



## MODELADO *IN SILICO* DE UNA LISOZIMA TIPO C DE *Triatoma pallidipennis* Stål (HEMÍPTERA: REDUVIIDAE)

---

Ignacio Martínez, Paulina Diaz-Garrido, Edgar Quezada-Ruiz y Bertha Espinoza

Acceptado: 22 de noviembre 2022  
Publicado: 31 de agosto 2023



## MODELADO *IN SILICO* DE UNA LISOZIMA TIPO C DE *Triatoma pallidipennis* Stål 1872 (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)

Ignacio Martínez, Paulina Diaz-Garrido, Edgar Quezada-Ruiz y Bertha Espinoza✉

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Departamento de Inmunología. Av. Universidad 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México. Alcaldía Coyoacán. C.P. 04510, Ciudad de México. [imm@iibiomedicas.unam.mx](mailto:imm@iibiomedicas.unam.mx), [di\\_paulina@yahoo.com](mailto:di_paulina@yahoo.com), [mgs\\_edgar\\_mgs@hotmail.com](mailto:mgs_edgar_mgs@hotmail.com), [besgu@iibiomedicas.unam.mx](mailto:besgu@iibiomedicas.unam.mx)  
✉Autor de correspondencia: [besgu@iibiomedicas.unam.mx](mailto:besgu@iibiomedicas.unam.mx)

**RESUMEN.** Las lisozimas son proteínas involucradas en la defensa inmune innata de los invertebrados. Recientemente reportamos la secuencia de una lisozima tipo C de *Triatoma pallidipennis*, vector del parásito *Trypanosoma cruzi*. Se estableció su similitud filogenética con otras lisozimas de triatominos y su actividad en hemolinfa. En este trabajo se presenta un modelo tridimensional de la lisozima, se identifican los probables aminoácidos afines al sustrato y a diversos inhibidores. También se presentan evidencias de su inhibición por imidazol.

**Palabras clave:** Respuesta inmune en insectos, Hidrolasas glucosídicas, Triatominae.

### *In silico* modeling of a type C lysozyme from *Triatoma pallidipennis* Stål 1872 (Hemiptera: Reduviidae)

**ABSTRACT.** Lysozymes are proteins involved in the innate immune defense of invertebrates. We recently reported the sequence of a type C lysozyme in *Triatoma pallidipennis*, a vector of the parasite *Trypanosoma cruzi*. Its phylogenetic similarity with other triatomine lysozymes and its activity in hemolymph were established. In this work, a lysozyme model is presented, the probable amino acids related to the substrate and to several inhibitors are identified. Evidence of its inhibition by imidazole is also presented.

**Keywords:** Insect immune response, Glycosidic hydrolases, Triatominae.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es un padecimiento causado por el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), transmitido al humano por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), de los cuales se reportan 32 especies en México (Vidal-Acosta *et al.*, 2000). *Triatoma pallidipennis* (Stål) es una de las más importantes, por su amplia distribución (13 estados de la República Mexicana) y altos índices de infección natural con el parásito (Bautista *et al.*, 1999).

La presencia de *T. cruzi* y algunas bacterias potencialmente patógenas, en el tracto digestivo o hemolinfa de los insectos triatominos, induce la expresión de diversas moléculas como defensinas y lisozimas (Flores-Villegas *et al.*, 2015). Las lisozimas catalizan la hidrólisis del enlace  $\beta$ -(1-4)-glucosídico entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano presente en la pared celular de las bacterias, lo que causa lisis bacterial y protege a los insectos contra infecciones (Jollès y Jollès, 1984). Este mecanismo de acción está dirigido principalmente a bacterias Gram (+) y es menos eficiente en las Gram (-), debido a que su peptidoglicano está protegido por la membrana externa que actúa como barrera y limita la acción de la Lisozima (Ibrahim *et al.*, 2002).

Diversos trabajos proponen que la presencia de aminoácidos con carga positiva en la superficie de algunas Lisozimas favorece su interacción con la carga negativa en la superficie de las bacterias Gram (+) (Price y Pethig, 1986; Ibrahim *et al.*, 2002; Matsuura *et al.*, 2002; Cançado *et al.*, 2008). En diversas especies de triatominos sudamericanos se reportan lisozimas (Kollien *et al.*, 2003; Ursic-Bedoya *et al.*, 2008), y en el caso de *T. pallidipennis* (nativo de México), se conoce la secuencia de una lisozima tipo C (TpLys), demostrando su actividad en hemolinfa frente a *Micrococcus lysodeikticus* Fleming (Diaz-Garrido *et al.*, 2016).

Sin embargo, se carece de un modelo tridimensional de la proteína y no se ha establecido qué aminoácidos de esta lisozima participan en la unión al sustrato o a los inhibidores descritos en la literatura. En el presente trabajo se propone un modelo tridimensional de esta proteína generado por homología, y se identifican los aminoácidos que podrían participar en la unión a sustrato e inhibidores, mediante la comparación con lisozimas bien caracterizadas como la de pollo (HEWL); además de evidenciar la inhibición de su actividad por efecto del imidazol.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Secuencias empleadas

Las secuencias empleadas en este trabajo fueron de la lisozima de *T. pallidipennis* (TpLys, GenBank AZP23793.1), lisozima de *Bombix mori* (Linnaeus, 1758) (BmLys; Protein Data Bank 1GD6), lisozima de *Litopenaeus vanamei* (Boone, 1931) (PDB 6UKC) y lisozima de huevo de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) (HEWL, PDB 6LYZ).

### Modelado por homología

El modelado por homología se realizó empleando la secuencia de TpLys (AZP23793.1) mediante dos plataformas: Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) y Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), comparando contra todas las estructuras disponibles en PDB. A partir de los modelos generados por ambas plataformas se escogieron aquellos con el Score (QMEAN) más cercano a cero y la fiabilidad en la estructura secundaria ( $\alpha$ -hélices y láminas beta) se estableció con las gráficas de Ramachandran y el programa Procheck, mientras que la tasa general de frecuencias de error fue establecida mediante el programa ERRAT, ambos incluidos en la paquetería SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). Para determinar el mejor modelo obtenido se aplicaron los criterios descritos en la misma plataforma: 90% o más de residuos aminoácidos en las regiones más favorecidas del plot de Ramachandran y factor de calidad igual o superior al 91% en ERRAT. Los modelos generados fueron visualizados y analizados utilizando el software PyMol Molecular Graphics System Ver. 2.4.0 (Janson *et al.*, 2017).

### Identificación de aminoácidos de unión a ligando y a inhibidores

El peso molecular, el punto isoeléctrico y la carga neta de la proteína se determinaron mediante el software Pepstats v. 6.6.0 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web>). Las secuencias se alinearon mediante T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:expresso>), para identificar los aminoácidos importantes en la unión a sustrato y a inhibidores; su porcentaje de similitud se estableció con la plataforma bioinformatics ([https://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)). La identificación de motivos funcionales y de los posibles aminoácidos de unión a inhibidores se realizó a partir de la homología de TpLys, con las lisozimas previamente mencionadas y los aminoácidos de la literatura (Millan *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2018; Sood *et al.*, 2019; Zaman *et al.*, 2019; Swain *et al.*, 2020).

### Análisis de actividad sobre *Micrococcus luteus* (Schröter, 1872) e inhibición por imidazol

Se extrajo la hemolinfa de ninfas de 5° estadio de *T. pallidipennis* (14 días post-alimentación con sangre de ratón), mediante una punción entre el trocante y la coxa posterior. La hemolinfa se mezcló 1:1 (vol/vol) con PBS y se cuantificó la proteína total con el sistema DC protein Assay (Bio-Rad, USA). La actividad de lisozima se evaluó por zimografía, como se reportó previamente, en presencia de *M. luteus* (Audy *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 2002). Se calentaron a 100°C durante 2 minutos, 15  $\mu$ g de proteína total de hemolinfa en presencia de amortiguador de carga (SDS 8%, azul de bromofenol 0.4%, glicerol 40%, sin  $\beta$ -mercaptoetanol), y separaron en geles de acrilamida (SDS-PAGE) al 15% mezclada con *M. luteus* (2% m/v inactivados a 121 ° por 15 minutos) en solución amortiguadora (Tris 0.125 M, Glicina 0.96 M, SDS 0.5 %); y en el control positivo, se usaron 10  $\mu$ g de HEWL (Sigma, L-7651).

La electroforesis se realizó a 150V durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después, el gel se lavó con agua milli-Q por 30 minutos y se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente en buffer renaturalizante (25 mM Tris-HCl pH 7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tritón X-100). Concluido este tiempo se realizó una tinción con azul de metileno al 0.2% durante 3 horas y un lavado con agua desionizada. La actividad enzimática fue observada como una tinción negativa sobre el fondo azul del gel, su registro fotográfico se realizó con un fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak). Se inhibió la actividad enzimática de las muestras agregando imidazol (Sigma, I-5513 ) en concentraciones de 0.25 M, 0.5M y 0.66 M justo antes de cargarlas en el gel SDS -PAGE . La reducción en la actividad enzimática en presencia del inhibidor imidazol se estableció mediante un análisis densitométrico con el software Image J.

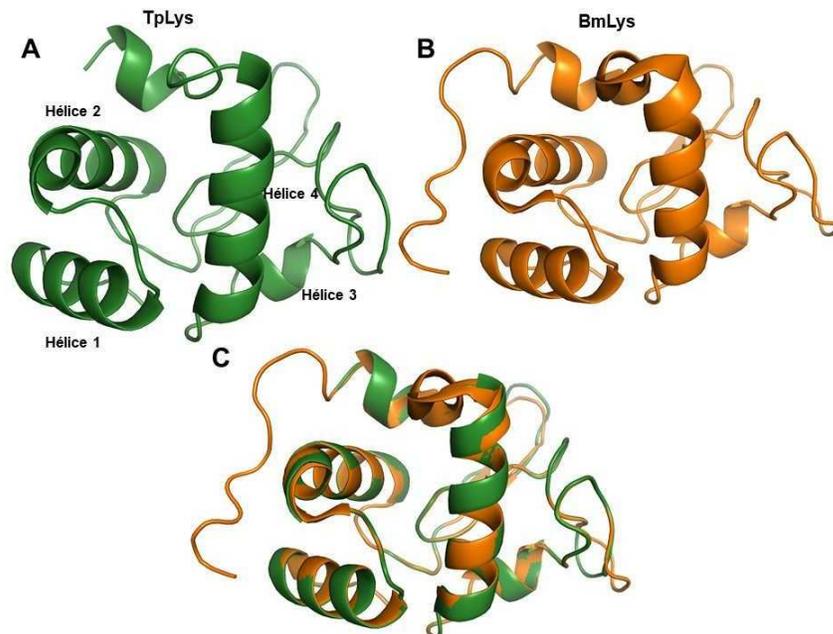
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la secuencia mediante Pepstat mostró que esta proteína tiene un peso molecular de 14 kDa, punto isoelectrico de 8.38 y una carga de 5. Los modelos tridimensionales generados por las plataformas empleadas (Phyre2 y Swiss-model) señalaron que el mejor templado en PDB para modelar a TpLys fue la lisozima de *B. mori* (1GD 6).

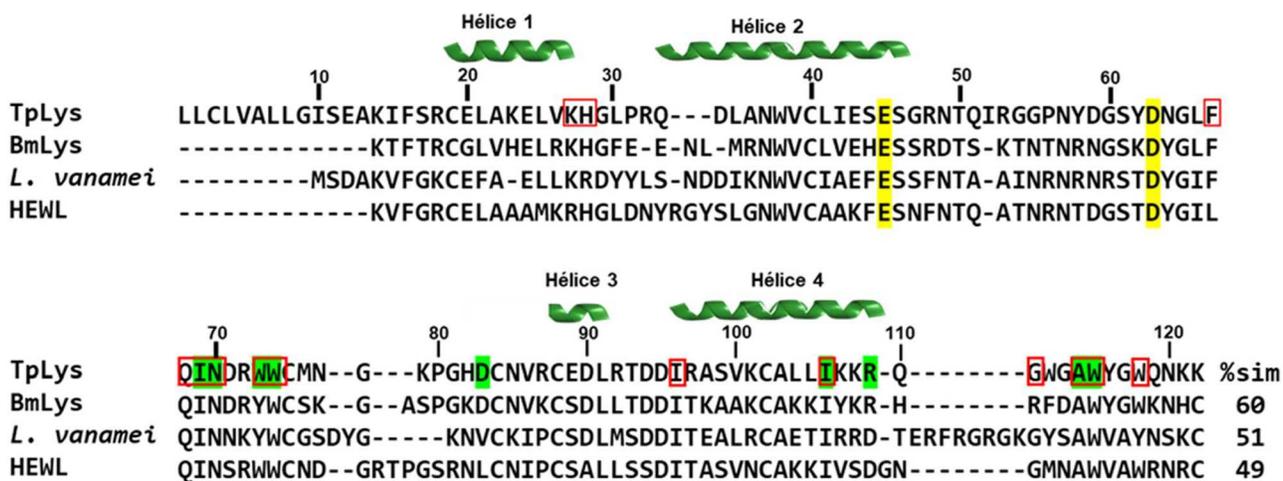
Se observaron ligeras diferencias en la disposición de las  $\alpha$ -hélices entre el modelo de Phyre 2 y el modelo de Swiss -model, por lo que ambos fueron validados como se describe en materiales y métodos , para escoger el que tuviera una mayor fiabilidad. Se estableció que el modelo generado por Phyre2 era el mejor, dado que la gráfica de Ramachandran mostró que el 90.7% de los residuos aminoácidos se encuentran en la región favorable, indicando una buena fiabilidad de la estructura. Mientras que la gráfica de ERRAT mostró un factor del 93.56%, lo que indica una buena calidad del modelo.

En la estructura tridimensional de TpLys se observó la presencia de 4 hélices características de esta familia (Figura 1A). Dado que el mejor templado en el modelaje por homología fue la lisozima de *B. mori* (BmLys, Figura 1B) se compararon ambas estructuras (Figura 1C). Se observó una alta similitud en la disposición espacial de ambas proteínas.

Dada la similitud observada en los modelos tridimensionales, se decidió alinear la secuencia de TpLys con la secuencia de BmLys y se observó que comparten un 60% de similitud (Figura 2). También se incluyeron en el alineamiento las secuencias de las lisozimas del langostino *L. vanamei* y de la lisozima de huevo de gallina (HEWL), de las cuales se han reportado tanto los aminoácidos de unión a sustrato, como de interacción con diversas moléculas inhibitoras: imidazol, pinostrobin, rodamina B, naringina, noscapina y 6- mercaptopurina (Figura 2).



**Figura 1.** Modelo de la lisozima tipo C de *T. pallidipennis*. El modelo de TpLys (A) fue obtenido por homología como se describe en materiales y métodos. El modelado se realizó empleando la lisozima de *B. mori* (BmLys) como templado (B). La similitud en la disposición espacial de ambas proteínas puede observarse en la superposición de ambas (C). En el modelo obtenido se señalan las hélices 1-4 características de estas proteínas.



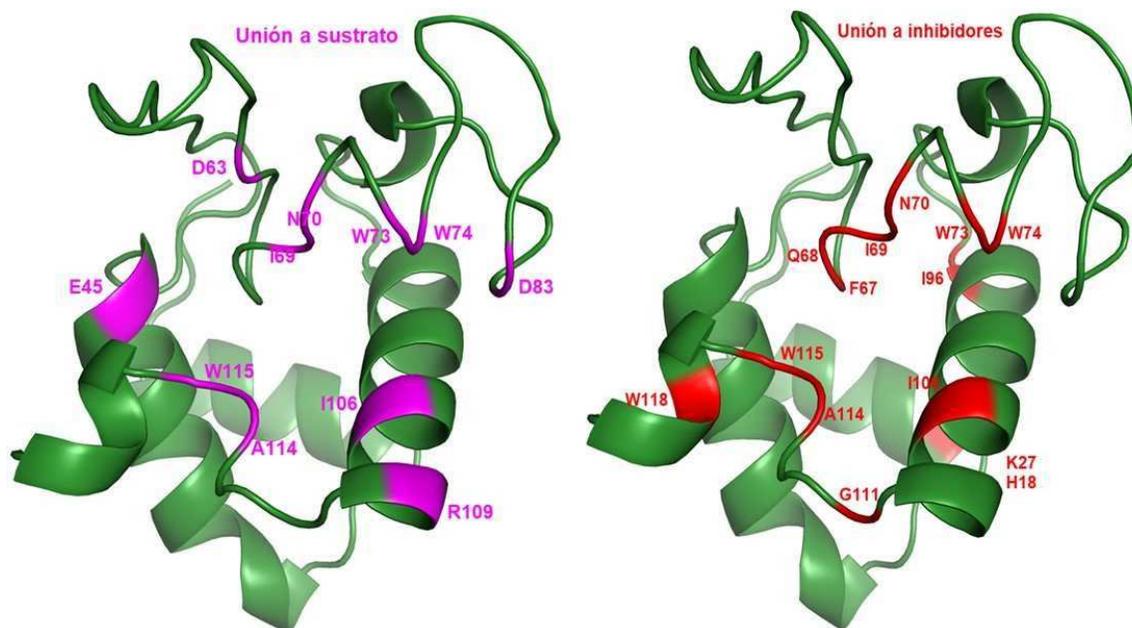
**Figura 2.** Identificación de aminoácidos (aa) importantes en la secuencia de TpLys. Los aa del sitio activo (E45, D63) se indican en fondo amarillo. Los aa importantes para la unión a sustrato descritos en *B. mori* (BmLys), *L. vanamei* y HEWL que también están presentes en TpLys se indican en fondo verde. Las cajas rojas señalan los aa presentes en TpLys que han sido reportados en HEWL como blanco de los inhibidores imidazol, pinostrobin, rhodamina B, naringina, noscapina y 6-mercaptopurina. Las hélices de la estructura se muestran sobre la secuencia respectiva. La numeración corresponde a la posición de los aminoácidos en la secuencia de TpLys. Al final de cada secuencia se indica el porcentaje de similitud (% sim) con TpLys.

Tabla 1. Inhibidores descritos para la lisozima de pollo (HEWL) que podrían inhibir a TpLys

Inhibidor	Aminoácidos con los que reacciona*	Referencia
Imidazol	HEWL: W62, W108 TpLys: W73, W105	Swan, 1972
Pinostrobin	HEWL: I58, W62, W63, I98, G104, A107, W108 TpLys: I69, W73, W74, I106, G111, A114, W115	Zaman <i>et al.</i> , 2019
Rhodamina B	HEWL: N59, W63, A107 TpLys: N70, W74, A114	Millan <i>et al.</i> , 2016
Naringina	HEWL: W28, Q57, N59, W62, W63, A107, W108, W111 TpLys: W38, Q68, N70, W73, W74, A114, W115, W118	Das <i>et al.</i> , 2018
Noscapina	HEWL: H15, I88 TpLys: H28, I96	Sood <i>et al.</i> , 2019
6-mercaptopurina	HEWL: Q57, I58, N59, W63, I98, W108, A107 TpLys: Q68, I69, N70, W74, I106, W115, A114	Swain <i>et al.</i> , 2020

\*Identificados en HEWL y sus equivalentes en TpLys con los que podría interactuar

Se encontró que TpLys comparte diversos aminoácidos con *B. mori* y HEWL que han sido reportados en la unión al sustrato (I69, N70, W73, W74, D83, I106, R109, A114 y W115) (Matsuura *et al.*, 2002). También se encontró que TpLys tiene diversos aminoácidos que han sido reportados como importantes en la unión a diversos inhibidores de la lisozima de pollo (Tabla 1). La posición de dichos aminoácidos en el modelo propuesto ocupa lugares cercanos al sitio activo y podrían ser blanco de unión de los mismos inhibidores descritos para HEWL (Figura 3).



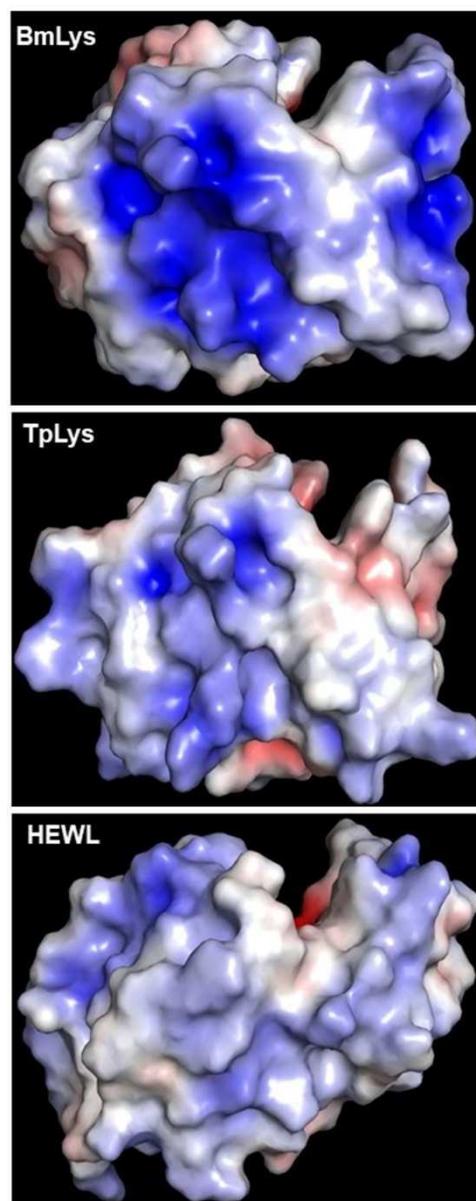
**Figura 3.** Disposición espacial de los aminoácidos de TpLys que podrían interactuar con el sustrato (magenta) y con algunos inhibidores (rojo) como imidazol, pinostrobin, rodamina B, naringina, noscapina y 6-mercaptopurina.

Previamente se ha documentado que BmLys tiene una menor energía de activación y mayor afinidad por las bacterias Gram-positivas que la HEWL. Esta última característica está asociada a una superficie con mayor carga positiva en la BmLys, como ha sido propuesto previamente (Ibrahim *et al.*, 2002; Matsuura *et al.*, 2002; Price y Pethig, 1986). Dada la similitud observada entre TpLys y BmLys podría esperarse que compartieran esta característica, pero al observar la carga positiva en la superficie de TpLys se encontró que ésta es menor a la de BmLys y más parecida a la carga encontrada en HEWL, por lo que podría esperarse que tenga una afinidad por las bacterias Gram -positivas más parecida a ésta última (Figura 4).

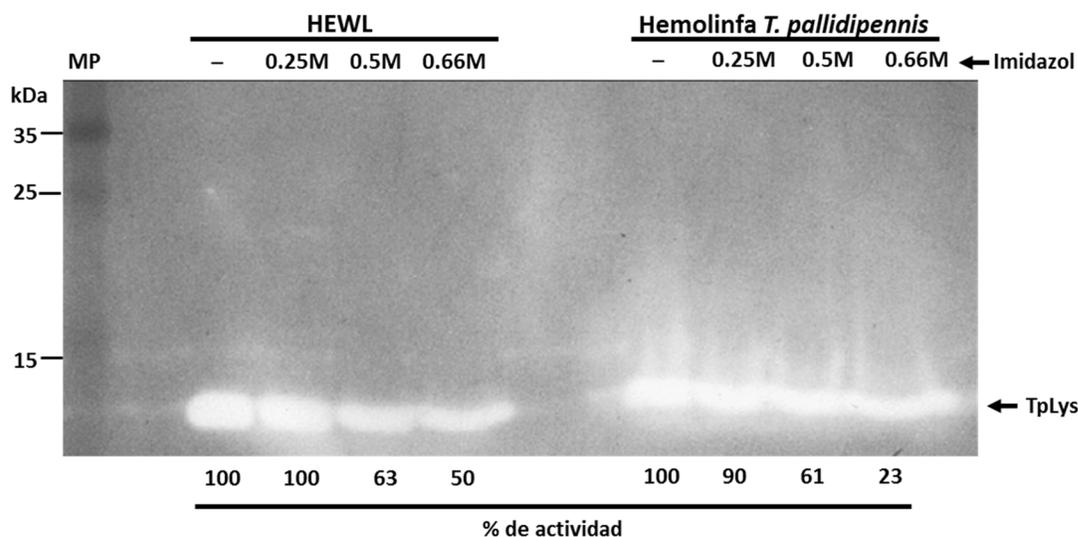
Se encontró actividad de lisozima en la hemolinfa de *T. pallidipennis* alrededor de 14 kDa, lo cual corresponde con el peso molecular calculado para TpLys. Adicionalmente, se observó que el imidazol redujo dicha actividad de manera dosis dependiente. Dado que TpLys cuenta con 2 triptófanos (W73 y W 105) en la misma posición que aquellos descritos en HEWL (W62 y W108) que son blanco del imidazol, estos podrían estar involucrados en la reducción de la actividad observada en presencia de imidazol (Swan, 1972). Esto deberá ser corroborado mediante ensayos de docking y de ser posible ensayos de inhibición empleando la proteína purificada o recombinante.

Si bien *T. pallidipennis* podría tener más de una lisozima, por el momento no se cuenta con información al respecto. Asimismo, cuando se han reportado dos lisozimas en un insecto, la diferencia entre ellas es mínima y no puede ser resuelta en un zimograma, ha sido necesario clonarlas para establecer que se trata de dos moléculas distintas (Cançado *et al.*, 2008).

Será importante realizar análisis de docking para reforzar la probable interacción entre TpLys y los inhibidores descritos además de imidazol, así como probar algunos de ellos para demostrar experimentalmente dicha interacción. También será interesante establecer si la expresión de esta proteína cambia por efecto de la infección con *T. cruzi*, como ha sido observado en otros triatomíneos (Buarque *et al.*, 2013). Adicionalmente, debe establecerse si existe interacción entre TpLys y la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) como ha sido observado en humano, toda vez que los insectos cuentan con una molécula homóloga (Macours y Hens, 2004). Finalmente, será importante establecer si la lisozima de este vector se une a la quitina como se ha demostrado para *B. mori* y el papel fisiológico que tendría tal asociación (Tang *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Carga electropositiva en la superficie de TpLys. Los aminoácidos con carga positiva (azul) se muestran en la superficie de cada lisozima. Cuanto más intenso el color, mayor la carga positiva y mayor podría ser la interacción con la superficie negativa de las bacterias Gram (+).



**Figura 5.** Actividad de lisozima en hemolinfa de *T. pallidipennis*. Las zonas ausentes de color alrededor de 14 kDa, corresponden a la actividad enzimática. Como control positivo se usó lisozima de pollo. Se presenta la actividad en presencia o ausencia de diversas concentraciones del inhibidor imidazol. MP Marcadores de peso molecular.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que TpLys de *T. pallidipennis* cuenta en su secuencia con diversos aminoácidos descritos en HEWL que podrían interactuar con los sustratos e inhibidores descritos para ésta última. Particularmente con imidazol, el cual redujo la actividad de TpLys sobre *M. luteus* en los zimogramas realizados. Asimismo, el modelo tridimensional de TpLys tiene una disposición estructural muy similar a la lisozima de *B. mori* y al igual que esta última tiene una carga positiva sobre la superficie, que podría favorecer su interacción con bacterias Gram positivas.

## LITERATURA CITADA

- Audy, P., Grenier, J., Asselin, A. 1989. Lysozyme activity in animal extracts after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Comp Biochem Physiol B*, 92(3): 523-527. [https://www.doi:10.1016/0305-0491\(89\)90126-0](https://www.doi:10.1016/0305-0491(89)90126-0)
- Bautista, N.L., García de la Torre, G.S., de Haro Arteaga, I., Salazar Schettino, P.M. 1999. Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the state of Morelos, Mexico, and possible ecotopes. *J Med Entomol*, 36(3): 233-235. <https://www.doi:10.1093/jmedent/36.3.233>
- Buarque, D.S., Braz, G.R., Martins, R.M., Tanaka-Azevedo, A.M., Gomes, C.M., Oliveira, F.A., Schenkman, S., Tanaka, A.S. 2013. Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, 8(5): e61203. <https://www.doi:10.1371/journal.pone.0061203>
- Cançado, F.C., Chimoy Effio, P., Terra, W.R., Marana, S.R. 2008. Cloning, purification and comparative characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica* larvae. *Braz J Med Biol Res*, 41(11): 969-977. <https://www.doi:10.1590/s0100-879x2008001100005>
- Das, S., Ghosh, P., Koley, S., Singha Roy, A. 2018. Binding of naringin and naringenin with hen egg white lysozyme: A spectroscopic investigation and molecular docking study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 192: 211-221. <https://www.doi:10.1016/j.saa.2017.11.015>

- Díaz-Garrido, P., Santacruz-Martínez, E., Martínez, I., De la Torre, P., Laclette, J.P., Espinoza, B. 2016. Identificación de dos defensinas en el genoma de *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) y una lisozima en su hemolinfa. *Entomología Mexicana*, 3: 805-809.
- Flores-Villegas, A.L., Salazar-Schettino, P.M., Córdoba-Aguilar, A., Gutiérrez-Cabrera, A.E., Rojas-Wastavino, G.E., Bucio-Torres, M.I., Cabrera-Bravo, M. 2015. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. *Bull Entomol Res*, 105(5): 523-532. <https://www.doi:10.1017/s0007485315000504>
- Ibrahim, H.R., Aoki, T., Pellegrini, A. 2002. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr Pharm Des*, 8(9): 671-693. <https://www.doi:10.2174/1381612023395349>
- Janson, G., Zhang, C., Prado, M.G., Paiardini, A. 2017. PyMod 2.0: improvements in protein sequence-structure analysis and homology modeling within PyMOL. *Bioinformatics*, 33(3): 444-446. <https://www.doi:10.1093/bioinformatics/btw638>
- Jollès, P., Jollès, J. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem*, 63(2): 165-189. <https://www.doi:10.1007/bf00285225>
- Kollien, A.H., Fechner, S., Waniek, P.J., Schaub, G.A. 2003. Isolation and characterization of a cDNA encoding for a lysozyme from the gut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 53(3): 134-145. <https://www.doi:10.1002/arch.10090>
- Macours, N., Hens, K. 2004. Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(6): 501-510. <https://www.doi:10.1016/j.ibmb.2004.03.007>
- Matsuura, A., Yao, M., Aizawa, T., Koganesawa, N., Masaki, K., Miyazawa, M., Demura, M., Tanaka, I., Kawano, K., Nitta, K. 2002. Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. *Biochemistry*, 41(40): 12086-12092. <https://www.doi:10.1021/bi016099j>
- Millan, S., Satish, L., Kesh, S., Chaudhary, Y.S., Sahoo, H. 2016. Interaction of Lysozyme with Rhodamine B: A combined analysis of spectroscopic & molecular docking. *J Photochem Photobiol B*, 162: 248-257. <https://www.doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.06.047>
- Price, J.A., Pethig, R. 1986. Surface charge measurements on *Micrococcus lysodeikticus* and the catalytic implications for lysozyme. *Biochim Biophys Acta*, 889(2): 128-135. [https://www.doi:10.1016/0167-4889\(86\)90096-0](https://www.doi:10.1016/0167-4889(86)90096-0)
- Sood, D., Kumar, N., Singh, A., Tomar, V., Dass, S.K., Chandra, R. 2019. Deciphering the Binding Mechanism of Noscapine with Lysozyme: Biophysical and Chemoinformatic Approaches. *ACS Omega*, 4(14): 16233-16241. <https://www.doi:10.1021/acsomega.9b02578>
- Swain, B.C., Mukherjee, S.K., Rout, J., Sakshi, Mishra, P.P., Mukherjee, M., Tripathy, U. 2020. A spectroscopic and computational intervention of interaction of lysozyme with 6-mercaptapurine. *Anal Bioanal Chem*, 412(11): 2565-2577. <https://www.doi:10.1007/s00216-020-02483-1>
- Swan, I.D. 1972. The inhibition of hen egg-white lysozyme by imidazole and indole derivatives. *J Mol Biol*, 65(1): 59-62. [https://www.doi:10.1016/0022-2836\(72\)90491-3](https://www.doi:10.1016/0022-2836(72)90491-3)

- Tang, L., Liang, J., Zhan, Z., Xiang, Z., He, N. 2010. Identification of the chitin-binding proteins from the larval proteins of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 40(3): 228-234. <https://www.doi:10.1016/j.ibmb.2010.01.010>
- Ursic-Bedoya, R.J., Nazzari, H., Cooper, D., Triana, O., Wolff, M., Lowenberger, C. 2008. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *J Insect Physiol*, 54(3): 593-603. <https://www.doi:10.1016/j.jinsphys.2007.12.009>
- Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Bernal, S., Martínez-Campos, C. 2000. [Natural *Trypanosoma cruzi* infection of Triatominae bugs associated with human habitations in Mexico ]. *Salud Publica Mex*, 42(6): 496-503.
- Yu, K.H., Kim, K.N., Lee, J.H., Lee, H.S., Kim, S.H., Cho, K.Y., Nam, M.H., Lee, I.H. 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev Comp Immunol*, 26(8): 707-713. [https://www.doi:10.1016/s0145-305x\(02\)00027-7](https://www.doi:10.1016/s0145-305x(02)00027-7)
- Zaman, M., Safdari, H.A., Khan, A.N., Zakariya, S.M., Nusrat, S., Chandel, T.I., Khan, R.H. 2019. Interaction of anticancer drug pinostrobin with lysozyme: a biophysical and molecular docking approach. *J Biomol Struct Dyn*, 37(16): 4338-4344. <https://www.doi:10.1080/07391102.2018.1547661>