógeno (García-Molina *et al.*, 2005a), ácido ascórbico (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2009a), NADH (García-Molina *et al.*, 2010b), tetrahidropterinas (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2011a) o ácido tetrahidrofólico (García-Molina *et al.*, 2011).

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).

Los inactivadores suicidas potentes, se caracterizan por ser sustratos con un bajo valor de r y un alto valor de λ_{\max} . Entre estos destacan una serie de isoflavonas: 6,7,4'-trihidroxiisoflavona, 7,8,4'-trihidroxiisoflavona, 5,7,8,4'-tetrahidroxiisoflavona y la 8-hidroxinaringenina (Chang *et al.*, 2005; Chang, 2007; Chang *et al.*, 2010). Estos compuestos han dado lugar a una patente (Chang y Wu, 2008).

Nuestro grupo de investigación realizó 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.*, 1987a; 1987b; 1988), 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 estudió 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 se publicó un diseño experimental válido para caracterizar de forma sistemática la inactivación suicida de una enzima (García-Cánovas *et al.*, 1989).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado un mecanismo cinético (Esquema 16) y un mecanismo estructural (Esquema 17) que explican la inactivación suicida de tirosinasa cuando actúa sobre todos sus sustratos, ya sean fenólicos o no. Además, se tienen en cuenta los nuevos avances en la estructura de la enzima, la rigidez de las uniones de las histidinas del sitio activo y la existencia de dos pK_{as} cinéticamente significativos en el mecanismo (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010a; 2010c; 2012a; 2014; García-Molina *et al.*, 2014b).



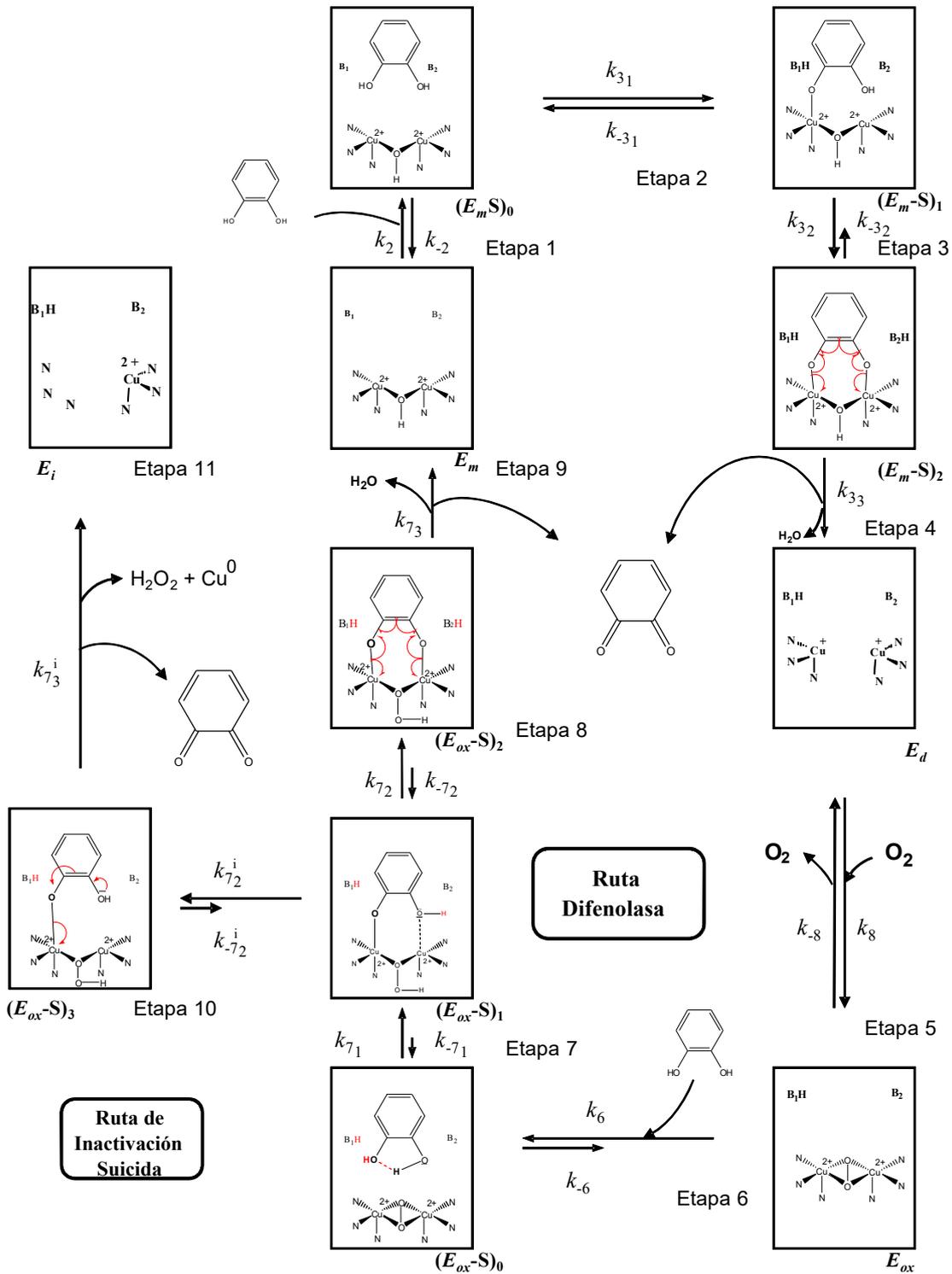
Esquema 16. Mecanismo cinético propuesto para explicar la ruta catalítica y la de inactivación suicida de tirosinasa de *Agaricus bisporus*. E_m = metatirosinasa, E_d = desoxitirosinasa, E_{ox} = oxitirosinasa, S = sustrato, Q = *o*-quinona. (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2012a).

La hidroxihidroquinona también ha sido estudiada como sustrato suicida (García-Molina *et al.*, 2014b).

En el Esquema 17 se describe el mecanismo estructural de inactivación suicida en el caso de *o*-difenoles (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2012a). Este mecanismo empieza 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: (1) que el segundo protón del sustrato se transfiera a la base B₂, continuando la ruta difenolasa de la enzima (Etapas 8 y 9, Esquema 17) o (2) que este protón sea transferido de nuevo al grupo peróxido y se produzca la inactivación suicida (Etapas 10 y 11, Esquema 17). 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 oxitirosinasa (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 oxitirosinasa y, por tanto, los monofenoles no inactivan a la enzima (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2011b; 2014).

La inactivación suicida de tirosinasa de champiñón se ha caracterizado cinéticamente para gran cantidad de compuestos fenólicos (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2008b), se ha estudiado este efecto sobre *o*-aminofenoles y *o*-diaminas (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2012c) y sobre la hidroxihidroquinona (García-Molina *et al.*, 2014b).



Esquema 17. Mecanismo estructural propuesto para explicar la inactivación suicida de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2012a).

1.6.1.6. Diseño de inhibidores.

Muchos de los compuestos identificados como inhibidores de tirosinasa, producen citotoxicidad y gran cantidad de efectos adversos cuando se utilizan en la industria cosmética y farmacéutica (Penney *et al.*, 1984; deCaprio, 1999; Taïeb *et al.*, 2011; Stratford *et al.*, 2012). Este motivo ha promovido la continua búsqueda de compuestos que muestren un efecto inhibitor sobre tirosinasa y que minimicen los efectos adversos derivados de su utilización (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).

Los métodos de simulación por ordenador han supuesto un avance importante en la búsqueda de nuevos inhibidores. Estos métodos tienen en cuenta la relación entre la estructura y actividad de los compuestos y posteriormente, los más prometedores se ensayan de forma experimental (Xue *et al.*, 2008; Casañola-Martín *et al.*, 2008; 2010; Marrero-Ponce *et al.*, 2010; Buitrago *et al.*, 2014; Bukhari *et al.*, 2014). Durante la síntesis de nuevos inhibidores, se han realizado estudios comparativos entre los distintos métodos de simulación por ordenador (Le-Thi-Thu *et al.*, 2014).

En los últimos años se han llevado a cabo las cristalizaciones de distintas tirosinasas, como la de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba *et al.*, 2006), *Bacillus megaterium* (Sendovski *et al.*, 2011) y, recientemente, se ha dilucidado la estructura de la enzima del champiñón *Agaricus bisporus*, enzima tipo en los estudios experimentales de tirosinasa (Ismaya *et al.*, 2011a; 2011b; Mauracher *et al.*, 2014a; Ai *et al.*, 2014), y de la enzima de hoja de nogal *Juglarus 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). En un estudio reciente, Hsiao y colaboradores analizaron gran cantidad de inhibidores de tirosinasa siguiendo esta metodología y observaron que dos inhibidores potentes de la enzima tenían estructuras similares al dipéptido WY (triptófano-tirosina) y al tripéptido KFY (lisina-fenilalanina-tirosina), poniendo de manifiesto el importante papel de la tirosina C-terminal en la inhibición de tirosinasa. Del mismo modo, los tripéptidos RCY (arginina-cisteína-tirosina) y CRY (cisteína-arginina-tirosina) también mostraron gran potencia inhibitora, poniendo de manifiesto en este caso la potencia de cisteína en el extremo N-terminal. El grupo tiol de estos tripéptidos interacciona con los cobres del sitio activo. 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).

En un trabajo reciente, se analizaron modelos tridimensionales de tirosinasa, centrándose en la estructura de unión con cuatro inhibidores comunes de la enzima (arbutina, ácido ascórbico, ácido kójico y tropolona) para la búsqueda y predicción de inhibidores potentes (Nokinsee *et al.*, 2015). La enzima más utilizada en estudios de inhibición es la del champiñón *Agaricus bisporus*, sin embargo, se han observado diferencias significativas en la efectividad inhibitoria de muchos compuestos entre tirosinasa humana y tirosinasa de champiñón (Jeon *et al.*, 2005; Chang, 2009; Vontzalidou *et al.*, 2012). En este trabajo, los autores proponen que, puesto que la enzima procedente de *Bacillus megaterium* tiene una estructura más similar a la tirosinasa humana (33.5%) (Figura 43), es ésta última la que debe ser usada en la búsqueda y diseño de inhibidores (Nokinsee *et al.*, 2015). La estructura cristalina de la enzima de *Bacillus megaterium* (Sendovski *et al.*, 2011) fue la que utilizaron como patrón para construir el modelo por homología de la enzima humana. Resultados de simulaciones de *Docking* y Dinámica Molecular sugirieron que N81, N260, H263 y M280 están implicados en la unión de inhibidores a tirosinasa de champiñón, E195 y H208 son residuos importantes en la tirosinasa bacteriana, y E230, S245, N249, H252, V262 y S265 se unen a inhibidores y son importantes en la formación de interacciones pi en tirosinasa humana. En la Figura 44 se muestran la estructuras de unión de tirosinasa de champiñón (A), tirosinasa bacteriana (B) y tirosinasa humana (C), al ácido kójico, inhibidor clásico de la enzima (Nokinsee *et al.*, 2015).

```

AAA61242  RLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTP
3NQ1_A    KYRVRKENVLHLLTDTEKRDFVVRTVLILKEKGI-----

AAA61242  MFNDINIYDLFVWMHYVSM DALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRLFL
3NQ1_A    -----YDRYIAWHGAAGKFHTPPG----SDRNAAHMSAFLPWHREYL
                *                               *               *

AAA61242  LRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDWRDA-----EKCDICTDEYMGGQHPTN
3NQ1_A    LRFERDLQSI--NPEVTLPYWEWETDAQMQDPSQSQIWSADFMGGNGNPI

AAA61242  PNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNSHQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRT
3NQ1_A    KDFIVDTGPF AAGRWTTI-----DEQGNPSGGLKRNFGATK--EA

AAA61242  PRLPSSADVEFCLSLTQYESGSM DKAANFSFRNTLEGFASPLTGIADASQ
3NQ1_A    PTLPTRDDVLNALKITQYDTPPWDMTSQNSFRNQLEGFIN-----G

AAA61242  SSMHNALHIYMG TMSQVQGSANDPIFLLHHA FVDSIFEQWLRRRHRPLQE
3NQ1_A    PQLHNRVHRWVGGQMGVPTAPNDPVFFLH HANVDRIWAVWQIIH-RNQN
                *       *                               *

AAA61242  VYPEANAPIGHNRESYMVPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSDP
3NQ1_A    YQPMKNGPFGQNF RDPMYPWN--TTPEDV-MNHRKLG YVYDI-----

```

Figura 43. Alineación entre la secuencia de aminoácidos de tirosinasa humana (AAA61242) y la estructura cristalina de la tirosinasa bacteriana (3NQ1) con una igualdad del 33.5% y similitud del 50.7%. Seis residuos de histidina (señalados con un asterisco) coordinan los dos iones de cobre (Cu_A y Cu_B) en el sitio activo (Ben-Yosef *et al.*, 2010; Nokinsee *et al.*, 2015).

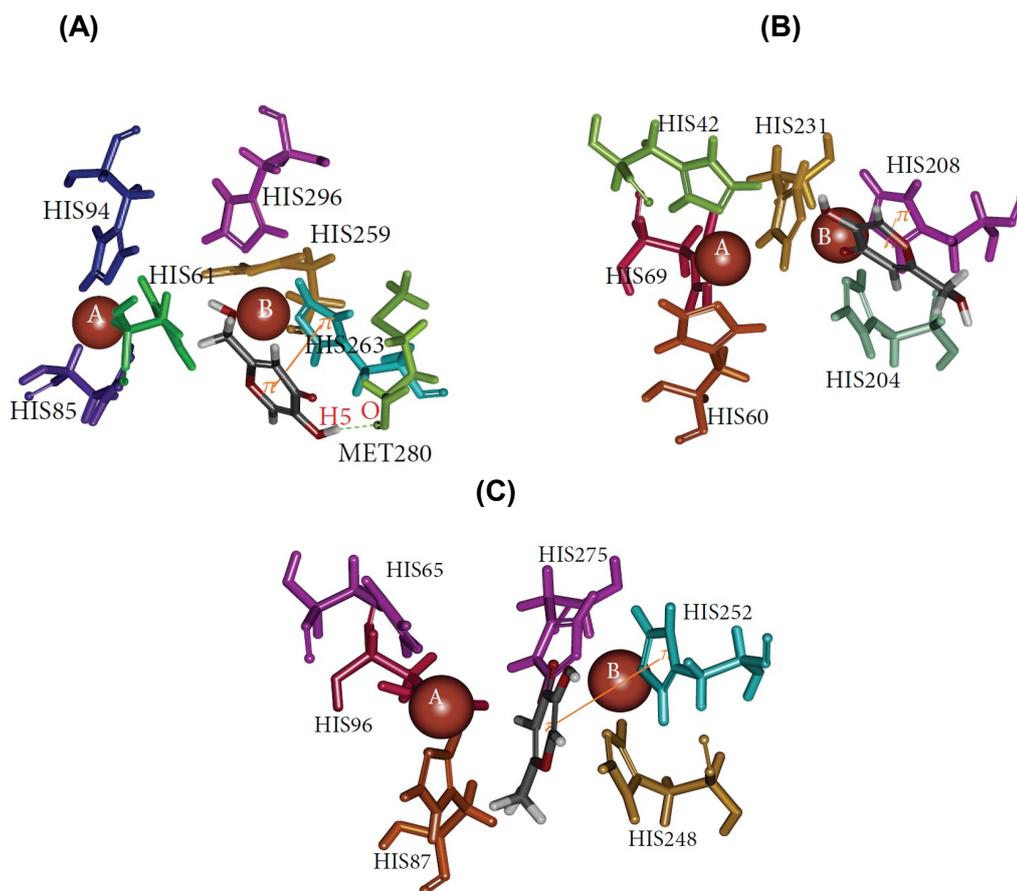


Figura 44. Estructuras de unión de (A) tirosinasa de champiñón, (B) tirosinasa bacteriana y (C) tirosinasa humana al inhibidor ácido kójico (Nokinsee *et al.*, 2015).

1.6.2. 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). El Co^{2+} , el Zn^{2+} , Cu^{2+} y el Ni^{2+} se han descrito como activadores (Gheibi *et al.*, 2006; 2011).

Además, se ha determinado que los ácidos grasos son activadores moderados de la enzima tirosinasa, siendo los saturados más potentes que los insaturados (Shabani y Sariri, 2010). Se ha observado que los flavonoles quercetina, kaempferol, ramnetina y fisetina, y las flavonas apigenina, luteolina y crisina, incrementan considerablemente la actividad de tirosinasa en cultivos de células HMVII, derivadas de melanoma maligno humano (Takekoshi *et al.*, 2014). Finalmente, los compuestos 3-

aminoacetofenona y 4-aminoacetofenona han sido recientemente descritos como potentes activadores de la actividad de tirosinasa (You *et al.*, 2015).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

El principal objetivo de esta memoria consiste en profundizar en el mecanismo de acción de la enzima tirosinasa así como en la inhibición de la misma, estudiando tanto la actividad monofenolasa como la difenolasa. Además, se investiga una metodología que permita discernir entre inhibidores y sustratos alternativos de la enzima, ya que muchos compuestos fenólicos caracterizados como inhibidores de tirosinasa, pueden ser hidroxilados o/y oxidados por la misma dando lugar a *o*-quinonas. Finalmente, se identifican y caracterizan cinéticamente como sustratos algunas de estas moléculas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Desarrollar una metodología que permita determinar si un compuesto fenólico es sustrato o inhibidor de tirosinasa, especialmente en el caso de monofenoles.
- Estudiar y comparar de forma experimental y mediante simulación la actuación de distintos compuestos en las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa, calculando los grados de inhibición para ayudar a confirmar el mecanismo de actuación y a discernir si son verdaderos inhibidores o sustratos alternativos.
- Diseñar una metodología para medir de forma correcta la actividad monofenolasa de tirosinasa, evitando las interferencias producidas por el período de retardo, sobre todo en los ensayos de inhibición.
- Identificar si el alcohol *p*-hidroxibencílico, tirosol, floretina y floricina son verdaderos inhibidores de tirosinasa o sustratos alternativos de la misma.
- Determinar si el 4-hexilresorcinol, agente despigmentante y antipardeante usado en la industria cosmética y alimentaria, es realmente un inhibidor o un sustrato de tirosinasa, y en este último caso, establecer un diseño experimental que permita caracterizarlo cinéticamente.
- Estudiar la inhibición de compuestos análogos a sustratos fenólicos sobre las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa de forma experimental y mediante simulación del mecanismo propuesto.

- Estudiar de forma experimental y mediante simulación, si las constantes de inhibición aparentes que se pueden calcular a partir de los estudios cinéticos de las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa, muestran dependencia de la naturaleza del sustrato. Comparar los valores obtenidos en cada una de las actividades.
- Establecer una metodología para la determinación del tipo de inhibición y el cálculo de las constantes de inhibición en las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa.
- Determinar si el oxiresveratrol es un inhibidor o un sustrato de tirosinasa, y en este último caso, establecer un diseño experimental para su caracterización cinética como sustrato.
- Profundizar en el estudio del efecto del pH sobre las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa.
- Proponer un mecanismo cinético que explique los resultados experimentales acerca del efecto del pH.
- A través de estudios de *docking*, proponer un mecanismo estructural que explique los resultados.
- Confirmar espectrofotométricamente si el ácido elágico es un sustrato de tirosinasa y llevar a cabo su caracterización cinética.
- Estudiar el papel del ácido elágico como antioxidante en la ruta de biosíntesis de melaninas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS Y MATERIALES.

3.1.1. Reactivos.

Los sustratos de tirosinasa usados en los ensayos descritos en esta memoria, así como el resto de compuestos químicos estudiados, fueron obtenidos de Sigma (Madrid, España): L-tirosina, L-dopa, 4-*tert*-butilcatecol (TBC), ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA), α -metil-L-dopa, α -metil-L-tirosina, 4-*tert*-butilfenol (TBF), guayacol, carvacrol, eugenol, isoeugenol, arbutina, ácido fenilacético, alcohol *p*-hidroxibencílico, alcohol *p*-hidroxifenético (tirosol), floretina, floricina, 4-hexilresorcinol (HR), oxiresveratrol (OR), ácido elágico (EA), catecol, 4-metilcatecol, ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico (DHPPA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA), dopamina, fenol, tiramina, umbeliferona, pirogalol, ácido gálico metil ester, 1,2,4-bencenotriol (HHQ), catequina (+), epicatequina (-), esculetina, ácido benzoico y ácido cinámico. Del mismo modo se compraron a Sigma los distintos disolventes orgánicos y el resto compuestos químicos utilizados: 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidrocloreuro (MBTH), dimetilformamida (DMF), peryodato sódico (NaIO₄), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido ascórbico (AH₂), β -nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) y superóxido dismutasa (SOD, 2500 U/mg). También se utilizó 4-*tert*-butilcatecol y peryodato sódico procedente de Acros Organics (Madrid, España) y dimetilsulfóxido (DMSO) de Merk (Madrid, España).

Todos los sustratos fenólicos utilizados se disolvieron en ácido fosfórico diluido (0.15 mM) para prevenir su autooxidación, excepto el alcohol *p*-hidroxibencílico, alcohol *p*-hidroxifenético (tirosol), floretina y floricina, que fueron disueltos en DMF, y el ácido elágico, en DMSO, debido a su baja solubilidad en agua.

En todos los ensayos se utilizó agua purificada tipo I (18 M Ω /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., Billerica, MA).

3.1.2. Fuente de Enzima.

Para realizar los distintos ensayos enzimáticos se utilizó tirosinasa de champiñón (3130 U/mg) como enzima modelo, suministrada por Sigma (Madrid, España) y posteriormente purificada.

Purificación de tirosinasa

La enzima fue purificada siguiendo un método modificado del ya propuesto por Duckworth y Coleman (1970). En primer lugar se disolvieron 0.5 g de la enzima de partida (proporcionada por Sigma) con un 5% de pureza (Robb, 1984), en 25 mL de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7.0. La mezcla resultante se mantuvo en agitación durante 1 hora a 4°C.

A continuación, se procedió a la purificación de la enzima por precipitación con sulfato amónico neutralizado a pH 7.0. Para ello se llevó el extracto hasta una concentración de sulfato amónico del 36% y se mantuvo durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó el extracto 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, este fue sometido a varios procesos. En primer lugar, se realizó una filtración 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 10 mM, 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).

3.1.3. Determinación de la concentración de proteínas.

La cuantificación de las distintas proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976), utilizando el kit comercial de Bio-Rad® y albúmina de suero bovino como estándar. Este método 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 posteriormente se lee la absorbancia a 595 nm. El resultado se introduce en la recta de calibrado previamente realizada con albúmina de suero bovino. Así, se determinó la concentración proteica de cada fracción. Este ensayo se realizó por cuadruplicado a tres concentraciones de proteína diferentes, manteniéndose la linealidad. Así, se eliminó el error típico en las medidas, reflejando valores sin desviaciones significativas en las repeticiones.

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.

3.2. EQUIPOS Y MÉTODOS.

3.2.1. 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 dispone 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, siendo 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).

3.2.1.1. Medidas de actividad enzimática de tirosinasa.

La actividad de tirosinasa sobre L-tirosina, L-dopa, α -metil-L-tirosina y α -metil-L-dopa se midió a 475 nm, longitud de onda de absorción máxima de dopacromo y α -metil-dopacromo (García-Molina *et al.*, 2007a). La actividad sobre 4-*tert*-butilcatecol fue seguida por acumulación de *o-tert*-butilquinona (*o*-TBQ) a 410 nm (García-Molina *et al.*, 2007a), y sobre el ácido 3,4-dihidroxi mandélico a 375 nm, máximo de absorción

de su correspondiente aldehído (3,4-dihidroxibenzaldehído, DOBA) (Rodríguez-López *et al.*, 1991b).

La actividad de la enzima sobre los distintos sustratos alternativos estudiados en los artículos que componen esta memoria, se siguió a la longitud de onda máxima de absorción de cada una de las *o*-quinonas o *p*-quinonas generadas.

En cuanto al estudio del papel del ácido elágico como antioxidante en la ruta de biosíntesis de melaninas, las medidas espectrofotométricas de la formación del producto de oxidación del ácido elágico se realizaron a 600 nm, aunque su máximo de absorción está en 470 nm, ya que a esta longitud de onda la absorbancia de los productos del resto de sustratos utilizados en los ensayos (TBC, L-dopa y DOBA) es baja o nula.

Medida de la actividad monofenolasa

Para realizar las medidas de actividad monofenolasa de tirosinasa sobre L-tirosina y α -metil-L-tirosina de forma precisa, se añadió al medio de ensayo la cantidad de su *o*-difenoil correspondiente necesaria para suprimir el periodo de retardo que aparece al principio de los registros y dificulta las medidas de velocidad. De este modo conseguimos alcanzar el estado estacionario desde $t = 0$. Esta cantidad de *o*-difenoil viene dada por la relación $R = [D]_{ss}/[M]_{ss}$ (Fenoll *et al.*, 2001), donde $[D]_{ss}$ y $[M]_{ss}$ son las concentraciones de *o*-difenoil y monofenol en estado estacionario respectivamente, con $[M]_{ss} \sim [M]_0$ (Molina *et al.*, 2007).

Medida de la actividad monofenolasa sobre sustratos que no acumulan *o*-difenoil en el medio

Para detectar actividad monofenolasa sobre sustratos que no acumulan *o*-difenoil en el medio, se utilizó: (a) peróxido de hidrógeno, para pasar la forma enzimática E_m (inactiva sobre monofenoles) a E_{ox} (activa sobre monofenoles), o (b) ácido ascórbico, que pasa la forma E_m a E_d , que con oxígeno pasa a E_{ox} , o bien (c) TBC catalítico para pasar la forma E_m a E_d , que con oxígeno pasa a E_{ox} , y un reductor como el NADH para regenerar el *o*-difenoil y que de este modo se produzca de manera continua la forma E_{ox} y no cese la actividad enzimática (Rodríguez-López *et al.*, 1992b; 2001; Jiménez y García-Carmona, 1996; García-Molina *et al.*, 2012; 2013; 2014a; 2014c). Estas dos últimas estrategias (b) y (c) se pudieron utilizar solamente en los

casos en los que el reductor no era capaz de actuar sobre el producto de la reacción enzimática de interés (*p*-quinona).

Los valores de velocidad inicial fueron calculados por ajuste por regresión lineal de la porción inicial de cada registro experimental.

En el estudio del efecto del pH en la catálisis de tirosinasa, las medidas sobre los distintos sustratos se realizaron utilizando un método cronométrico o un método de desaparición de ascórbico, debido a que las *o*-quinonas producto de la reacción enzimática son muy inestables, lo que dificulta su medida y en el caso de dopacromo, no se puede detectar de forma correcta a pH ácido.

Método cronométrico

Este método utiliza una pequeña cantidad de ácido ascórbico para reducir a las *o*-quinonas generadas por la enzima. Una vez que todo el ácido ascórbico ha sido consumido, el producto de la reacción comienza a acumularse en el medio y el tiempo transcurrido hasta este momento (τ) es el que se utiliza para determinar el valor de la velocidad inicial (V_0^Q) (Muñoz *et al.*, 2006; García-Molina *et al.*, 2007a).

En ausencia de ácido ascórbico, la concentración de *o*-quinona (Q) a un tiempo (t) determinado es

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

En presencia de una concentración dada de ácido ascórbico ($[AH_2]_0$), la concentración de *o*-quinona a un tiempo (t) determinado es $V_0^Q t$ menos la cantidad de *o*-quinona reducida por el ácido ascórbico presente inicialmente

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

Si τ es el tiempo requerido por la enzima para producir una concentración de *o*-quinona igual a $[AH_2]_0$ entonces

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

y de este modo

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

La aparición de *o*-quinona se midió a $\lambda = 495$ nm en el caso del ácido cafeico, $\lambda = 436$ nm para catequina (+) y $\lambda = 440$ nm para epicatequina (-)(Rodríguez-López *et al.*, 2000c).

El método cronométrico también fue usado para la caracterización cinética del ácido elágico como sustrato de tirosinasa, debido a la inestabilidad y el carácter reactivo de su *o*-quinona producto de reacción. La aparición de producto fue registrada a 470 nm.

Método de desaparición de ácido ascórbico

Este método registra la desaparición de ácido ascórbico cuando es oxidado por las *o*-quinonas producidas por la enzima. La velocidad inicial de formación de *o*-quinona es igual al valor absoluto de la velocidad de desaparición de ácido ascórbico, puesto que la estequiometría de reacción es 1:1.

Los monofenoles (L-tirosina, fenol, umbeliferona, tiramina y TBF) utilizados en el estudio del efecto del pH en la catálisis de tirosinasa, se midieron por el método de desaparición de ácido ascórbico, a tiempos muy cortos, para evitar las posibles desviaciones producidas por la acumulación de *o*-difeno (producida por el ácido ascórbico) en el medio, que rompería el estado estacionario y haría que la medida no fuera precisa. Del mismo modo, al tratarse de monofenoles, se añadió al medio la cantidad de *o*-difeno necesaria para alcanzar el estado estacionario a $t = 0$ y que viene determinada por la relación $R = [D]_{ss}/[M]_{ss}$ (Fenoll *et al.*, 2001).

Los registros de desaparición de ascórbico se realizaron a $\lambda = 260$ nm (DHPPA, DHPAA, dopamina, L-dopa, fenol, umbelliferona, TBF, tiramina y L-tirosina), $\lambda = 275$ nm (ácido gálico metil ester) y $\lambda = 290$ nm (pirogalol y esculetina), teniendo en cuenta los distintos coeficientes de absorptividad molar del ácido ascórbico a las distintas longitudes de onda y distintos valores de pH.

En el caso del trifeno HHQ, las medidas de la acción de tirosinasa se realizaron siguiendo la aparición de 2-hidroxi-*p*-benzoquinona (BPH) (García-Molina *et al.*, 2014b).

3.2.2. Análisis cinético.

Los ajustes por regresión lineal y no lineal se realizaron utilizando el programa Sigma Plot 9.0 para Windows (Jandel Scientific, 2006) y las ecuaciones de velocidad se obtuvieron mediante los programas informáticos ALBASS y REFERASS (Varón-Castellanos *et al.*, 1995; Varón *et al.*, 1997).

3.2.2.1. Ensayos de inhibición enzimática y análisis cinético de inhibidores.

Los grados de inhibición fueron calculados usando la siguiente fórmula:

i (%) = $[(V_0 - V_i) / V_0] \times 100$, donde V_0 es la velocidad inicial del control (actividad enzimática en ausencia de inhibidor) y V_i es la velocidad inicial en presencia de inhibidor. Los valores de IC_{50} fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal a la ecuación (5), de los grados de inhibición frente a la concentración de inhibidor, trabajando a una concentración de sustrato igual a K_M .

$$i_D = \frac{[I]_0}{2K_{I0} + [I]_0} \quad \text{donde } 2K_{I0} = IC_{50} \quad (5)$$

Para la determinación del tipo de inhibición y el cálculo del valor de K_I de los inhibidores estudiados, se representaron, en primer lugar, los valores de velocidad inicial (V_0) frente a las distintas concentraciones de sustrato ($[S]_0$) en ausencia y presencia de distintas concentraciones de inhibidor y, por ajuste por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten (6), se obtuvieron los valores de K_M y V_{max} a cada concentración de inhibidor. Los distintos valores de K_M fueron posteriormente representados frente a la concentración de inhibidor ($[I]_0$) y, por ajuste por regresión lineal a la ecuación (7), se obtuvieron los valores de K_I^{app} .

$$V_0^{Cr} = \frac{V_{max} [S]_0}{K_M^{app} + [S]_0} \quad (6)$$

con

$$K_M^{app} = K_M \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I^{app}} \right) \quad (7)$$

En los casos de baja solubilidad del sustrato se utilizó la aproximación de Dixon (Segel, 1982), en la que los valores de velocidad inicial (V_0) fueron representados frente a la concentración de inhibidor ($[I]_0$) y ajustados por regresión no lineal a la ecuación (8). Tras el cálculo del parámetro b (9) y su representación frente a la concentración de sustrato y posterior ajuste por regresión lineal, se obtuvieron los valores de K_I^{app} .

$$V_0^{\text{Cr}} = \frac{a}{b + [I]_0} \quad (8)$$

con

$$b = K_I^{\text{app}} + \frac{K_I^{\text{app}}}{K_M^{\text{app}}} [S]_0 \quad (9)$$

3.2.2.2. Caracterización cinética de sustratos alternativos.

Para caracterizar cinéticamente la actividad monofenolasa de tirosinasa sobre los *meta*-difenoles identificados como sustratos alternativos de tirosinasa, se midió la velocidad inicial de formación de producto a distintas concentraciones de sustrato y en condiciones saturantes de peróxido de hidrógeno y oxígeno. De este modo se consiguió simplificar la ecuación (10) a la ecuación de Michaelis-Menten (11). La presencia de peróxido de hidrógeno en el medio de ensayo es necesaria para que exista la forma enzimática E_{ox} que es la forma activa sobre monofenoles, ya que estos sustratos no acumulan *o*-difenoel en el medio. Tras el ajuste de los valores de velocidad inicial (V_0) frente al sustrato ($[M]_0$) por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten, se obtuvieron los valores de K_M y V_{max} . Posteriormente se calculó el valor de la constante catalítica (k_{cat}) mediante la ecuación (12).

$$V_0 = \frac{\alpha_1 [\text{H}_2\text{O}_2]_0 [\text{O}_2]_0 [\text{M}]_0 [E]_0}{\beta_1 [\text{O}_2]_0 + \beta_2 [\text{H}_2\text{O}_2]_0 + \beta_3 [\text{O}_2]_0 [\text{M}]_0 + \beta_4 [\text{H}_2\text{O}_2]_0 [\text{M}]_0 + \beta_5 [\text{H}_2\text{O}_2]_0 [\text{O}_2]_0 + \beta_6 [\text{O}_2]_0 [\text{M}]_0^2 + \beta_7 [\text{H}_2\text{O}_2]_0 [\text{O}_2]_0 [\text{M}]_0} \quad (10)$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [M]_0}{K_M + [M]_0} \quad (11)$$

con

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0 \quad (12)$$

donde $[E]_0$ es la concentración inicial de enzima.

En cuanto a la caracterización cinética de la actividad difenolasa de tirosinasa sobre el ácido elágico, como se ha comentado anteriormente, se utilizó un método cronométrico debido a la inestabilidad de su producto de oxidación. Los valores de velocidad inicial obtenidos (V_0) se representaron frente a la concentración inicial de sustrato ($[D]_0$) y se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten (13), obteniendo los valores de velocidad máxima (V_{\max}) y de la constante de Michaelis (K_M).

$$V_0 = \frac{V_{\max} [D]_0}{K_M + [D]_0} \quad (13)$$

3.2.2.3. Determinación de los valores de K_a y pK_a de tirosinasa.

Los valores de velocidad inicial de la acción de tirosinasa sobre distintas concentraciones de sustrato, obtenidos a cada pH, fueron representados frente a la concentración de sustrato y posteriormente ajustados por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten (6), permitiendo el cálculo de los valores de K_M^{app} y V_{\max} a cada valor de pH.

La representación de estos datos de K_M^{app} frente a la concentración de protones ($[H^+]$) y su ajuste por regresión no lineal a la ecuación (14), permitieron el cálculo de K_a y pK_a de tirosinasa, a partir de la relación entre la ordenada en el origen y la pendiente de la recta.

$$K_M^{\text{app},D} = K_M^D \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right) \quad (14)$$

3.2.3. Ensayos de RMN.

Los espectros de RMN-¹³C de los distintos sustratos utilizados en esta memoria, se obtuvieron usando como disolvente agua deuterada (D₂O) pH 6.8 (pH óptimo de tirosinasa de champiñón) para obtener los correspondientes valores de desplazamiento químico (δ). Los espectros de RMN-¹³C se realizaron en un espectrómetro Varian Unity de 300 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 ¹³C para un átomo de carbono y su densidad electrónica es conocida (Günther, 1980; Farnun, 1975). 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 (Tomiya *et al.*, 1993).

3.2.4. Docking computacional.

Se llevaron a cabo ensayos de *docking* molecular para entender los modos de unión de tirosinasa con catecol, fenol, catecolato (1-), DHPAA y 3,4-dihidroxibencilamonio como ligandos. Las estructuras químicas de estos ligandos se construyeron con el programa PyMol 1.5.0.1 (Schrödinger, 2010). Las coordenadas de la proteína se obtuvieron de la estructura cristalina de tirosinasa de *Agaricus bisporus* en la forma desoxy (E_d) correspondiente al código 2Y9W de Protein Databank, (Ismaya *et al.*, 2011a). La forma meta (E_m) se modificó para incluir un grupo hidroxilo unido a un ión de cobre encontrado en la forma meta de tirosinasa de *A. bisporus*. Dicha modificación consiste en una ligera reestructuración del sitio de unión binuclear de cobre de acuerdo a la forma meta cristalizada de *Streptomyces* (Matoba *et al.*, 2006). Para todos los estudios de *docking* se seleccionó la cadena A, que corresponde a una de las subunidades H.

Los cálculos semi-empíricos se llevaron a cabo usando el paquete de software de química cuántica-MOPAC2012 (Steward, 2012). La optimización de geometría de

catechol, fenol, catecolato (1-), DHPAA y 3,4-dihidroxibencil amonio se realizó usando el método PM7 (Stewart, 2013) que ofrece un buen balance entre velocidad y precisión. Para preparar los archivos de entrada y extraer las geometrías resultantes de MOPAC se utilizó Gabedit (Allouche, 2011).

Se utilizó el paquete AutoDock 4.2 (Morris *et al.*, 2009), que realiza una evaluación de energía a través de una red de puntos de potencial de afinidad empleando varios algoritmos de búsqueda para encontrar la posición de unión más adecuada para un ligando sobre una proteína dada. Para editar y examinar las estructuras de las moléculas y sus interacciones se utilizaron los paquetes de software PyMol 1.5.0.1 (Schrödinger, 2010) y AutoDockTools4 (Sanner, 1999; Morris *et al.*, 2009). Las estructuras proteicas se prepararon añadiendo átomos de hidrógeno y eliminando moléculas de agua no funcionales.

Las cargas parciales de los ligandos y el dominio de unión de cobre binuclear de tirosinasa se calcularon utilizando MOPAC12, mediante el método PM7. En el resto de la proteína, las cargas parciales se calcularon usando el método Gasteiger, incluido en el paquete AutoDock 4.2.

Para los parámetros del cobre se seleccionaron un radio de van der Waals de 3.5 Å y una profundidad de potencial de 0.005 kcal/mol. Los archivos de los parámetros de la red de puntos y los mapas de afinidad atómica específica se construyeron usando AutoGrid 4.2 (Huey *et al.*, 2007). El tamaño de la red se fijó en 30x30x30 puntos de red (x, y, z) manteniendo un espacio entre los puntos de red de 0.375 Å. Las simulaciones de *docking* se llevaron a cabo usando el algoritmo genético de Lamarck para explorar la región de unión para buscar los mejores conformeros. El número de ciclos independientes de *docking* fue fijado en 50, el tamaño de población en 150 y el número máximo de evaluaciones de energía en 25000000. El resto de parámetros fueron los predeterminados en AutoDock.

3.2.5. Ensayos oximétricos.

Las medidas de la concentración de oxígeno con 4-metilcatecol como sustrato se realizaron utilizando un oxímetro Hansatech DW (King's Lynn Norfolk, UK)(Rodríguez-López *et al.*, 1992a). Este oxímetro se basa en un electrodo de plata/platino de tipo Clark, recubierto por una membrana de teflón de 12.5 mm, que está conectado a una unidad amperométrica controlada por un ordenador PC-compatible. La muestra se agitó continuamente durante los experimentos y la temperatura se mantuvo constante a 25 °C. Utilizando la ecuación de la integrada de Michaelis se obtuvo el valor de $K_M^{O_2}$ según el pH.

Para realizar estos ensayos se ajustó, en primer lugar, la concentración máxima y mínima de O₂. Para el máximo, se consideró el agua saturada de oxígeno (0.26 mM), y posteriormente, para ajustar el mínimo, se burbujeó una corriente de N₂ en la cámara de reacción para eliminar el O₂. 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 (TBQ), produciendo dos moléculas de agua. Se realizaron tres disoluciones de TBC cuantificadas espectrofotométricamente y se oxidaron 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.

3.2.6. Análisis de regresión.

3.2.6.1. 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:

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

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

La ponderación 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):

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

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.

3.2.6.2. 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.

3.2.7. 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.

3.2.7.1. 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.

3.2.7.2. 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.

3.2.7.3. 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.

3.2.7.4. 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 las publicaciones adjuntas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ARTÍCULO 1.

4.1.1. Título

Discriminación entre sustratos alternativos e inhibidores de tirosinasa.

4.1.2. Referencia

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2015) 63, 2162-2171.

4.1.3. Resumen

Muchos compuestos fenólicos han sido descritos en la literatura científica como inhibidores de tirosinasa. En este trabajo se propone un test que nos permite distinguir si una molécula es un inhibidor enzimático o un sustrato. El test tiene varias etapas. Primero, se determina el grado de inhibición de la molécula estudiada sobre la actividad monofenolasa (i_M) y sobre la actividad difenolasa (i_D). Si $i_M = i_D$, es un inhibidor. Si $i_M \neq i_D$, la molécula podría ser sustrato o inhibidor. Se proponen diversas etapas adicionales para resolver esta ambigüedad. El estudio aquí descrito fue llevado a cabo usando las siguientes moléculas: ácido benzoico, ácido cinámico, guayacol, isoeugenol, carvacrol, 4-*tert*-butilfenol, eugenol, y arbutina.

4.1.4. Url

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf5051816>

4.2. ARTÍCULO 2.

4.2.1. Título

Identificación del alcohol *p*-hidroxibencílico, tirosol, floretina y su derivado floricina como sustratos de tirosinasa.

4.2.2. Referencia

Bioorganic & Medicinal Chemistry (2015) 23, 3738-3746.

4.2.3. Resumen

En los últimos años, los hidroxialquilfenoles alcohol *p*-hidroxibencílico y tirosol, y los compuestos floretina y su derivado floricina han sido descritos como inhibidores de la enzima tirosinasa. Cuando las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa sobre sus sustratos fisiológicos L-dopa y/o L-tirosina son medidas en presencia de estos compuestos, la velocidad de acción de la enzima disminuye. Estos resultados llevan a la identificación de estos compuestos como inhibidores. Sin embargo, estas moléculas muestran un comportamiento inusual como inhibidores de la enzima, de hecho, en este estudio demostramos que no son verdaderos inhibidores sino sustratos alternativos de la enzima.

4.2.4. Url

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089615003132>

4.3. ARTÍCULO 3.

4.3.1. Título

Hidroxilación catalizada por tirosinasa del 4-hexilresorcinol, un agente antipardeante y despigmentante: un estudio cinético.

4.3.2. Referencia

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2015) 63, 7032-7040.

4.3.3. Resumen

El 4-hexilresorcinol (HR) es un compuesto usado en la industria alimentaria y cosmética como agente antipardeante y blanqueante. Su uso es principalmente debido a su efecto inhibitorio sobre la enzima tirosinasa. Sin embargo, la enzima hidroxila el HR a un *o*-difenol, que después oxida a *o*-quinona, que rápidamente isomeriza a *p*-quinona. Para que tirosinasa actúe de este modo, la forma E_{ox} (oxitirosinasa) tiene que estar presente en el medio de reacción, lo cual se puede conseguir mediante (a) peróxido de hidrógeno, (b) ácido ascórbico, o (c) concentraciones catalíticas de *o*-difenol y un reductor (NADH) para mantenerlo constante. En este trabajo se demuestra que HR es un sustrato de tirosinasa y se propone un mecanismo de acción. Su caracterización cinética proporciona una constante catalítica de $0.85 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ y una constante de Michaelis de $60.31 \pm 6.73 \text{ }\mu\text{M}$.

4.3.4. Url

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b02523>

4.4. ARTÍCULO 4.

4.4.1. Título

Caracterización cinética de inhibidores análogos a sustratos de tirosinasa.

4.4.2. Referencia

International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life (IUBMB Life. 2015) 67, 757-767.

4.4.3. Resumen

El desarrollo de inhibidores efectivos de tirosinasa ha tomado un interés creciente en la industria cosmética, médica y de agricultura por su aplicación como agentes antipardeantes y despigmentantes. Los mecanismos de acción de tirosinasa sobre monofenoles y *o*-difenoles son complejos, especialmente en el caso de monofenoles, debido al período de retardo que se produce al inicio de la reacción. Cuando se estudian inhibidores de la enzima, el problema se complica ya que el período de retardo aumenta, lo que ha llevado a la identificación errónea del tipo de inhibición que muchos compuestos ejercen sobre la actividad monofenolasa y a la determinación imprecisa de sus constantes de inhibición. Cuando los grados de inhibición de un inhibidor que es análogo a los sustratos de tirosinasa son los mismos para las actividades monofenolasa y difenolasa, el inhibidor se une a las mismas especies enzimáticas, y por tanto, las constantes de inhibición deben ser similares en ambas actividades. En este estudio demostramos este comportamiento típico de inhibidores análogos a sustratos de tirosinasa y proponemos una metodología para determinar el tipo de inhibición y las constantes de inhibición para las actividades monofenolasa y difenolasa de la enzima. El ácido benzoico y ácido cinámico fueron usados como inhibidores y los pares monofenol/*o*-difenoL-tirosina/L-dopa y α -metil-L-tirosina/ α -metil-L-dopa como sustratos.

4.4.4. Url

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1432/abstract;jsessionid=DC8D760B72F5F428CD37EA5A2C6AFEC2.f02t04>

4.5. ARTÍCULO 5.

4.5.1. Título

Caracterización cinética del oxiresveratrol como sustrato de tirosinasa.

4.5.2. Referencia

International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life (IUBMB Life. 2015) 67, 828-836.

4.5.3. Resumen

El oxiresveratrol es un estilbenoide descrito como un potente inhibidor de tirosinasa y propuesto como agente blanqueante y antipardeante. Sin embargo, la enzima es capaz de actuar sobre él, considerándolo un sustrato, como ya ha sido probado en el caso de su análogo resveratrol. Tirosinasa hidroxila al oxiresveratrol a un *o*-difenoil y oxida este último a una *o*-quinona, que finalmente isomeriza a *p*-quinona. Para que estas reacciones tengan lugar es necesaria la presencia de la forma enzimática E_{ox} (oxitirosinasa). El análisis cinético de los mecanismos propuestos ha permitido la caracterización cinética de esta molécula como sustrato de tirosinasa, obteniendo una constante catalítica de $5.39 \pm 0.21 \text{ sec}^{-1}$ y una constante de Michaelis de $8.65 \pm 0.73 \mu\text{M}$.

4.5.4. Url

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1439/abstract>

4.6. ARTÍCULO 6.

4.6.1. Título

Profundización sobre el efecto del pH en la catálisis de tirosinasa de champiñón.

4.6.2. Referencia

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2016) 125, 6-15.

4.6.3. Resumen

El pH tiene un gran efecto fisiológico en la catálisis de tirosinasa ya que los protones pueden actuar como inhibidores de tipo competitivo. En este trabajo se propone un mecanismo de reacción en el cual solo la protonación de las formas libres E_m (metatirosinasa) y E_{ox} (oxitirosinasa) tiene un efecto cinético significativo. El valor del pK_a calculado para tirosinasa es 4.63 ± 0.04 . Este valor de pK_a podría corresponder a un residuo que actúa como guardián del sitio activo, controlando el acceso del sustrato en función de su estado de protonación. En cuanto a la localización y la naturaleza del residuo responsable, proponemos que el ácido glutámico E322 podría ser un residuo clave en el efecto del pH sobre la actividad enzimática. Además, la naturaleza del sustrato tiene un gran efecto sobre el comportamiento cinético en función del pH, dependiendo de los valores de pK_a de los grupos hidroxilo fenólicos, y en menor medida, de la carga del grupo R. El comportamiento sigmoide de los valores de velocidad inicial vs. pH, debido al pK_a de la enzima en el rango de pH estudiado, podría cambiar a un comportamiento de campana cuando los valores de pK_a de los grupos hidroxilo son lo suficientemente bajos y el grupo R está cargado negativamente. Estos aspectos son interesantes para el control del pardeamiento de alimentos y para entender el papel que juega el pH del melanosoma en la pigmentación de la piel de humanos.

4.6.4. Url

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117715301284>

4.7. ARTÍCULO 7.

4.7.1. Título

Acción del ácido elágico en la ruta de biosíntesis de melanina.

4.7.2. Referencia

Journal of Dermatological Science (2016) 82, 115-122.

4.7.3. Resumen

Historial: Tirosinasa es una enzima implicada en las primeras etapas del proceso de melanogénesis. Cataliza la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles y la oxidación de estos últimos a *o*-quinonas. El ácido elágico (EA) es un compuesto fenólico que ha sido descrito como inhibidor de tirosinasa y es usado en la industria cosmética como agente blanqueante. Sin embargo, EA tiene grupos hidroxilo en posición *orto* y podría actuar como sustrato en lugar de inhibidor. Este aspecto se debe tener en cuenta cuando se usa este compuesto como ingrediente cosmético, debido al carácter reactivo de las *o*-quinonas.

Objetivo: Determinar si el ácido elágico es un sustrato o un inhibidor de tirosinasa, caracterizarlo cinéticamente e interpretar su papel en el proceso de melanogénesis.

Métodos: Se usó espectrofotometría UV-vis para seguir la acción de tirosinasa sobre sus sustratos típicos y ácido elágico. Se eligió un método cronométrico para la caracterización cinética del ácido elágico.

Resultados: El ácido elágico no es un inhibidor *per se* sino un sustrato alternativo de tirosinasa. Es oxidado por la enzima a una *o*-quinona inestable. Su caracterización cinética proporcionó bajos valores de las constantes de Michaelis y catalítica ($K_M^{EA} = 138 \pm 13 \mu\text{M}$ y $k_{cat}^{EA} = 0.47 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$). Además, el ácido elágico, que es un potente antioxidante, puede reducir químicamente las *o*-quinonas (*o*-dopaquinona) y semiquinonas, inhibiendo de este modo la melanogénesis.

Conclusión: El ácido elágico es oxidado por tirosinasa, produciendo *o*-quinonas reactivas. Como antioxidante puede inhibir el proceso de la melanogénesis. Este primer aspecto se debe tener en cuenta en su aplicación como ingrediente cosmético debido a la toxicidad de las *o*-quinonas y su capacidad para modificar el estado redox de la célula.

4.7.4. Url

[http://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811\(16\)30016-0/abstract](http://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811(16)30016-0/abstract)

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 detalladas en los diferentes capítulos pueden resumirse en varias conclusiones específicas:

1. Se ha desarrollado una metodología que permite determinar si un compuesto fenólico es un sustrato o un inhibidor de tirosinasa.
2. En primer lugar se ensaya la actividad de la enzima sobre el compuesto bajo estudio. En el caso de monofenoles cuyas *o*-quinonas no acumulan *o*-difenol en el medio, no se observará actividad alguna aunque se trate de sustratos de la enzima, ya que es necesaria la presencia de la forma enzimática E_{ox} (activa sobre monofenoles) para que tenga lugar la catálisis.
3. Esta metodología compara los grados de inhibición obtenidos en las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa. Si el valor es el mismo, se puede determinar que el compuesto es un inhibidor. Si los grados de inhibición en ambas actividades son distintos, se necesitan dos pasos más para poder discernir si el compuesto bajo estudio es sustrato o inhibidor.
4. Los compuestos fenólicos que no muestran reacción con las *o*-quinonas del L-dopa o TBC generadas por oxidación con peryodato sódico, pueden ser analizados en los ensayos de consumo de oxígeno. Si el nivel de absorbancia alcanzado al final de la reacción es el mismo en ausencia y presencia del compuesto de interés, se trata de un inhibidor verdadero de la enzima.
5. Si el compuesto de interés es un monofenol, el uso de peróxido de hidrógeno permite la acción de la enzima sobre él (en caso de ser sustrato), ya que

- transforma la forma E_m , inactiva sobre monofenoles, en E_{ox} , activa sobre los mismos.
6. Las medidas de actividad monofenolasa se deben realizar añadiendo al medio de ensayo la concentración de *o*-difenol necesaria para eliminar el período de retardo que aparece al inicio de la reacción y que puede generar interferencias en la medida.
 7. La validez experimental de esta metodología se puso de manifiesto con los inhibidores ácido benzoico, ácido cinámico, y los sustratos guayacol, isoeugenol, carvacrol, 4-*tert*-butilfenol, eugenol y arbutina.
 8. Los hidroxialquilfenoles alcohol *p*-hidroxibencílico y tirosol, y los compuestos fletina y su derivado floricina, descritos en la bibliografía como inhibidores de tirosinasa, han sido identificados como sustratos alternativos de la enzima utilizando la metodología anteriormente descrita.
 9. El 4-hexilresorcinol, un compuesto ampliamente usado como despigmentante y antipardeante en la industria cosmética y alimentaria, ha sido identificado como sustrato alternativo de tirosinasa. Este compuesto es hidroxilado y posteriormente oxidado por la enzima a una *o*-quinona, que rápidamente isomeriza a *p*-quinona.
 10. Se ha llevado a cabo la caracterización cinética del 4-hexilresorcinol como sustrato, obteniendo un bajo valor de $K_M = 60.31 \pm 6.73 \mu\text{M}$ (alta afinidad por la enzima) y una constante catalítica también baja $k_{cat} = 0.85 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$.
 11. La gran afinidad de este compuesto por la enzima podría ser explicada por el efecto hidrofóbico de la cadena lateral, y el bajo valor de la constante catalítica, por el impedimento estérico.
 12. Los inhibidores análogos a sustratos de tirosinasa que producen el mismo grado de inhibición en las actividades monofenolasa y difenolasa, se unen a las mismas especies enzimáticas en ambas actividades. Esto implica que el tipo y

- las constantes de inhibición sean también similares en las dos actividades de la enzima.
13. Se propone una metodología para determinar el tipo y las constantes de inhibición en las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa.
 14. Los valores de K_I^{ap} para los ácidos benzoico y cinámico muestran una ligera dependencia de la naturaleza del sustrato, a través de las constantes de velocidad de unión de los sustratos a las formas E_m y E_{ox} , k_2 y k_6 respectivamente. El estudio se realizó con las parejas de sustratos L-tirosina/L-dopa y α -metil-L-tirosina / α -metil-L-dopa.
 15. Se ha identificado al oxiresveratrol, un estilbenoide descrito como potente inhibidor de la enzima, como un sustrato alternativo de tirosinasa. Este compuesto es hidroxilado y posteriormente oxidado por tirosinasa a una *o*-quinona que finalmente isomeriza a *p*-quinona.
 16. Se ha caracterizado cinéticamente al oxiresveratrol como sustrato de tirosinasa. Este compuesto tiene mucha afinidad por la enzima ($K_M = 8.65 \pm 0.73 \mu\text{M}$) y una constante catalítica $k_{\text{cat}} = 5.39 \pm 0.21 \text{ s}^{-1}$.
 17. Del estudio del efecto del pH sobre la catálisis de tirosinasa en sus dos actividades monofenolasa y difenolasa, se deduce que un grupo con un $\text{p}K_a$ de 4.63 ± 0.04 puede ser el responsable del comportamiento observado.
 18. La protonación de este grupo inhibe a la enzima. Los protones se comportan por tanto, como inhibidores competitivos uniéndose a las formas enzimáticas libres meta y oxirosinasa.
 19. El $\text{p}K_a$ de los grupos hidroxilo fenólicos y en menor medida la carga de grupo R, son importantes en el comportamiento de la actividad enzimática frente al pH.
 20. Mediante estudios de *docking* se propone que el grupo responsable del efecto del pH podría corresponder al ácido glutámico E322, que controlaría el acceso de los sustratos al sitio activo mediante la interacción por puente de hidrógeno

entre el grupo carboxilo desprotonado del ácido glutámico y el grupo hidroxilo fenólico.

21. Se ha demostrado espectrofotométricamente que el ácido elágico es un sustrato alternativo de tirosinasa.
22. Se ha llevado a cabo la caracterización cinética del ácido elágico como sustrato, obteniendo las constantes cinéticas $K_M = 138 \pm 13 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 0.47 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$.
23. El ácido elágico actúa como antioxidante reaccionando con los aniones superóxido, *o*-quinonas y semiquinonas generadas en el proceso de la melanogénesis, inhibiendo de este modo la ruta.

5.2. CONCLUSIONES GENERALES.

El conjunto de conclusiones específicas descrito anteriormente permite establecer las siguientes conclusiones generales:

1. Se ha desarrollado una metodología que permite discernir entre inhibidores y sustratos alternativos de tirosinasa.
2. Con ayuda de esta metodología se han identificado los compuestos alcohol *p*-hidroxibencílico, tirosol, floretina y floricina como sustratos alternativos de tirosinasa.
3. Oxiresveratrol y 4-hexylresorcinol han sido identificados y caracterizados cinéticamente como sustratos de tirosinasa.
4. Se ha determinado que los inhibidores análogos a sustratos de tirosinasa que producen el mismo grado de inhibición en las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa, se unen a las mismas formas enzimáticas, dan lugar a la misma constante de inhibición y se comportan como inhibidores de tipo competitivo. Se propone una metodología para estudiar la inhibición de esta enzima.

5. Los protones se comportan como inhibidores de tirosinasa de tipo competitivo. Se ha propuesto un ácido glutámico como responsable del efecto del pH en la catálisis de la enzima. Además, la naturaleza del sustrato tiene un gran efecto cinético sobre el comportamiento en función del pH.
6. Se ha confirmado por métodos espectrofotométricos la acción de tirosinasa sobre el ácido elágico como sustrato y se ha llevado a cabo su caracterización cinética. Este compuesto actúa como inhibidor de la melanogénesis a través de su alto poder antioxidante.

RESUMEN

6. RESUMEN

6.1. ANÁLISIS Y DISCRIMINACIÓN ENTRE SUSTRATOS E INHIBIDORES DE TIROSINASA.

Tirosinasa es una cuproproteína ampliamente distribuida en toda la escala filogenética, que participa en las primeras etapas del proceso de biosíntesis de melaninas. Esta enzima cataliza fundamentalmente dos tipos de reacciones, la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de estos últimos a *o*-quinonas (actividad difenolasa), utilizando en ambos casos oxígeno molecular. La hiperpigmentación es un fenómeno que afecta a gran cantidad de personas y el pardeamiento enzimático de frutas, verduras y crustáceos, entre otros, produce grandes pérdidas económicas en la industria alimentaria. Una estrategia usada para evitar estos procesos es la inhibición de la enzima tirosinasa, por lo que en los últimos años se han identificado y caracterizado gran cantidad de inhibidores. Sin embargo, la complejidad del mecanismo de acción de esta enzima y el carácter reactivo de las *o*-quinonas producto de reacción, hace que en muchos casos los inhibidores no estén caracterizados de forma correcta e incluso sean identificados como tales, siendo realmente sustratos alternativos de la enzima. Este aspecto se debe tener en cuenta al utilizar estos compuestos en la industria cosmética y alimentaria debido a la toxicidad de las *o*-quinonas producto de reacción y a su capacidad para modificar el estado redox de las células en las que actúa tirosinasa.

Los principales objetivos de esta Tesis Doctoral fueron la profundización en los mecanismos de actuación y de inhibición de la enzima tirosinasa, atendiendo a sus dos actividades (monofenolasa y difenolasa), además del establecimiento de una metodología para discernir entre moléculas fenólicas inhibidoras y sustratos alternativos de la enzima. También la identificación y caracterización cinética como sustratos de algunas de las moléculas descritas como inhibidores de tirosinasa o usadas en la

industria cosmética y alimentaria como despigmentantes o antipardeantes, respectivamente.

Para lograr estos objetivos utilizamos distintas técnicas experimentales como la cromatografía de proteínas en FPLC (para la purificación de tirosinasa), distintos ensayos espectrofotométricos (para las medidas de actividad, estudio de inhibidores y determinación de la concentración de proteínas), ensayos oximétricos (para medidas de actividad siguiendo el consumo de oxígeno), ensayos de RMN (para obtener valores de desplazamiento químico) y *docking* computacional (para entender los modos de unión de tirosinasa con distintos ligandos). También se llevaron a cabo análisis de regresión lineal y no lineal y ensayos de simulación de los mecanismos propuestos, mediante integración numérica de las ecuaciones diferenciales que los describen.

En primer lugar se investigó una metodología para discernir entre inhibidores y sustratos alternativos de la enzima, estudiando las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa. Tras estudiar los grados de inhibición producidos por distintas moléculas inhibitoras y por sustratos alternativos de la enzima en ambas actividades, llegamos a la conclusión de que si el grado de inhibición producido en la actividad monofenolasa (i_M) y difenolasa (i_D) es el mismo, la molécula es un inhibidor. Si $i_M \neq i_D$ es necesario realizar dos pasos más. Si la absorbancia final alcanzada en los ensayos de consumo de oxígeno es la misma en ausencia y presencia de la molécula de interés, se trata de un inhibidor verdadero, sin embargo, si dicha absorbancia es distinta y tras probar la acción de la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno observamos variación en la absorbancia, la molécula es un sustrato alternativo. El peróxido de hidrógeno permite la transformación de la forma enzimática metatirosinasa (E_m), inactiva sobre monofenoles, en oxitirosinasa (E_{ox}), activa sobre los mismos. Se propusieron distintos mecanismos de actuación y se realizaron ensayos de simulación para confirmar los resultados obtenidos. Además, se estableció que las medidas de actividad monofenolasa deben realizarse añadiendo al medio de reacción la cantidad de *o*-difeno

necesaria para eliminar el periodo de retardo característico de esta actividad que puede producir interferencias en la medida. Esta cantidad viene dada por la relación $R = [D]_{ss}/[M]_{ss}$ donde $[D]_{ss}$ y $[M]_{ss}$ son las concentraciones de *o*-difenol y monofenol en estado estacionario, respectivamente. Esta metodología fue posteriormente utilizada para la identificación como sustratos alternativos de los hidroxialquilfenoles alcohol *p*-hidroxibencílico y tirosol y de los compuestos floretina y su derivado floricina, descritos en la bibliografía como inhibidores de tirosinasa.

Posteriormente, se investigó el compuesto 4-hexilresorcinol, ampliamente usado en la industria cosmética y alimentaria como agente blanqueante y antipardeante, y el oxiresveratrol, propuesto para los mismos fines gracias a su ya descrito efecto inhibitorio sobre la enzima tirosinasa. Demostramos que estos dos compuestos no son inhibidores sino sustratos alternativos de la enzima, conclusión a la que llegamos tras probar la acción de tirosinasa sobre ellos en presencia de: (a) peróxido de hidrógeno, (b) ácido ascórbico, y /o (c) cantidades catalíticas de *o*-difenol (*tert*-butilcatecol) y un reductor (NADH). Gracias a estas estrategias conseguimos generar de manera continua la forma enzimática E_{ox} , necesaria para que tenga lugar la actividad monofenolasa. Estos dos compuestos son hidroxilados y posteriormente oxidados por la enzima, dando lugar a una *o*-quinona que isomeriza a una *p*-quinona más estable. También llevamos a cabo la caracterización cinética de estos dos compuestos como sustratos, obteniendo unos valores de la constante de Michaelis y la constante catalítica de $K_M = 60.31 \pm 6.73 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 0.85 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, para el 4-hexilresorcinol, y $K_M = 8.65 \pm 0.73 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 5.39 \pm 0.21 \text{ s}^{-1}$, para el oxiresveratrol.

El ácido elágico, descrito como inhibidor de tirosinasa y usado como despigmentante en la industria cosmética, también fue identificado y caracterizado cinéticamente como sustrato de tirosinasa, mediante métodos espectrofotométricos, obteniendo unos valores de $K_M = 138 \pm 13 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 0.47 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$. Por otro lado, se estudió el papel del ácido elágico como antioxidante en la ruta de biosíntesis de melaninas. Este compuesto actúa reaccionando con los aniones superóxido, las *o*-

quinonas y semiquinonas generadas en el proceso de la melanogénesis, inhibiendo de este modo la ruta.

Además, se investigó el mecanismo de actuación de los inhibidores de tirosinasa análogos a sustratos fenólicos, utilizando los inhibidores ácido cinámico y ácido benzoico y las parejas de sustratos monofenol / *o*-difenoil, L-tirosina / L-dopa y α -metil-L-tirosina / α -metil-L-dopa. Se estableció que aquellos inhibidores análogos a sustratos fenólicos que producen el mismo grado de inhibición en las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa, se unen a las mismas especies enzimáticas en ambas actividades, lo que implica que el tipo y las constantes de inhibición también sean similares. Del mismo modo, se estableció una metodología para determinar el tipo y las constantes de inhibición en ambas actividades y se observó que los valores de K_I^{ap} muestran una ligera dependencia de la naturaleza del sustrato, a través de las constantes de velocidad de unión de los sustratos a las formas E_m y E_{ox} , k_2 y k_6 respectivamente. Mediante ensayos de simulación de los mecanismos propuestos se confirmaron los datos experimentales obtenidos.

Finalmente, se profundizó en el mecanismo de acción de tirosinasa, en concreto en el efecto del pH en la catálisis de la enzima. De los resultados obtenidos se deduce que un grupo con un $\text{p}K_a$ de 4.63 ± 0.04 podría ser el responsable del efecto del pH. La protonación de este grupo inhibe a la enzima, por lo que los protones se comportan como inhibidores competitivos uniéndose a las formas enzimáticas libres E_m y E_{ox} . Estudios de *docking* computacional nos llevaron a proponer al ácido glutámico E322 como grupo responsable del efecto del pH, controlando el acceso de los sustratos al sitio activo. Además, se vio que el $\text{p}K_a$ de los grupos hidroxilo fenólicos y en menor medida la carga de grupo R, también son importantes en el comportamiento de la actividad enzimática frente al pH.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi,N.R., Shaw,H.M., Rigel,D.S., Friedman,R.J., McCarthy,W.H., Osman,I., Kopf,A.W. y Polsky,D. (2004) Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* **292**, 2771-2776.
- 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.
- Aberg,C.M., Chen,T., Olumide,A., Raghavan,S.R. y Payne,G.F. (2004) Enzymatic grafting of peptides from casein hydrolysates to chitosan. Potential for value-added byproducts from food-processing wastes. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 788-793.
- 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.
- 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.
- Allouche,A.R. (2011) Gabedit—a graphical user interface for computational chemistry software. *J. Comput. Chem.* **32**, 174–82.
- 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.
- Anghileri,A., Lantto,R., Kruus,K., Arosio,C. y Freddi,G. (2007) Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. *J. Biotechnol.* **127**, 508-519.
- 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.
- Aranow,C. (2011) Vitamin D and the immune system. *J. Investig. Med.* **59**, 881-886.
- Arcaro,A. y Guerreiro,A.S. (2007) The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr. Genomics* **8**, 271-306.
- Aris,M y Barrio,M.M. (2015) Combining immunotherapy with oncogene-targeted therapy: a new road for melanoma treatment. *Front. Immunol.* **6**, 46.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Yechezkel,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.
- Ballantyne,A.D. y Garnock-Jones,K.P. (2013) Dabrafenib: first global approval. *Drugs* **73**, 1367-1376.
- 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.
- Barsh,G.S. (1996) The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends. Genet.* **12**, 229-305.
- 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.
- Ben-Yosef,V.S., Sendovski,M. y Fishman,A. (2010) Directed evolution of tyrosinase for enhanced monophenolase/diphenolase activity ratio. *Enzyme Microb. Technol.* **47**, 372-376.
- 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.
- 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.
- Billaud,C., Philippon,J. y Rouet-Mayer,M.A. (2003) Browning/Enzymatic-biochemical aspects. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, pp 678-686.
- Boissy,R.E. y Nordlund,J.J. (1997) Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Res.* **10**, 12-24.
- Boonstra,A., Barrat,F.J., Crain,C., Heath,V.L., Savelkoul,H.F. y O'Garra,A. (2001) 1alpha,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.

- Box,N.F. y Terzian,T. (2008) The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 525-33.
- 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.
- 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.
- Busca,R. y Ballotti,R. (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60-69.
- 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.
- Cadigan,K.M. y Nusse,R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286-3305.
- Cardinali,G., Ceccarelli,S., Kovacs,D., Aspite,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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Cerenius, L. y Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 116-126.
- Cestari, T.F., Dantas, L.P. y Boza, J.C. (2014) Acquired hyperpigmentations. *An. Bras. Dermatol.* **89**, 11-25.
- 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., 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. y Wu, C.Y. (2008) Suicide substrate of tyrosinase and use thereof Patente N. US2008/0317692 A1.
- 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.
- 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.
- Chaudhuri, R.K. (2008) Skin lightening cosmetic compositions. U.S. Pat. Appl. Publ. US 20080305059, Dec 11, 2008. *Chem. Abstr.* **150**, 40863.
- 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.S., Wei, C. y Marshall, M.R. (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
- Chen, T., Embree, H.D., Wu, L.Q. y Payne, G.F. (2002) In vitro protein-polysaccharide conjugation: tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatine and chitosan. *Biopolymers* **64**, 292-302.
- 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.
- 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.
- 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.

- Claus,H. y Decker,H. (2006) Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 3-14.
- Conrad,J.S., Dawso,S.R., Hubbard,E.R., Meyers,T.E. y Strothkamp,K.G. (1994) Inhibitor binding to the binuclear active site of tyrosinase: temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects. *Biochemistry* **33**, 5739-5744.
- Cuff,M.E., Miller,K.I., van Holde,K.E. y Hendrickson,W.A. (1998) Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.* **278**, 855-870.
- Cui,R., Widlund,H.R., Feige,E., Lin,J.Y., Wilensky,D.L., Igras,V.E., D'Orazio,J., Fung,C.Y., Schanbacher,C.F., Granter,S.R. y Fisher,D.E. (2007) Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853-864.
- Curtin,J.A., Fridlyand,J., Kageshita,T., Patel,H.N., Busam,K.J., Kutzner,H., Cho,K.H., Aiba,S., Bröcker,E.B., LeBoit,P.E., Pinkel,D. y Bastian,B.C. (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N.Engl. J. Med.* **353**, 2135-2147.
- 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.
- Dawley,R.M. y Flurkey,W.H. (1993) 4-Hexylresorcinol, a Potent Inhibitor of Mushroom Tyrosinase . *J. Food Sci.* **58**, 609.
- deCaprio,A.P. (1999) The toxicology of hydroquinone-relevance to occupational and environmental exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* **29**, 283-330.
- 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.
- 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.
- Decker,H. Schweikardt,T., Nillius,D., Salzbrunn,U., Jaenicke,E. y Tuczec,F. (2007) Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* **398**, 183-191.
- 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.
- del Marmol,V. y Beerman,F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**, 161-168.
- Dessinioti,C., Stratigos,A.J., Rigopoulos,D. y Katsambas,D. (2009) A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Exp. Dermatol.* **18**, 741-749.
- 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.
- Dinçer,A., Becerik,S. y Aydemir,T. (2012) Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 815-820.
- Dorsky,R.I., Moon,R.T. y Raible,D.W. (1998) Control of neural crest cell fate by the Wnt signaling pathway. *Nature* **396**, 370-373.
- Draeos,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.
- 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.
- Durán, N. y Esposito, E. (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B-Environ.* **28**, 83-99.
- Eastman, Q. y Grosschedl, R. (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 233-240.
- 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.
- Endrenyi, L. (Ed.) (1981) *Kinetic Data Analysis: Design and Analysis of Enzyme and Pharmacokinetics Experiments*. Plenum Press, New York.
- Englaro, W., Bertolotto, C., Busca, R., Brunet, A., Pages, G., Ortonne, J.P. y Ballotti, R. (1998) Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **273**, 9966-9970.
- 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.
- 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. (1999) 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,Y. y Flurkey,W.H. (2004) Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. *Phytochemistry* **65**, 671-678.
- 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.
- Famun,D.G. (1975) Charge density-NMR chemical shift correlations in organic ions En: *Advances in Physical Organic Chemistry*, pp. 123-173.
- 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 instable 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 an 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.
- 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.
- 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.
- Fleischman,R.A., Saltman,D.L., Stastny,V. y Zneimer,S. (1991) Deletion of c-kit proto-oncogene in the human developmental defect piebaldism trait. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10885-10889.

- Flurkey, W.H. e Inlow, J.K. (2008) Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 2160-2170.
- Frankos, V.H., Schmidt, D.F., Haws, L.C., McEvely, 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.
- Fu, B., Li, H., Wang, X., Lee, F.S. y Cui, S. (2005) Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7408-7414.
- 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.
- 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.
- 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 betaxanthins: 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., Fenoll,L.G., Rodríguez-López,J.N., Varon,R., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2005c) 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., 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. *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., García-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.
- Gariyban,L. y Fisher,D.E. (2010). How sunlight causes melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* **12**, 319-326.

- Garraway,L.A., Widlund,H.R., Rubin,M.A., Getz,G., Berger,A.J., Ramaswamy,S. Beroukhim,R., Milner,D.A., Granter,S.R., Du,J., Lee,C., Wagner,S.N., Li,C., Golub,T.R., Rimm,D.L., Meyerson,M.L., Fisher,D.E. y Sellers,W.R. (2005) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**, 117-122.
- 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.
- Gerald,C.F. y Wheatley, P.O. (1989) *Applied numerical analysis. Fourth edition.* Addison Wesley P. C., New York.
- 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.
- 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.
- Giebel,L.B. y Spritz,R.A. (1991) Mutation of the KIT (mast/stem-cell factor receptor) proto-oncogene in human piebaldism. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8696-8699.
- Giehl,K. (2005) Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. *Biol. Chem.* **386**, 193-205.
- Gil,J. y Peters,G. (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 667-677.
- 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.
- Goding,C.R. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* **14**, 1712-1728.
- Goel,V.K., Lazar,A.J., Warneke,C.L., Redston,M.S., Haluska,F.G. (2006) Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 154-160.
- 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.
- Greco, G., Wakamatsu, K., Panzella, L., Ito, S., Napolitano, A. y d'Ischia, M. (2009) Isomeric cysteinildopas provide a (photo) degradable bulk componen and a robust structural element in red human hair pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 319-327.
- Grichnik, J.M. (2006). Kit and melanocyte migration. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 945-947.
- Grimes, P.E. (2005) Melasma: etiologic and therapeutic considerations. *Arch. Dermatol.* **131**, 1453-1457.
- Grundmann, C. (1977) In *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*. Georg Thieme, Stuttgart, Vol. VII/3A, pp. 768.
- 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.
- Gutteridge, S. y Robb, D. (1975) The catecholase activity of *Neurospora* tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **54**, 107-116.
- 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.
- Halaoui, 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.
- 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, H.Y., Zou, H.C., Jeon, J.Y., Wang, Y.J., Xu, W.A., Yang, J.M. y Park, Y.D. (2007) The inhibition kinetics and thermodynamic changes of tyrosinase via the zinc ion. *Biochim. Biophys. Acta.* **1774**, 822-827.
- Han, R., Cui, L., Ai, S., Yin, H., Liu, X. y Qiu, Y. (2012) Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized in hydrotalcite-like compounds film for the determination of polyphenols. *J. Solid State Electrochem.* **16**, 449-456.
- 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., Mirakhor,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. (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.
- 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.
- 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.
- Hiner,A.N., Hernandez-Ruiz,J., Amapo,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.
- 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., 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.
- Holm,R.H., Kennepohl,P. y Solomon,E.I. (1996) Structural and functional aspects of metal sites in Biology. *Chem. Rev.* **96**, 2239-2314.
- 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.
- Huber,S. y Mujica-Fernaud,T. (2009) Use of hydroxyphenylester-tyrosinase inhibitors for skin lightening cosmetics. PCT Int. Appl. WO2009021590, Feb 19, 2009. *Chem. Abstr.* **150**, 244611.

- Huey,R., Morris,G.M., Olson,A.J., y Goodsell,D.S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **28**, 1145-1152.
- Hurrell,R.F., Finot,P.A. y Cuq,J.L. (1982) Protein-polyphenol reactions.1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *Br. J. Nutr.* **47**, 191-211.
- Hutton,S.M. y Spritz,R.A. (2008) Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among nin-hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2442-2450.
- Ikeya,M., Lee,S.M., Johnson,J.E., McMahon, A.P. y Takada,S. (1997) Wnt signaling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **389**, 966-970.
- 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 immune responses to melanoma. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2769-2783.
- 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.
- Inoue,T., Shiota,Y. y Yoshizawa,K. (2008) Quantum chemical approach to the mechanism for the biological conversion of tyrosine to dopaquinone. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16890-16897.
- 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 Wakamatsu,K (2015) A convenient screening method to differentiate phenolic skin whitening tyrosinase inhibitors from leukoderma-inducing phenols. *J. Dermatol. Sci.* **80**, 18-24.
- 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.
- Jandel Scientific, Sigma Plot 9.0 for Windows™, Core Madera, 2006.
- Jeon,H.J., Noda,M., Maruyama,M., Matoba,Y., Kumagai,T. y Sugiyama,M. (2006) Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake less. *J Agric. Food. Chem.* **54**, 9827-9833.
- Jeon,S.H., Kim,K.H., Koh,J.U. y Kong,K.H. (2005) Inhibitory effects on L-dopa oxidation of tyrosinase by skin-whitening agents. *Bull. Korean Chem. Soc.* **26**, 1135-1137.
- Jiang,H., Wang,Y., Ma,C. y Kanost,M.R. (1997) Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 835-850.
- 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-Cervantes,C., Germer,S., Gonzalez,P., Sanchez,J. Sanchez,C.O. y Garcia-Borrón,J.C. (2001) Thr 40 and Met122 are new partial loss-of-function natural mutations of the human melanocortin 1 receptor. *FEBS Lett.* **508**, 44-48.
- 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.
- 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.
- Jordan,S.A. y Jackson,I.J. (2000) MGF (KIT ligand) is a chemokinetic factor for melanoblast migration into hair follicles. *Dev. Biol.* **225**, 424-436.
- 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.
- Kaintz,C., Mauracher,S.G. y Rompel,A. (2014) Type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **97**, 1-35.
- Kaintz,C., Mayer,R.L., Jirsa,F., Halbwirth,H. y Rompel,A. (2015) Site-directed mutagenesis around the CuA site of a polyphenol oxidase from *Coreopsis grandiflora* (cgAUS1). *FEBS Lett.* **589**, 789-797.
- Kamakshi,R. (2012) Fairness via formulations: a review of cosmetic skin-lightening ingredients. *J. Cosmet. Sci.* **63**, 43-54.
- Kamaraj,B. y Purohit,R. (2014) Mutational Analysis of Oculocutaneous Albinism: A Compact Review. *BioMed Res. Int.* **2014**, 905472, doi: 10.1155/2014/905472.

- Kamb,A., Shattuck-Eidens,D., Eeles,R., Liu,Q., Gruis,N.A., Ding,W., Hussey,C., Tran,T., Miki,Y., Weaver-Feldhaus,J., McClure,M., Aitken,J.F., Anderson,D.E., Bergman,W., Frants, R., Goldgar,D.E., Green,A., MacLennan,R., Martin,N.G., Meyer,L.J., Youl,P., Zone,J.J., Skolnick,M.H. y Cannon-Albright,L.A. (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat. Genet.* **8**, 23-26.
- Kane,J.B., Tompkins,R.G., Yarmush,M.L. y Burke,I.F. (1996) Burn dressings. En: *Biomaterials science an introduction to materials in medicine*. Ratner,B.D., Hoffman,A.S., Schoen,F.J. y Lemons J.E. (Eds). San Diego, Academic Press. pp. 360-370.
- Kanteev,M., Goldfeder,M., Chojnacki,M., Adir,N. y Fishman,A. (2013) The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 895-903.
- Kanteev,M., Goldfeder,M. y Fishman,A. (2015) Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Sci.* **24**, 1360-1369.
- 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.
- 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.
- Keilin,D. y Mann,T. (1938) Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **125**, 187-205.
- Khan,S.B., Azhar-Ui,H., Afza,N., Malik,A., Khan,M.T., Shah,M.R. y Choudhary,M. (2005) Tyrosinase-inhibitory long-chain esters from *Amberboa ramosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 86-89.
- 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., Hwang,E.S., Lee,J.E., Kim,S.Y., Kwon,S.B. y Park,K.C. (2003) Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* **116**, 1699-1706.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. (1998) Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273**, 31801-31805.

- 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.
- 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.
- Kondo,T. y Hearing,V.J. (2011) Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev. Dermatol.* **6**, 97-108.
- 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.
- Kubo,I., Kinst-Hori,I., 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.
- Kushimoto,T., Basrur,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.
- Kutyrev,A.A. y Moskva,V.V. (1991) Nucleophilic reactions of quinones. *Usp. Khim.* **60**, 134-168.
- 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.
- 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* peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1003-1008.
- Lee,H.S. (2002) Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1400-1403.
- Lee,K.Y. y Mooney D.J. (2001) Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.* **101**, 1869-1879.

- 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,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.
- Lejeune,F., Liénard,D., Eggermont,A., Schraffordt Koops,H., Kroon,B., Gérain,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.
- Lenhart,J.L., Chaubal,M.V., Payne,G.F. y Barbari,T.A. (1998) Enzymatic modification of chitosan by tyrosinase. En: *Enzymes in polymer synthesis*. Gross,R.A., Kaplan,D.I. y Swift,G. (Eds). Washington DC; American Chemical Society Symposium Series 684. pp. 188-198.
- 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. (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. (1988) Protein and active-site structure of tyrosinase. *Prog. Clin. Biol. Res.* **256**, 85-98.
- 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. (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.
- 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.
- Liu,N., Zhang,T., Wang,Y.J., Huang,Y.P., Ou,J.H. y Shen,P. (2004) A heat inducible tyrosinase with distinct properties from *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 407-412.
- Liu,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.
- 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.
- Maeda, K. y Fukuda, M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**, 361-368.
- Makino, N. y Mason, H.S. (1973) Reactivity of oxytyrosinase toward substrates. *J. Biol. Chem.* **248**, 5731-5735.
- Makino, N., McMahon, P. y Mason, H.S. (1974) The oxidation state of copper in resting tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **249**, 6062-6066.
- Mallapragada, S.K. y Narasimhan, B. (2008) Immunomodulatory biomaterials. *Int. J. Pharm.* **364**, 265-271.
- Mallarkey, G. y Coombes, R.C. (2013) Targeted therapies in medical oncology: successes, failures and next steps. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **5**, 5-16.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Odaka, Y., Ogawa, N., Nakamoto, K. y Kuninaga, H. (2008) Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *J. Agric. Food Chem.* **56**, 597-601.
- Matheis, G. y Whitaker, J.R. (1984) Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J. Food Biochem.* **8**, 137-162.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H. y Sugiyama, M. (2006) Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8981-8990.
- Matoba, Y., Bando, N., Oda, K., Noda, M., Higashikawa, F., Kumagai, T. y Sugiyama, M. (2011) A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 30219-30231.
- 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.
- Mattner, F., Smioldo, 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.
- Maverakis,E., Miyamura,Y., Bowen,M.P., Correa,G., Ono,Y. y Goodarzi,H. (2010) Light, including ultraviolet. *J. Autoimmun.* **34**, J247-J257.
- 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.
- McEvily,A.J., Iyengar,R. y Gross,A. (1993) Browning inhibitors for foods and beverages. PCT Int. Appl. WO 9222213, Dec 23, 1992; *Chem. Abstr.* **118**, 146573.
- Ménasché,G., Hsuan,H.H., Sanal,O., Feldmann,J., Tezcan,I., Ersoy,F., Houdusse,A., Fischer,A. y de Saint Basile,G. (2003) Griselli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J Clin Invest.* **112**, 450-6.
- 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.
- 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.
- Michaloglou,C., Vredevelde,L.C., Soengas,M.S., Denoyelle,C., Kuilman,T., van der Horst,C.M., Majoor,D.M., Shay,J.W., Mooi,W.J. y Peeper,D.S. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-724.
- Min,K., Park,D.H. y Yoo,Y.J. (2010) Electroenzymatic synthesis of L-Dopa. *J. Biotechnol.* **146**, 40-44.
- 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.
- Miranda,M., Bonfigli,A., Zarivi,O., Manilla,A., Cimini,A. y Arcadi,A. (1987) Restriction patterns of model DNA treated with 5,6-dihydroxyindole, a potent cytotoxic intermediate of melanin synthesis-effect of UV irradiation. *Mutagenesis* **2**, 45-50.
- 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.* **124**, 9332-9333.
- 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.
- Miyamura,Y., Coelho,S., Wolber,R., Miller,S.A., Wakamatsu,K., Zmudska,B.Z., Ito,S., Smuda,C., Passeron,T., Choi,W., Batzer,J., Yamaguchi,Y., Beer,J.Z. y Hearing,V.J. (2007) Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* **20**, 2-13.

- 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.
- 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.
- Molina, F.G., Muñoz, J.L., Varón, R., López, J.N., Cánovas, F.G. y Tudela, J. (2007) An approximate analytical solution to the lag period of monophenolase activity of tyrosinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 238-252.
- 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.
- 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.
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R. K., Goodsell, D.S. y Olson, A.J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785-2791.
- Muñoz, J., García-Molina, F., Varón, R., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2006) Calculating molar absorptivities for quinones: application to the measurement of tyrosinase activity. *Anal. Biochem.* **351**, 128-138.
- Muñoz-Muñoz, J., 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-López, 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 biosynthesis 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., Varón, 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. *J. Math. Chem.* **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, J.N. (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.
- 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.
- Napolitano, A., Di Donato, P. y Prota, G. (2000) New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1,4-benzothiazine-o-quinonimine intermediate. *Biochim. Biophys. Acta* **1475**, 47-54.
- 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.

- Nerya,O., Musa,R., Khatib,S., Tamir,S. y Vaya,J. (2004) Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry* **65**, 1389-1395.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nokinsee,D., Shank,L., Lee,V.S. y Nimmanpipug,P. (2015) Estimation of inhibitory effect against tyrosinase activity through homology modeling and molecular docking **2015**, 262364. Doi: 10.1155/2015/262364.
- 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.
- 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.
- Ohguchi,K., Tanaka,T., Iliya,I., Ito,T., Iinuma,M., Matsumoto,K., Akao,Y. y Nozawa,Y. (2003) Gnetol as a potent tyrosinase inhibitor from genus *Gnetum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 663-665.
- Olivares,C., Jiménez-Cervantes,C., Lozano,J.A., Solano,F. y García-Borrón,J.C. (2001) The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem. J.* **354**, 131-139.
- Olivares,C., García-Borrón,J.C. y Solano,F. (2002) Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* **41**, 679-686.
- Olivares,C. y Solano,F. (2009) New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 750-760.
- 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.
- Olsa,G.H., bin Saari,N., Selamat,J. y Bakar,J. (2000) Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sago*): partial purification, activation, and some properties. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5041-5045.
- Oren,M. y Bartek,J. (2007) The sunny side of p53. *Cell.* **128**, 826-828.

- 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.
- 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.
- Osaki, S. (1963) The mechanism of tyrosine oxidation by mushroom tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 378-384.
- 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., Capone, M., Ascierto, M.L., Gentilcore, G., Stroncek, D.F., Casula, M., Sini, M.C., Palla, M., Mozzillo, N. y Ascierto, P.A. (2009) Main roads to melanoma. *J. Transl. Med.* **14**, 86.
- Palmieri, G., Ombra, M., Colombino, M., Casula, M., Sini, M., Manca, A., Paliogiannis, P., Ascierto, P.A. y Cossu, A. (2015) Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Front. Oncol.* **5**, 183.
- 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., 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. y Gilchrist, B.A. (1999) Signaling pathways mediating melanogenesis. *Cell Mol. Biol.* **45**, 919-930.
- 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.
- Pastural, E., Barrat, F.J., Dufourcq-Lagelouse, R., Certain, S., Sanal, O., Jabado, N., Seger, R., Griscelli, C., Fischer, A. y de Saint Basile, G. (1997) Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet.* **16**, 289-92.
- Patai, S. y Rappoport, Z. (1988) In *The Chemistry of the Quinonoid Compounds*. Wiley, New York, Vol. 2, pp. 1.
- 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., Sansone, M., Kock, N., Christie, G., Halaban, R., Hendee, J., Lerner, A.B. y Varga, J.M. (1975) Melanoma cells resistant to inhibition of growth by melanocyte stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **72**, 951-955.
- Pawelek, J.M. y Lerner, A.B. (1978) 5,6-dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. *Nature* **276**, 626-628.

- 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., Hiner,A.N., Rodríguez-López,J.N., García-Cánovas,F. y Tudela,J. (2002) 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.
- Peppas,N.A. y Sahlin,J.J. (1996) Hydrogels as mucoadhesive y bioadhesive materials: a review. *Biomaterials* **17**, 1553-1561.
- Pérez Hernandez,J., Frías Ancona,G. y Vergara López,A. (2010) *Dermatología Rev. Mex.* **54**, 315-320.
- 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.
- Pillaiyar,T., Manickam,M. y Jung,S.H. (2015) Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009-2014) *Expert. Opin. Ther. Pat.* **25**, 775-788.
- 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.
- Pomerantz,S.H. (1966) The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **241**, 161-168.
- 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.
- 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.
- 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* **S1**, 260-274.
- Ramsden,C.A. y Riley,P.A. (2010b) Studies of the competing rates of catechol oxidation and suicide inactivation of tyrosinase. *Arkivoc* **S1**, 248-254.
- Ramsden,C.A. y Riley,P.A. (2014) Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2388-2395.
- 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.

- Rathjen, A.H. y Robinson, S.P. (1992) Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.* **99**, 1619-1625.
- Reinhold, D.F., Utne, T. y Abrason, N.L. (1987) Process for L-dopa. United States patent 4716246.
- 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.I. y Gaviria, J.L. (2005) Review of skin-lightening agents. *Dermatol. Surg.* **31**, 886-889.
- 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. (2011) Structure-activity relationships of various amino-hydroxy-benzenesulfonic acids and sulfonamides as tyrosinase substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**, 799-807.
- 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., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Tudela, J., Thomeley, 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., Tudela, J. y García Cánovas, F. (2000b) *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., Gilabert, M.A., Tudela, J., Thorneley, R.N.F. y García-Cánovas, F. (2000c) Reactivity of horseradish peroxidase compound II toward substrates: kinetic evidence for a two-step mechanism. *Biochemistry* **39**, 13202-13209.
- 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.
- Rolff, M., Schottenheim, J., Decker, H. y Tuczek, F. (2011) Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 4077-4098.
- 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.
- 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.
- Rooryck, C., Morice-Picard, F., Elçioğlu, N.H., Lacombe, D., Taieb, A. y Arveiler, B. (2008) Molecular diagnosis of oculocutaneous albinism: new mutations in the OCA1-4 genes and practical aspects. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **21**, 583-587.
- 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-López, J.N. y García-Cánovas, 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.
- Ruan, L., Yu, Z., Fang, B., He, W., Wang, Y. y Shen, P. (2004) Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 286-289.
- Ryu, Y.B., Ha, T.J., Curtis-Long, M.J., Ryu, H.W., Gal, S.W. y Park, K.H. (2008) Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus ihou* (S.) Koids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **23**, 922-930.
- Saito, H., Yasumoto, K., Takeda, K., Takahashi, K., Yamamoto, H. y Shibahara, S. (2003) Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway. *Pigment Cell Res.* **16**, 261-265.
- 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.
- Sánchez-Amat, A., Lucas-Elío, P., Fernández, E., García-Borrón, J.C. y Solano, F. (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1547**, 104-116.
- Sánchez-Amat, A., Solano, F. y Lucas-Elío, P. (2010) Finding new enzymes from bacterial physiology: a successful approach illustrated by the detection of novel oxidases in *Marinomonas mediterranea*. *Mar Drugs* **8**, 519-541.

- Sánchez-Ferrer,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-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.
- Sanner,M.F. (1999) Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**, 57-61.
- Sardana,K. y Ghunawat,S. (2015) Rationale of using hypopigmenting drugs and their clinical application in melasma. *Expert. Rev. Pharmacol.* **8**, 123-134.
- Schaerlaekens,K., Schierová,M., Lammertyn,E., Geukens,N., Anné,J. y Van Mellaert,L. (2001) Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **183**, 6727-6732.
- Schrödinger,L. (2010) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.1. [Http://www.pymol.org](http://www.pymol.org). Retrieved from <http://www.pymol.org>.
- 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 Protá,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.
- Segel,I.H. (1982) Cálculos de Bioquímica, 2ª edn. Editorial Acirbia, Zaragoza, pp.323-347.
- Seiji,M., Sasaki,M. y Tomita,Y. (1978) Nature of tyrosinase inactivation in melanosomes. *Tohoku J. Exp. Med.* **125**, 233-245.
- 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.
- 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.
- Shabani,F. y Sariri, R. (2010) Increase of melanogenesis in the presence of fatty acids. *Pharmacologyonline* **1**, 314-323.

- Sharlow, E.R., Paine, C.S., Babiarz, L., Eisinger, M., Shapiro, S. y Seiberg, M. (2000) The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113**, 3093-3101.
- 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.
- Shibahara, S., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H. y Takahashi, K. (2001) Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **6**, 99-104.
- 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. (2014) 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, N.H., Ryu, S.Y., Choi, E.J., Kang, S.H., Chang, I.M., Min, K.R. y Kim, Y. (1998) Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 801-803.
- 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.
- 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.
- Singh, R.P. (2011) A catechol biosensor based on a gold nanoparticles encapsulated-dendrimer. *Analyst* **136**, 1216-1221.
- Smith, M.B. (2013) In March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7th edition. Wiley, pp 581.
- 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.
- Solem, E., Tuczek, F. y Decker, H. (2016) Tyrosinase versus catechol oxidase: one asparagine makes the difference. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* DOI: 10.1002/anie.201508534.
- 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, C., Philippon, J. y Rouet-Mayer, M.A. (2003) Browning/Enzymatic-biochemical aspects. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 678-686.
- 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.
- 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., 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.
- Spritz,R.A., Chiang,P.W., Oiso,N. y Alkhateeb,A. (2003) Human and mouse disorders of pigmentation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 284-289.
- 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.
- Steingrímsson,E., Copeland,N.G. y Jenkins,N.A. (2004) Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 365-411.
- Steward,J.J.P. (2012) MOPAC2012, Steward Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA. Retrieved from <http://openmopac.net>.
- Stewart,J.J.P. (2013) Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **19**, 1-32.
- 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. (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.
- 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.
- 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.
- Takekoshi,S., Nagata,H. y Kitatani,K. (2014) Flavonoids enhance melanogenesis in human melanoma cells. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **39**, 116-121.
- 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.
- Tarhini,A.A., Gogas,H. y Kirkwood, J.M. (2012). IFN- α in the treatment of melanoma. *J. Immunol.* **189**, 3789-3793.
- Te-Sheng,C. (2012) Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials* **5**, 1661-1685.
- Tembe,S., Karve,M., Inamdar,S., Haram,S., Melo,J. y D'Souza,S.F. (2006) Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. *Anal. Biochem.* **349**, 72-77.
- 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.
- Thalmann,C.R. y Lötzbeyer,T. (2002) Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 276-281.
- 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.
- Thompson,J.F., Scolyer,R.A. y Kefford, R.F. (2005) Cutaneous melanoma. *Lancet.* **365**, 687-701.
- Toda,K., Pathak,M.A., Fitzpatrick,T.B., Quevedo,W.C.Jr., Morikawa,F. y Nakayama,U. (1973) Pigment Cell (McGovern, Rusell, Riley, Eds), Basilea.
- 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.
- Tomita,Y. y Suzuki,T. (2004) Genetics of pigmentary disorders. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **131C**, 75-81.
- 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.
- Torihara,M., Tamai,Y., Shiono,M. y Tasaka,K. (1990) Alkylresorcinolskin depigmental agents. Eur. Pat. Appl. EP 341664, Nov 15, 1989. *Chem. Abstr.* **113**, 178024.

- Toussaint,O. y Lerch,K. (1987) Catalytic-oxidation of 2-aminophenols y ortho-hydroxylation of aromatic-amines by tyrosinase. *Biochemistry* **26**, 8567-8571.
- Tsakamoto,K., Ueda,M. y Hearing,V.J. (1992) Melanogenesis in murine melanocytes is suppressed by infection with the v-rasHa oncogene. *Pigment Cell Res.* **2**, 181-184.
- 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.
- Ullah,S., Son,S., Yun,H.Y., Kim,D.H., Chun,P. y Moon,H.R. (2016) Tyrosinase inhibitors: a patent review (2011-2015). *Expert. Opin. Ther. Pat.* **26**, 347-362.
- 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 Holde,K.E., Miller,K.I. y Decker,H. (2001) Hemocyanins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem.* **276**, 15563-15566.
- 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.
- Varón,R., García-Sevilla,F., García-Moreno,M., García-Cánovas,F., Peyro,R. y Duggleby,R.G. (1997) Computer program for the equations describing the steady state of enzyme reactions. *Comput. Appl. Biosci.* **13**, 159-167.
- Varón-Castellanos,R., García-Moreno,M., García-Sevilla,F., Ruiz-Galea,M.M. y García-Cánovas,F (1995) In Computerized derivation of the steady-state equations of enzyme reactions; Editorial A5: Albacete.
- Venupureddy,A., Thumallapally,N., Motilal Nehru,V., Atallah,J.P. y Terjanian,T. (2016) Novel drugs and combination therapies for treatment of metastatic melanoma. *J. Clin. Med. Res.* **8**, 63-75.
- 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.
- 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.

- 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.
- Waite,J.H. (1984) Determination of (catecholato) borate complexes using difference spectrophotometry. *Anal. Chem.* **56**, 1935-1939.
- Wakamatsu,K. Ohtara,K. e Ito,S. (2009) Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 474-486.
- Wang,J. y Constabel,C.P. (2003) Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry* **64**, 115-121.
- Wang,J. y Constabel,C.P. (2004) Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* **220**, 87-96.
- Wang,N. y Hebert,D.N. (2006) Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Res.* **19**, 3-18.
- 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.
- Webster,J.D., Kiupel,M. y Yuzbasiyan-Gurkan,V. (2006). Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* **6**, 85.
- 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., Rana,S. y Paterson,H. (2008) Oncogenic BRAFregulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One* **3**, 2734.
- Wei,M.L. (2006) Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res.* **19**, 19-42.
- 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.
- 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., Hoerberichts,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.
- Widlund,H.R., Horstmann,M.A., Price,E.R., Cui,J., Lessnick,S.L., Wu,M., He,X. y Fisher,D.E. (2002) Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J. Cell Biol.* **158**, 1079-1087.
- Widlund,H.R. y Fisher,D.E. (2003) Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* **22**, 3035-3041.
- Wititsuwannakul,D., Chareonthiphakorn,N., Pace,M. y Wititsuwannakul,R. (2002) Polyphenol oxidases from latex *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry* **61**, 115-121.
- Wu,B. (2014) Tyrosinase inhibitors from terrestrial and marine resources. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1425-1449.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yajima,I., Kumasaka,M.Y., Thang,N.D., Goto,Y., Takeda,K., Iida,M., Ohgami,N., Tamura,H., Yamanoshita,O., Kawamoto,Y., Furukawa,K. y Kato,M. (2011) Molecular network associated with MITF in skin melanoma development and progression. *J. Skin Cancer* **2011**, 730170.
- 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., Brenner,M. y Hearing,V.J. (2007) The regulation of skin pigmentation. *J. Biol. Chem.* **282**, 27557-27561.
- 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.
- 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.
- Yokota,T., Nishio,H., Kubota,Y. y Mizoguchi,M. (1998) The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* **11**, 355-361.
- Yokozawa,T. y Kim,Y.J. (2007) Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 2007-2011.
- 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.
- You,A., Zhou,J., Song,S., Zhu,G., Song,H. y Yi, W. (2015) Structure-based modification of 3-/4-aminoacetophenones giving a profound change of activity on tyrosinase: from potent activators to highly efficient inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **93**, 255-262.
- Young,B. y Heath,J.W. (2000) Wheater's histología funcional. Diorki servicios integrales de Edición. 4 Eds.Elseiver, España, pp.157-160.

- 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**, 854687.
- Zaidi,K.U., Ali,A.S. y Ali,S.A. (2014b) Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Res.* **2014**, 120739.
- Zawistowski,J., Biliaderis,C.G. y Michael Eskin,N.A. (1991) Polyphenol Oxidase. En: *Oxidative Enzymes in Foods*. Robinson,D.S. y Eskin,N.A.M (Eds). Elsevier Science, London. pp. 217-273.
- Zekiri,F., Bijelic,A., Molitor,C. y Rompel,A. (2014) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of polyphenol oxidase from *Juglans regia* (jrPPO1). *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 832-834.
- 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., van Leeuwen,J., Wichers,H.J. y Flurkey,W.H. (1999) Characterization of tyrosinase from the cap flesh of portabella mushrooms. *J. Agric. Food. Chem.* **47**, 374-378.
- Zhang,X., Hu,X., Hou,A. y Wang,H. (2009) Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 86-90.
- Zhao,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.
- Zhu,W. y Gao,J. (2008) The use of botanical extracts as topical skin lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **13**, 20-24.
- Zhuang,J.X., Hu,Y.H., Yang,M.H., Liu,F.J., Qiu,L., Zhou,X.W. y Chen,Q.X. (2010) Irreversible competitive inhibition kinetics of cardol triene on mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12993-12998.
- Zlotek,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.
- Zúñiga-Rosales,Y., González-Herrera,Y., Miyares-Díaz,E. y Rodríguez-Pelíer,C.V. (2014) Vitiligo: Hipótesis autoinmune. *Rev. Biomed.* **25**, 145-155.
- Zuo,A.R., Yu,Y.Y., Shu,Q.L., Zheng,L.X., Wang,X.M., Peng,S.H., Xie,Y.F. y Cao,S.W. (2014) Hepatoprotective effects and antityrosinase activities of phloretin and phloretin isonicotinyl hydrazine. *J. Chin. Med. Assoc.* **77**, 290-301.