

ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA LISOZIMA EN SU FORMA NATIVA Y MODIFICADA

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF THE LISOZYME NATIVE AND MODIFIED FORM

Wilman Ismael Carrillo Terán¹

¹ Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC-UAM) Madrid, España

Correspondencia: Wilman Ismael Carrillo Terán

E-mail: w.carrillo@csic.es

Presentado: 15/08/13

Aceptado: 23/08/13

RESUMEN

Durante milenios el hombre ha utilizado los productos de origen natural para fines terapéuticos. Las actividades biológicas de proteínas y péptidos alimentarios es un hecho bastante documentado. La lisozima de clara de huevo es una proteína utilizada para diferentes fines, entre ellos, la industria farmacéutica la emplea como antibacteriano y antiviral. Se sabe que las modificaciones estructurales de las proteínas pueden modificar sus funciones biológicas. En el presente trabajo observamos que la modificación de la lisozima por tratamiento térmico, enzimático y reductor permite mejorar su actividad antiproliferativa. El hidrolizado de lisozima nativa logró inhibir el 50% del crecimiento celular de la línea tumoral (OVCAR-3); este efecto fue dosis dependiente.

Palabras clave: actividad antiproliferativa, lisozima, hidrólisis enzimática, péptidos.

ABSTRACT

For millennia, man has used natural products for therapeutic purposes. The biological activity of protein and peptide food is a well-documented fact. Hen egg white lysozyme is a protein used for various purposes including the antibacterial and antiviral use in the pharmaceutical industry. It is known that structural changes in proteins can alter their biological functions. In the present study, we observed that modification of lysozyme by thermal enzymatic and reducing treatment improves its antiproliferative activity. Native lysozyme hydrolysate achieved 50% inhibition of cell growth of the tumor cell line (OVCAR-3); this effect was dose dependent.

Key words: antiproliferative activity, lysozyme, enzymatic hydrolysis, peptides.

Actualización en Nutrición 2014; Vol. 15 (107-114)

Actualización en Nutrición 2014; Vol. 15 (107-114)

INTRODUCCIÓN

Muchos productos naturales han sido utilizados para obtener compuestos con diferentes aplicaciones en la medicina, farmacia y biología. Para el tratamiento del cáncer un número importante de agentes ha sido obtenido de fuentes naturales por modificación estructural de los compuestos naturales o por la síntesis de nuevos compuestos diseñados a partir del modelo natural^{1,2}. Las plantas medicinales todavía juegan un papel importante en la producción de nuevos agentes. Actualmente existe interés por descubrir nuevas moléculas de origen natural que sirvan como agentes anticancerígenos³.

Se han descrito diferentes actividades biológicas

de proteínas alimentarias, como actividad antibacteriana, antiviral, antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral⁴. La lisozima es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace β (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), debilitando así la pared celular. También se ha descrito actividad antiviral, inmunomodulante, antiinflamatoria y antitumoral de esta proteína. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la modificación de la proteína por diferentes métodos tecnológicos permite potenciar la actividad antiproliferativa de la lisozima de clara de huevo^{5,6}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Los ensayos se llevaron a cabo con (LZ) de huevo de gallina, con una riqueza aproximada del 90% (L-2879, Grade VI, EC. 3.2.1.17) con una actividad enzimática de 60.000 unidades/mg proteína, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para la reducción se utilizaron yodo acetamida, DL-ditioneitol (DTT) y pepsina (3440 unidades/mg proteína Cat: P6887, EC: 232-629-3), todos de Sigma-Aldrich. El péptido correspondiente al fragmento f(107-114) AWWAWRNR de la lisozima de huevo se sintetizó químicamente en el laboratorio.

Tratamiento térmico

Para inactivar la actividad enzimática de LZ por calor, se preparó una solución de lisozima a una concentración de 1 mg/ml y se sometió a tratamiento térmico a 80, 90 y 95°C durante 20 minutos en tampón fosfato potasio 10 mM a pH 6 y 7. Se centrifugó a 3.000 x g durante 15 minutos para eliminar los agregados insolubles. La cantidad de proteína presente en el sobrenadante se determinó por el método del BCA utilizando el test de diagnóstico comercial de Pierce (Rockford, USA), posteriormente las muestras se dializaron en frío y se liofilizaron^{7,8}.

Reducción de LZ

La lisozima de huevo se redujo incubándola con DL-ditioneitol (DTT) a diferentes tiempos. La LZ (1mg/ml) se disolvió en tampón Tris-HCl (10 mM pH 8) y se mezcló con DTT 2 mM. Se tomaron alícuotas de 10 ml para incubarlas durante 0, 1, 1,5, 2 y 4 horas a 30°C con agitación suave. Finalmente se agregó yodo acetamida a una concentración final de 6 mM y se dejó incubar durante 1 hora a 30°C protegido de la luz con agitación^{9,10}.

Hidrólisis enzimática

La lisozima nativa y desnaturalizada (95°C durante 20 minutos en agua Milli-Q), a una concentración de 5mg/ml, se hidrolizaron con pepsina en una relación enzima/ sustrato 1/ 20 a pH 1.2 a 38°C durante 60 minutos. La reacción se paró calentando las muestras a 80°C durante 15 minutos, y el pH se subió hasta 7 con adición de NaOH 1M. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su utilización.

Obtención del complejo de α -lactoalbúmina-lisozima con el agente químico DSS

La unión química entre la α -lactoalbúmina y la

lisozima se realizó mediante sustrato disuccimidilo (DSS), un entrecruzante homobifuncional. La reacción química contenía α -lactoalbúmina (3,5 nM) y lisozima (3,5 nM) disueltas en el tampón de conjugación PBS (20 mM buffer fosfato pH 7.4, 40 mM NaCl). La reacción se inició por la adición de 2 μ l de la solución stock de DSS en N, N-dimetilformamida (DMF) a 98 μ l de la mezcla que contenía el resto de los componentes. Finalmente se dejó incubar en oscuridad a 25°C durante 30 minutos¹¹. Se tomaron alícuotas y se analizaron por SDS-PAGE.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS(PAGE-SDS) con geles homogéneos

Se realizó en un equipo automatizado PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Sweden) dotado de una unidad de separación y una unidad de tinción. Se utilizaron geles comerciales Homogeneous 20% (GE Healthcare, New York, USA), con tiras de electrodos de SDS también comerciales (Buffer Strips para SDS, GE Healthcare). La separación electroforética se realizó según las condiciones que se muestran en la Tabla 1. El volumen de muestra aplicado en el extremo catódico fue de 2 μ l.

	Tensión	Intensidad	Potencia	Temperatura	Voltios
	(V)	(mA)	(W)	(°C)	/h
Pre-electroforesis	250	10	3	15	1
Aplicación muestra	250	1	3	15	1
Electroforesis	300	10	3	15	110

Tabla 1: Condiciones eléctricas de la PAGE-SDS en PhastSystem.

En los geles se incluyó una mezcla de proteínas estándar (GE Healthcare) compuesta por fosforilasa B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). El tratamiento de las muestras consistió en la disolución de 100 μ l de muestra en 100 μ l de un tampón que contiene 2,5% de SDS, EDTA 10 mM con o sin 5% β -mercaptoetanol, calentando la muestra 10 minutos a 95°C para realizar la desnaturalización de la ovoalbúmina. La tinción se realizó en el PhastSystem utilizando nitrato de plata o azul de Coomassie R-350 (PhastGel Blue R) en varias etapas siguiendo las instrucciones del manual del equipo (Pharmacia, nota de aplicación n° 200).

Evaluación de la actividad antiproliferativa en células tumorales humanas

Se evaluó la actividad antiproliferativa de la lisozima de clara de huevo en su forma nativa y modificada por diferentes métodos tecnológicos, frente a células tumorales humanas utilizando el ensayo de sulforrodamina B (SRB) para la evaluación del crecimiento celular¹². Se emplearon las nueve líneas celulares tumorales humanas: U251 (sistema nervioso central), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmón), OVCAR-3 (ovario), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-0 (renal), K562 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovario con resistencia a múltiples drogas). Para los ensayos de citotoxicidad en células sanas se utilizó la línea celular VERO (célula epitelial de macaco verde africano).

Estas líneas cedidas por el National Cancer Institute de Estados Unidos de América (NCI-EUA) se conservaron en el laboratorio de cultivo de células en frascos de 25 cm³ (Nunc®) con 5 ml de medio RPMI1640 (Gibco®) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. 100 µl de las células se inocularon en placas de 96 pocillos (Nunc®) con una densidad de inoculación entre 3x10⁴ y 6,5x10⁴ cel/ml en medio RPMI/SFB suplementado con 50 µl de gentamicina (Schering plus®). Luego se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, seguidamente se agregaron 100 µl/pocillo con las muestras a ensayar en cuatro concentraciones distintas (0,25; 2,5; 25 y 250 µg/ml).

Para la preparación de las muestras, una alícuota de 10 mg de cada muestra se disolvió en 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, 50 µl de las soluciones se disolvieron en 950 µl de medio de RPMI/5% SFB para la preparación de las muestras de trabajo. Las muestras se diluyeron sucesivamente, en medio de cultivo, para obtener las concentraciones finales de 0,25; 2,5; 25 y 250 µg/ml. La concentración final de DMSO no interfirió en el crecimiento celular.

Para el control positivo se utilizó el quimioterapéutico doxorubicina, en las mismas concentraciones de las muestras. En ese momento, se procedió a la fijación de las células con ácido tricloacético (TCA) al 50% de la placa control llamada T0, que permitió determinar la cantidad de células en el momento de la adición de las muestras. Se incubaron las placas durante 48 horas; pasado este tiempo las células se fijaron con 50 µl/pocillo con TCA al 50% y se incubaron 1 hora a 4°C; seguidamente las placas se

lavarón cuatro veces con agua destilada para remover los residuos de TCA, medio, SFB y metabolitos secundarios. Las placas se secaron completamente a temperatura ambiente; una vez secas se colorearon con 50 µl/pocillo de SRB 0,4% (p/v), disuelto en ácido acético al 1%, se incubaron durante 1 hora a 4°C, seguidamente se lavarón cuatro veces con ácido acético al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente las proteínas celulares ligadas al colorante se solubilizaron con una solución de Trizma Base (Sigma®) 10 µM a pH 10,5. La lectura espectrofotométrica de la absorbancia se realizó a 540 nm en el lector de microplacas.

Se generaron gráficos de porcentaje de crecimiento en función de la concentración de las muestras ensayadas para cada una de las líneas celulares ensayadas. Se tuvieron en cuenta tres concentraciones efectivas denominadas GI50 (concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular), se calculó por regresión no lineal, tipo sigmoide, utilizándose el software Origin, versión 7,5. Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó una línea celular normal VERO (célula epitelial de riñón de mono verde africano) y se empleó el ensayo de sulforrodamina B (SBR) para la evaluación del crecimiento celular¹². El procedimiento fue igual al descrito para las células tumorales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la actividad antiproliferativa de la lisozima nativa. Se ensayaron cuatro concentraciones (0,25; 2,5; 25 y 250 µg/ml); se encontró que la lisozima a estas concentraciones no presentó actividad antiproliferativa frente a ninguna de las líneas celulares ensayadas (Figura 1). También se evaluó la actividad antiproliferativa de la lisozima tratada térmicamente a 80, 90 y 95°C a pH 6 y 7. Se ensayaron cuatro concentraciones (0,25; 2,5; 25 y 250 µg/ml) encontrándose que ninguna de las muestras desnaturalizadas a pH 6 presentó algún tipo de actividad sobre las líneas tumorales ensayadas (resultados no mostrados). La lisozima desnaturalizada a pH 7 y 80°C manifestó una ligera actividad al conseguir reducir el 50% de crecimiento en la línea tumoral de melanoma a la dosis más alta (Figura 2). Aunque en la bibliografía se encuentra descrita la actividad antitumoral de la lisozima de huevo, hay que tener en cuenta que las dosis ensayadas previamente son muy elevadas y los métodos de evaluación de la actividad antitumoral son diferentes a los utilizados en este estudio.

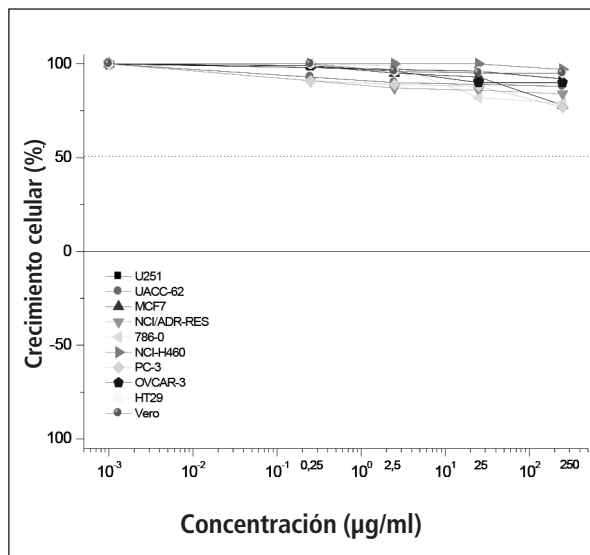


Figura 1: Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de lisozima desnaturalizada a 80°C pH 7.

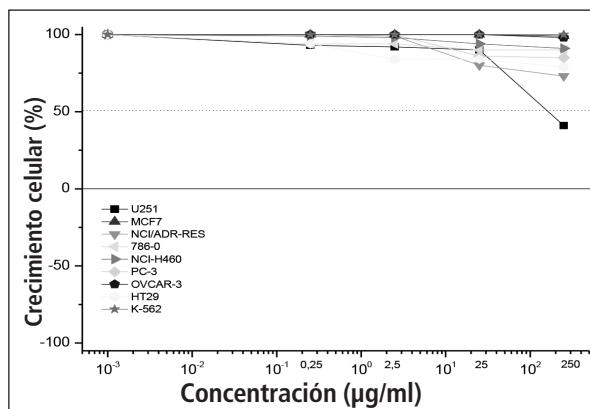


Figura 2: Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de lisozima desnaturalizada a 80°C pH 7.

En la Figura 3 se representa la actividad antiproliferativa de la lisozima de clara de huevo tratada con DTT durante diferentes tiempos de incubación a pH 8. Las muestras después de la reducción con DTT se dializaron durante varios días a 4°C para retirar el exceso de agente reductor ya que podía afectar los resultados. Además en el experimento de la evaluación de la actividad antiproliferativa se utilizó DTT como control. El DTT presentó actividad citoestática frente a todas las líneas tumorales ensayadas e inhibición casi total del crecimiento celular para las líneas de mama (MCF-7) y colon (HT29) a la concentración más alta (250 µg/ml) y el efecto frente a líneas fue dosis dependiente (Figura 3).

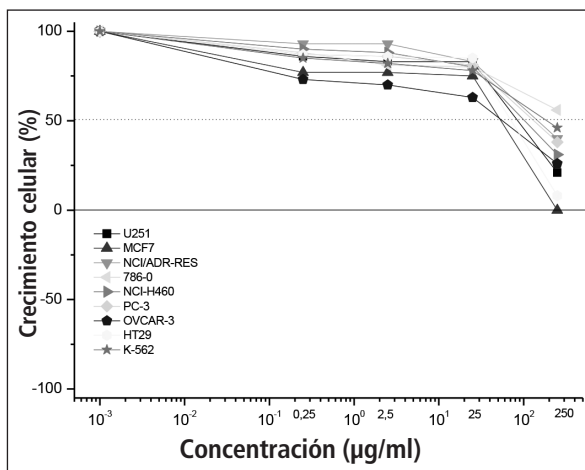


Figura 3: Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de DTT.

En cuanto a las muestras de lisozima tratada con DTT, sólo la incubada durante 1,5 horas con este agente logró reducir el 50% de la línea tumoral de mama (MCF-7) a la concentración mayor ensayada. Este resultado podría deberse en parte a restos del agente DTT que se encuentren en la muestra. Cabe destacar que el efecto de la proteína reducida frente al linaje celular MDF7 sólo fue citoestático, mientras que el efecto del DTT para este mismo linaje celular presentó actividad citoestática y citocida (Figura 4). Probablemente esta diferencia se deba a la menor concentración de DTT en la muestra de lisozima tras la diálisis de la misma.

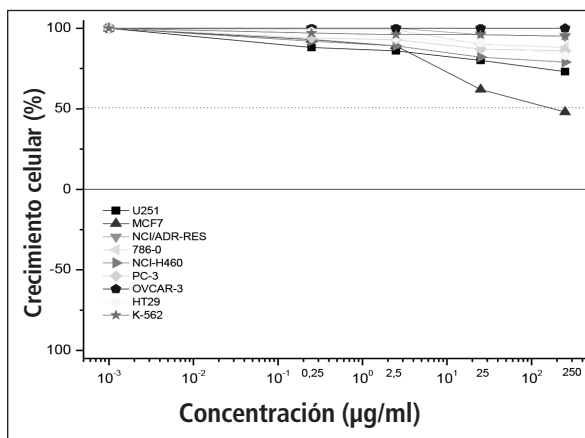


Figura 4: Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de lisozima reducida 1,5 horas con DTT.

El hidrolizado de la lisozima nativa presentó cierta actividad citoestática al lograr reducir el 50% del crecimiento de la línea tumoral de ovario (NCI-DR-RES) con resistencia a múltiples drogas antitumorales, siendo este efecto dosis dependiente (Figura 5). También el hidrolizado de la lisozima desnaturalizada a 95°C mostró cierta actividad citoestática frente a la misma línea tumoral (NCI-DR-RES), aunque no se lle-

gó alcanzar el 50% de inhibición a la concentración más alta. Esta pequeña diferencia podría deberse a las condiciones del ensayo o a diferencias cuantitativas o cualitativas de los péptidos responsables de dicha actividad antitumoral. La actividad inhibitoria fue específica para la misma línea celular, lo cual indica que posiblemente los mecanismos de acción sean idénticos y que se deban a péptidos similares o idénticos.

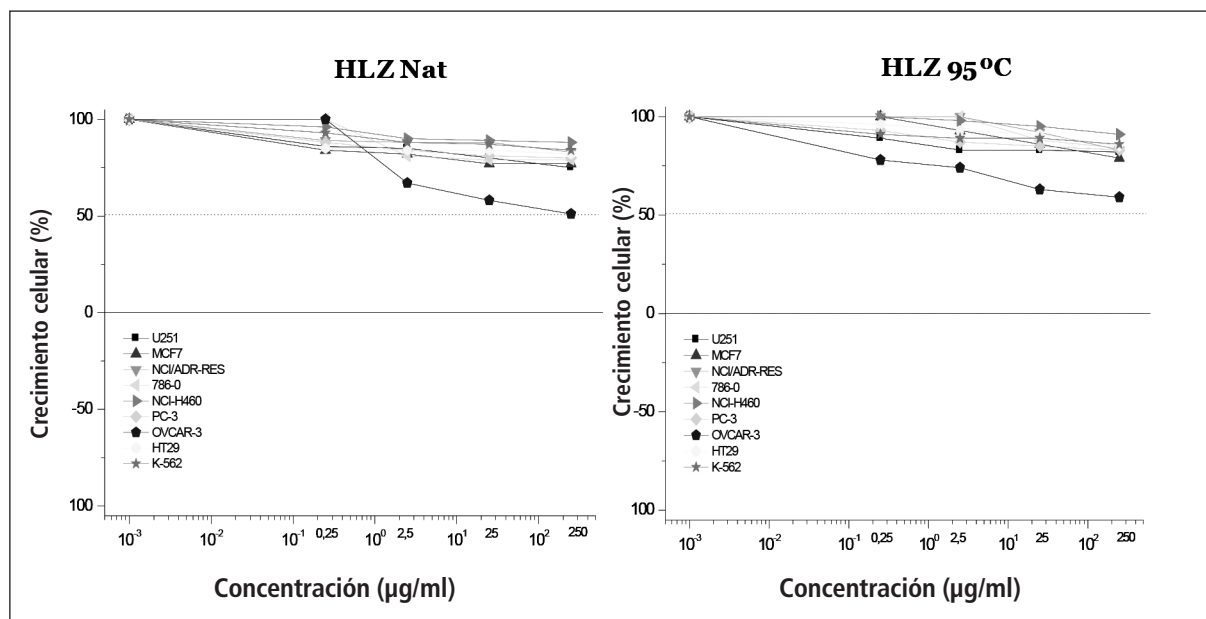


Figura 5: Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de hidrolizados de lisozima nativa y desnaturalizada. HLZNat, hidrolizado de lisozima nativa; HLZ 95°C, hidrolizado de lisozima desnaturalizada por calentamiento a 95°C.

El grupo de Ibrahim et al. (2001) sintetizó la doble hélice de la molécula de la lisozima de huevo y humana. A esta región se le llamó Helix-Loop-Helix que corresponde al fragmento f(87-114) para la lisozima de huevo y al fragmento f(87-115) para la lisozima humana. Se evaluó su actividad antibacteriana y antifúngica, encontrándose que el fragmento f(107-114) AWWAWRNR llamado Helix-2 fue el más activo de la lisozima de huevo frente a las bacterias ensayadas, además de tener actividad frente al hongo *Candida albicans*¹³. En el hidrolizado de la lisozima descrito en nuestro trabajo vimos por RP-HPLC-ESI-MS/MS que varios de los fragmentos peptídicos se encuentran en el Helix-Loop-Helix de la molécula, por ello varios péptidos contienen en sus secuencias el fragmento f(107-114) Helix-2. Se ha descrito que determinados péptidos antibacterianos pueden exhibir actividad antitumoral, sin ser tóxicos frente a células normales¹⁴. En concreto, Yang et al. (2004)

han descrito péptidos de la lactoferrina bovina con una potente actividad antibacteriana y con actividad antitumoral moderada. Al incrementar su carga positiva se vio que aumentaba su actividad antitumoral, demostrándose así la importancia de la naturaleza catiónica de estos péptidos¹⁵. Observándose estos hechos, se decidió sintetizar el péptido correspondiente al fragmento f(107-114) AWWAWRNR llamado Helix-2 de la lisozima de huevo, que posee gran actividad antibacteriana, y evaluar su actividad antiproliferativa con el método de sulforrodamina B (SRB) frente a nueve líneas tumorales y una línea normal de macaco verde, ensayándose cuatro concentraciones diferentes durante 48 horas.

Como se observa en la Figura 6 el fragmento f(107-114) de la lisozima de huevo presentó cierta actividad citoestática frente a la línea tumoral de leucemia (K-562) al llegar a reducir hasta el 50% el crecimiento de dichas células. Su fuerte actividad

antimicrobiana se debe a sus aminoácidos cargados positivamente en su secuencia (dos argininas, Arg) y a los aminoácidos aromáticos (dos triptófanos, Trp). Esta actividad citoestática podría deberse a la presencia de esos aminoácidos en su secuencia. Este resultado también permite postular que esta región de la molécula puede estar implicada en la actividad antitumoral que se le atribuye a la lisozima.

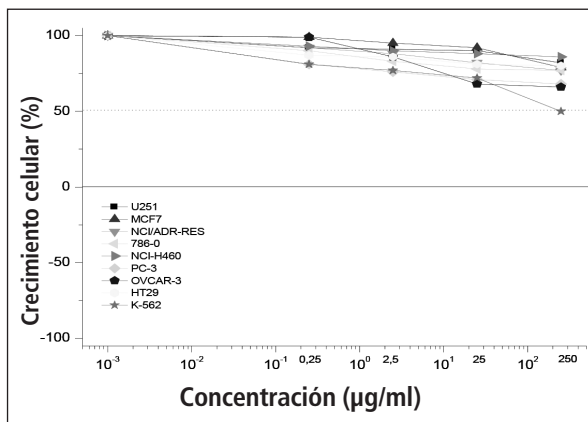


Figura 6: Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones del péptido de la lisozima de clara de huevo correspondiente al fragmento f(107-114) AWWAWRNR.

Ibrahim et al. (2004) describieron la obtención de un complejo entre la α -lactoalbúmina bovina y la lisozima de clara de huevo con la ayuda de un agente químico que une las proteínas por la formación de puentes amidas¹¹. Una vez obtenido este complejo se evaluó su actividad antibacteriana, encontrándose una potente actividad frente a la bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y la Gram-negativa (*Escherichia coli* K-12). En vista de lo anterior, decidimos probar si la obtención del complejo entre la α -lactoalbúmina bovina y la lisozima de clara de huevo podría tener actividad antiproliferativa. Como se observa en la Figura 7, el agente entrecruzador favoreció la formación de dímeros de lisozima (calle 2 y 3); la α -lactoalbúmina también presentó dimerización (calle 4 y 5) y se formó el complejo entre la α -lactoalbúmina y la lisozima (calle 6, 7 y 8), las diferencias de los pesos moleculares nos permiten deducirlo: la banda del complejo se observa que está mucho más alta que la banda de los dímeros de la α -La y LZ sola. En todas las muestras se aprecia que gran parte de los monómeros que no se dimerizaron durante la reacción.

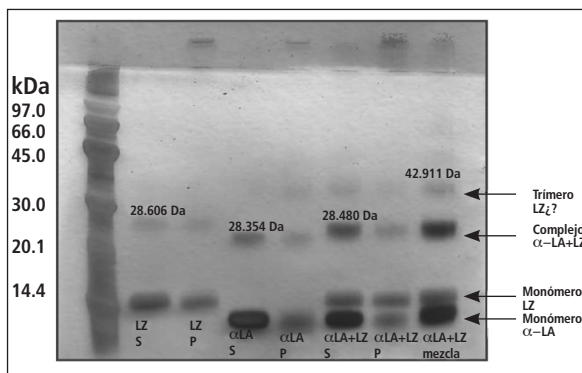


Figura 7: SDS-PAGE del complejo α -lactoalbúmina con la lisozima. S (sobrenadante) y P (precipitado). Teñido con nitrato de plata.

Ibrahim et al. (2004) han descrito que este complejo tiene actividad antimicrobiana¹¹. También se ha propuesto que estas dos proteínas al encontrarse en la leche tienden a asociarse y producir este tipo de moléculas. Se ha descrito que incubar la α -La y la lisozima a temperaturas de 10, 25 y 40°C durante 30 minutos es suficiente para que se formen estos heterodímeros¹⁶. Una vez obtenido el complejo se procedió a evaluar su actividad antiproliferativa frente a nueve líneas tumorales. En la Figura 8 se muestran los resultados de la actividad antiproliferativa del complejo de la α -lactoalbúmina y la lisozima. El agente empleado para la formación del heterodímero, DSS, presentó actividad citoestática frente a todas las líneas celulares, llegando a reducir hasta cero el crecimiento celular. Este efecto citoestático ocurrió a la concentración más elevada (250 µg/ml). Por otro lado, la α -lactoalbúmina tratada con el agente DSS logró reducir hasta el 50% el crecimiento celular de la línea leucémica (K-562) a una concentración de (25 µg/ml). Esta actividad podría deberse a la presencia de restos de DSS en la muestra. El complejo de la α -lactoalbúmina y la lisozima así como las demás muestras no presentaron actividad.

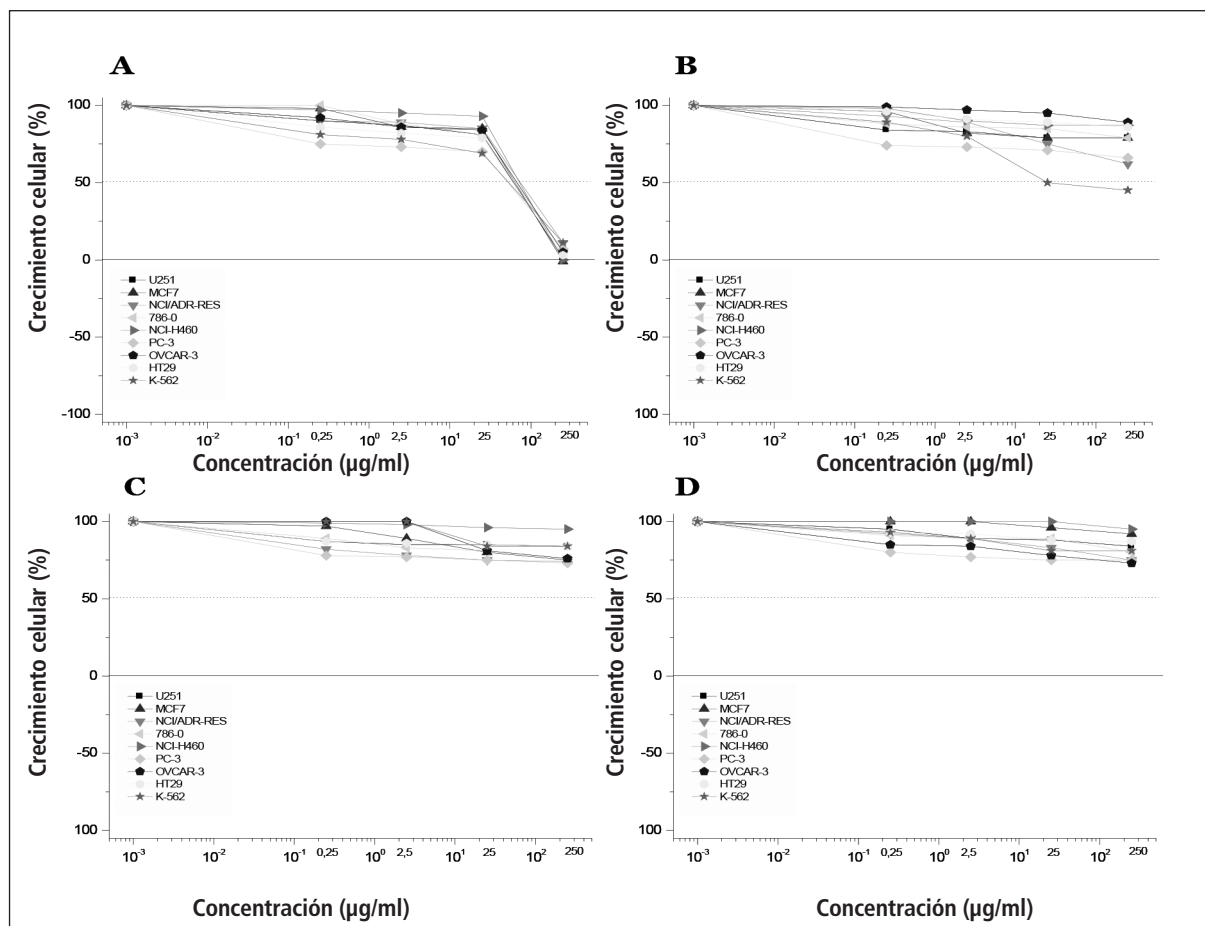


Figura 8: Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de: A) DSS; B) α -LA+DSS; C) LZ+DSS; D) α -LA+LZ (DSS).

CONCLUSIONES

Las proteínas alimentarias presentan propiedades biológicas en su estructura nativa. Ciertas modificaciones estructurales pueden modificar dichas actividades. La lisozima nativa hidrolizada con pepsina fue capaz de inhibir el 50% del crecimiento de la línea celular tumoral (OVCAR-3); este efecto fue dosis dependiente.

REFERENCIAS

- Sacoman JL, Monteiro KM, Possenti A, Figueira MA, Foglio MA, Carvalho JE. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from pothomorphe umbellate. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2008, 41: 411-415.
- Spindola HM, Carvalho JE, Ruiz AL, Rodrigues RAF, Denny C, de Oliveira Sousa IM, Tamashiro JY, Foglio MA. Furanoditerpenes from pterodon pubescens benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. *J. Braz. Chem. Soc.* Vol. 20, N° 3, 569-575, 2009.
- Denny C, Engelbrecht Zacharias M, Tasca Gois Ruiz AL, do Amaral MC, Bittrich V, Konecny Kohn L, de Oliveira Sousa IM, Ferreira Rodrigues RA, de Carvalho JE, Foglio MA. Antiproliferative properties of polyketides isolated from virola sebifera leaves. *Phytotherapy research phytother. Res.* 22, 127-130 (2008). Published online 8 August 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/ptr.2251.
- Phelan M, Aherne A, FitzGerlad RJ, O'Brien NM. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Inter. Dairy Journal.* 2009, 19: 643-654.
- Jiménez-Saiz R, Martos G, Carrillo W, López-Fandiño R, Molina E. Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food chemistry.* 2011. 127: 1719-1726.
- Jiménez-Saiz R, Gordon ME, Carrillo W. Hen egg white lysozyme: antimicrobial activity & allergenicity. *Lysozymes: sources, functions and role in disease.* 1° Ed. Nova Science Publisher. USA. 2012.
- Ibrahim HR, Higashiguchi S, Koketsu M, Juneja LR, Kim M, Yamamoto T. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.* 1996 a, 44: 1416-1423.
- Ibrahim HR, Higashiguchi S, Sugimoto Y, Aoki T. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially

- unfolded lysozyme. J. Agric. Food Chem. 1997a, 45: 89-94.
9. Touch V, Hayakawa S, Fukada K, Aratani Y, Sun Y. Preparation antimicrobial reduced lysozyme compatible in food applications. J. Agric. Food Chem. 2003, 53: 5154-5161.
 10. Touch V, Hayakawa S, Saitoh K. Relationships between conformational changes and antimicrobial activity of lysozyme upon reduction of its disulfides bonds. Food Chem. 2004, 84: 421-428.
 11. Ibrahim HR, Taniyama N, Aoki T. Distinct dimerization between α -lactalbumin and lysozyme exhibiting novel antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Lett. Drug Design Disc. 2004, 1:101-109.
 12. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 1991,83: 757-766.
 13. Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. J. Biol. Chem. 2001 b, 276: 43767-43774.
 14. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochim. Biophys. Acta. 2008, 1778: 357-375.
 15. Yang N, Strøm MB, Mekonnen SM, Svendsen JS, Rekdal O. The effects shortening lactoferrin derived peptides against tumor cells, bacteria and normal human cells. J. Pept. Sci. 2004, 10: 37-46.
 16. Nigen M, Le Tilly V, Crogenec T, Drouin-Kucma D. Molecular interaction between apo or holo α -lactoalbumin and lysozyme: formation of heterodimers as assessed by fluorescence measurements. Biochim. Biophys. Acta. 2009, 1794: 709-715.
- Agradecimientos: a la Comunidad de Madrid por el contrato pre-doctoral de Personal de Apoyo de Investigación, y al organismo de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo en Iberoamérica (CYTED) por la beca concedida para la estancia en los laboratorios del Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, de la Universidad Estatal de Campinas, Sao Paulo, Brasil.*