

ROSITA ISA: BOVINO BITRANSGÉNICO QUE PRODUCE LECHE HUMANIZADA

ROSITA ISA: BITRANSGENIC BOVINE THAT PRODUCES HUMANIZED MILK

Andrea Martínez-Peña
Daniela Quintero-González

Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas,
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, CU, Puebla, PUE,
C.P. 72592

201934277@viep.com.mx natasha.huicocheamartinez@viep.com.mx luism.
reyescortes@viep.com.mx

Abstract

Cloning is defined as the process in which identical copies of an organism are obtained asexually, while transgenesis is based on the process of transferring genes from one organism to another. Rosita ISA is the first bitransgenic cloned bovine in the world to which two human genes are incorporated that encode two human milk proteins, lactoferrin and lysozyme, in addition to being highly important for the nutrition of newborns, provide bioactive components for tissue development and physiological functions. This research is not intended to replace the bond between the mother and the infant during lactation, but is dedicated to those infants who, due to various factors, cannot have access to their mothers' milk.

Keywords: Rosita ISA, transgenic bovine, clonation, transgenesis, lactoferrin, lysozyme, infant nutrition, infants, biotechnology, genetic engineering, bitransgenic cow

Resumen

La clonación se define como el proceso en el cual se obtienen copias idénticas de un organismo de manera asexual, mientras que la transgénesis se basa en el proceso de transferir genes de un organismo a otro. Rosita ISA, es el primer bovino clonado bitransgénico en el mundo al cual se le incorporaron dos genes humanos que codifican dos proteínas de la leche humana, lactoferrina y lisozima que además de ser de alta importancia para la nutrición de los recién nacidos, aportan componentes bioactivos para el desarrollo de tejidos y funciones fisiológicas. Esta investigación no pretende sustituir el vínculo de la madre con el infante durante la lactancia, sino que está dedicada a aquellos lactantes que, por distintos factores, no puedan tener el acceso a la leche de sus madres.

Palabras clave: Rosita ISA, bovino bitransgénico, clonación, transgénesis, lactoferrina, lisozima, nutrición infantil, lactantes, biotecnología, ingeniería genética, leche maternizada

Introducción

En los últimos años, la lactancia materna ha ido decreciendo, provocando que los infantes tengan una mayor probabilidad de sufrir enfermedades. La leche materna está compuesta por inmunoglobulinas que tienen la función de proteger a los infantes contra neumonía, diarrea, infecciones de oído, asma, entre otros.

La clonación se define como el proceso en el cual se obtienen copias idénticas de un organismo de manera asexual, mientras que la transgénesis se basa en el proceso de transferir genes de un organismo a otro. Los avances sobre la información del ADN junto con las técnicas de ingeniería genética han permitido el desarrollo de organismos genéticamente modificados que presentan ventajas como producir proteínas de interés biotecnológico.

Germán Kaiser y Nicolás Mucci, investigadores del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Adrián Mutto, de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) presentaron el primer bovino bitransgénico al que se le han incorporado dos genes humanos que codifican proteínas presentes en la leche humana, tales como lisozima y lactoferrina, que tienen una importancia significativa ya que poseen funciones antifúngicas, antibacteriales y antivirales, entre otras. Así, Rosita ISA representa una herramienta clave en la existencia de animales productores de alimentos que son nutricionales para el hombre, especialmente a los infantes que por distintas razones no pudieron tener el acceso a la leche materna.



Figura 1. Investigadores de ROSITA ISA (Germán Kaiser y Nicolás Mucci, investigadores del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y Adrián Mutto, de la Universidad Nacional de San Martín. (INTA, 2015)

Antecedentes

Según la UNICEF, a nivel mundial solo el 43% de bebés menores a seis meses reciben lactancia materna, de tal forma que el 57% no cuenta con ella. Se cree que los bebés que no reciben leche materna en absoluto tienen 14 veces más probabilidades de morir que aquellos que se alimentan solo con leche de fórmula (UNICEF, 2016).

Existen diferentes causas por las cuales un bebé no recibe leche materna; la hipogalactia se define como la producción baja de leche y puede deberse a diferentes factores como la hipoplasia mamaria, SOP, Síndrome de Sheehan, alteraciones de la glándula tiroides, anorexia y retención de placenta (Abascal & Romero, 2012); por trabajo, enfermedad de la madre, dificultad para asir al pecho y cuestiones éticas (Ruiz Poyato & Martínez Galiano, 2014).

Una de las alternativas más comunes a la lactancia natural es la alimentación a base de biberón, puede ser con fórmulas infantiles manufacturadas, leche de entera o de algún animal, pero estas opciones pueden tener ciertas desventajas, mientras que la leche materna su principal función es protectora, los métodos alternativos aumentan el riesgo de infección, debido a algún patógeno no deseado, también puede contribuir a la malnutrición proteinoenergética (MPE), incluyendo el marasmo nutricional (FAO, 2002) a pesar de que algunas fórmulas actuales presentan compuestos adicionales para aportar una mayor nutrición, científicos han demostrado que la leche materna contiene diferentes proteínas que aún no han sido agregadas a las leches de fórmulas (Beck et al., 2015).

Actualmente, se ha presentado otra alternativa para la lactancia, presentada por investigaciones en las que los bovinos producen lactoferrina o lisozima, proteínas que funcionan como nutracéuticas y antimicrobianas. La leche bovina tiene un mayor contenido de proteínas totales que la leche humana, pero algunas de las proteínas de la secreción humana no están presentes o se encuentran en niveles más bajos en la leche bovina. Entre las que se encuentran en niveles más bajos, la lactoferrina y la lisozima son proteínas que brindan una fuerte defensa al recién nacido debido a su actividad antimicrobiana contra un amplio es-

pectro de bacterias, virus, levaduras, hongos y parásitos (Farnaud y Evans, 2003; Bayarri et al., 2014). La lactoferrina es la principal proteína antimicrobiana en la leche de la mayoría de los mamíferos; es una glicoproteína de aproximadamente 80 kDa que pertenece a la familia de proteínas fijadoras de hierro denominadas transferrinas (González-Chávez et al., 2009). La lactoferrina es sintetizada por las células epiteliales de las mucosas externas, presente también en algunos fluidos corporales, como las lágrimas y la saliva, aunque los niveles más altos se detectan en las secreciones lácteas (Farnaud y Evans, 2003). Sin embargo, la cantidad de lactoferrina es bastante diferente entre la leche humana y la bovina; en el calostro humano la concentración es de alrededor de 6 mg/mL, mientras que en el calostro bovino es de alrededor de 1 mg/mL. En ambas especies, la concentración de lactoferrina disminuye drásticamente en los primeros días de lactancia, manteniéndose alrededor de 2 y 0,1 mg/mL en leches maduras humana y bovina, respectivamente (Sánchez et al., 1988; Montagne et al., 2001).

La lisozima es una enzima de unos 14 kDa que consta de una cadena polipeptídica de 130 AA. Se distribuye ampliamente en fluidos corporales como lágrimas, saliva, sangre y otras secreciones, desempeñando un papel importante en las defensas inespecíficas del individuo. (Zhou et al., 2014). La lisozima es una enzima hidrolasa capaz de dañar las células bacterianas al romper el enlace glucosídico -(1-4) entre la N -acetilglucosamina y el ácido N -acetilmurámico de la cadena de peptidoglicano presente en la pared celular bacteriana (Niyonsaba y Ogawa, 2005). En la leche humana la concentración de lisozima es de alrededor de 0,37 y 0,24 mg/mL en calostro y leche madura, respectivamente (Montagne et al., 2001), mientras que en la leche bovina su concentración es prácticamente indetectable, alrededor de 10 ng/mL (Król et al., 2010).

María Elisa Drago Serrano, en 2007 describe diversas metodologías para obtener lactoferrina a partir de vacas transgénicas, mientras que (Yang et al., 2011) logró obtener un rebaño de bovinos clonados transgénicos que expresan la lisozima humana recombinante (rHLZ) en su leche, no sólo ofreciendo los beneficios nutricionales similares a la leche humana, sino que de igual forma presentan las herramientas para la producción de lisozima humana activa

a gran escala. Un punto clave es que en los presentes estudios, dichas proteínas sólo habían sido producidas por separado.

La producción del bovino doble transgénico, paso a paso

Rosita ISA, es el primer animal que expresa las dos proteínas: lisozima y lactoferrina, al mismo tiempo. Esto se obtuvo bajo una serie de pasos mostrados y descritos ver Figura 2, a continuación:

1. Se seleccionó una vaca Jersey como espécimen a clonar, donde se tomó una muestra de piel del pabellón auricular.
2. Posteriormente se estudió la muestra de piel en laboratorio y se procesó un cultivo primario de células que son llamadas fibroblastos.
3. Más adelante, mediante ingeniería genética se acondicionó un vector que contenía los dos genes humanos de interés
4. El cultivo de fibroblastos fue transferido con el vector. El material genético fue incorporado al núcleo de las células.
5. Por consiguiente se produjeron ovocitos de vacas que fueron madurados de manera in vitro.
6. Por medio de la micromanipulación se separó el núcleo del ovocito, eliminando toda su información genética.
7. Después el ovocito fue incorporado a una célula transgénica y se fusionaron con un pulso eléctrico. De tal modo que el núcleo del ovocito se transformó en núcleo embrionario y se generó un embrión.
8. Tras siete días en el cultivo, se transfirió el embrión a una vaca receptora, que se encontraba sincronizada con la edad del embrión, para poder seguir con su gestación.
9. Nueve meses después, nació Rosita Isa en un parto por cesárea. Recibiendo cuidados especiales durante sus primeros meses de vida.
10. Rosita ISA fue analizada posteriormente para corroborar que la transgénesis y la clonación fueran exitosas, donde en su genoma portara los dos genes humanos de interés.

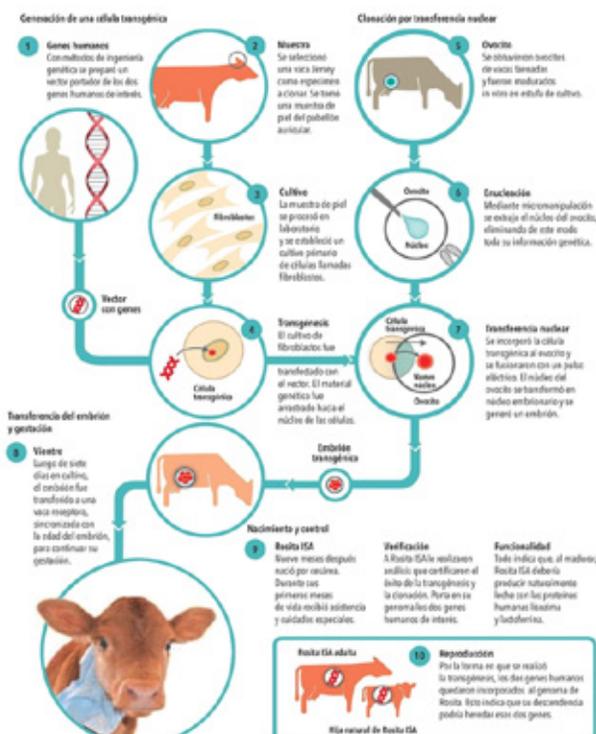


Figura 2. Metodología para la producción de Rosita Isa, bovino bitransgénico. (INTA, 2015)

Mucci, et al. 2011 menciona que como primer paso fue obtener una muestra de tejido del pabellón auricular de una vaca Jersey para establecer el cultivo primario de fibroblastos con el tejido. Después se seleccionó como base el vector pIRES2- EGFP, al cual se añadió el promotor de la beta-caseína, los ADN copia de la lactoferrina y lisozima humanas. Mucci, et al. menciona que “luego de que el material genético de ese nuevo vector (denominado “pIRES-hLf-hLs/Neo”) fue añadido a los fibroblastos por lipofección y, tras un tiempo de cultivo y selección celular, se obtuvieron células resistentes, dicho en otras palabras contenían el vector de interés. Las células transgénicas fueron añadidas, mediante clonación, a un ovocito madurado in vitro cuyo núcleo anterior fue extraído por micromanipulación. Una vez dentro, el contenido de ese ovocito modificado se transformó en un núcleo embrionario que luego se transfirió a una vaca que quedó preñada” (Mucci, et al. 2011).



Figura 3. Rosita ISA produce leche similar a la materna. (INTA, 2015)

Las proteínas

Algunos estudios efectuados en los últimos años sugieren el hecho de que la alimentación materna previene infecciones en los recién nacidos, sobre todo aquellas que afectan el tracto gastrointestinal y el respiratorio. Además, en estudios recientes se sugiere que la leche materna y el calostro no sólo proveen protección pasiva, sino que también participan en el desarrollo y maduración del sistema inmunológico del recién nacido mediante factores biológicamente activos (Pabst HF, 1997).

Los factores bioactivos presentes en la leche materna, como se mencionó con anterioridad son:

Lactoferrina. La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína que se encuentra en las secreciones exocrinas, sangre y leucocitos de varias especies. Esta proteína está presente en la leche de todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha. La Lf se encuentra en glándulas salivales del neonato, pero aparentemente no atraviesa la placenta (Castro A. 2003). Dentro de sus funcionalidades más importantes se incluye actividad bacteriostática, bactericida, fungicida y viricida. Su función más importante en las mucosas es su actividad microbicida, la cual se debe a la interferencia con el metabolismo y crecimiento bacteriano por privar de hierro el medio en donde se encuentran los microorganismos.

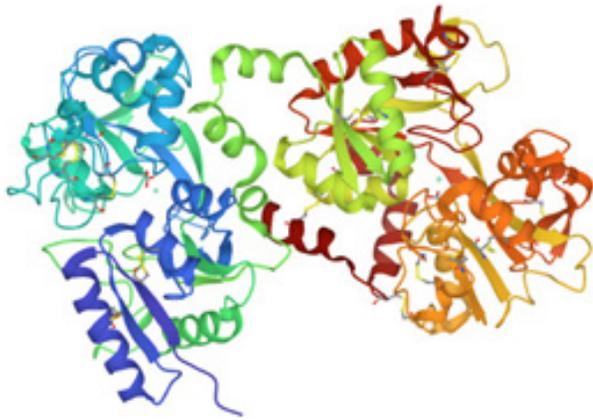


Figura 4. Estructura cristalina de un complejo de lactoferrina. (Sharma et al., 2016)

Lisozima. Al igual que la lactoferrina, la lisozima se encuentra en los fluidos corporales como son orina, jugo pancreático, lágrimas, saliva, leche materna entre otros. La concentración de lisozima en leche humana es superior a la encontrada en leche de otras especies (Raghuveer T.S. et al, 2002). La concentración en leche materna varía durante la lactancia de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los primeros días, cae a 25-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al mes, y se incrementa hasta 245 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de los 6 meses de lactación (Raghuveer T.S. et al, 2002).

Nutrición Infantil

El período más vulnerable para el ser humano es la infancia, etapa de maduración y desarrollo de órganos vitales y defensas inmunitarias que permitirán combatir futuras condiciones clínicas (Rodríguez-Avilés et al. 2020).

La composición de la leche materna varía según el período de lactancia, por lo que se denomina elemento de vida que evoluciona y se interrelacionan en proporción a las necesidades del niño (Rodríguez-Avilés et al. 2020). “Durante la etapa del destete, la leche involuciona y pasa por una etapa semejante al calostro al reducirse el vaciamiento” (Shellhorn & Valdés, 1995).

Mucci y colaboradores destacan que la leche secretada por los terneros después de la edad adulta es similar a la leche humana, lo que puede compensar algunas deficiencias de la leche y puede ser utilizada por niños que no pueden obtener leche materna, aunque esta finalidad los “excede absolutamente” ya que desconocen la futura utilización concreta de esta tecnología que desarrollaron, debido fundamentalmente a que no existen marcos regulatorios sobre el consumo de alimentos de origen de animales genéticamente modificados (Mucci, et al. 2011).



Figura 5. Estructura gráfica de la lisozima. (Swaminathan, J., 2022)

Metodología Genética

El uso de biotécnicas reproductivas en la producción animal ha significado en los últimos cincuenta años un impacto de gran magnitud, con consecuencias en la elaboración de alimentos, tanto en su calidad como en la cantidad. Las biotecnologías utilizadas fueron dos: la obtención de células transgénicas para las proteínas de interés y la clonación por transferencia de células somáticas (Adrián A. Mutto. 2009).



Figura 7. Desde hace 30 años, científicos expertos en genética han intervenido los genes de los bovinos para mejorar su rendimiento, las propiedades de la leche o su manejo. (Infobae, s.e)

Las células modificadas genéticamente que contienen genes humanos en su ADN se obtienen mediante métodos de ingeniería genética. Esto es lo innovador de este trabajo, ya que se pueden incluir dos genes humanos en un solo sitio en el genoma bovino, posibilitando la expresión de estas dos proteínas solo en la glándula mamaria durante la lactancia (Adrián A. Mutto. 2009).

Mediante técnicas de clonación, se reemplaza el núcleo del ovocito por el de una célula transgénica. Los embriones resultantes son transferidos a vacas receptoras, dando como resultado la gestación y nacimiento de una ternera llamada ISA (I del INTA, SA de San Martín). Con el fin de controlar todos sus parámetros fisiológicos después del parto, se instaló una unidad de neonatología en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce. Los terneros fueron confirmados como clonales y doblemente transgénicos por métodos de biología molecular basados en secuenciación de ADN (Adrián A. Mutto. 2009).



Figura 8. Ternera bitransgénica (Rosita ISA) a los cuatro meses de edad (Mucci et al., 2011)

Adrian Mutto menciona que: “La posibilidad de comercializar alimentos transgénicos que puedan ser beneficiosos para la nutrición y la salud humana deberán pasar por estrictos controles sanitarios y medioambientales, el desarrollo de este tipo de animales puede llegar a ser trascendental para una la población mundial que en 2050 llegaría a los 9100 millones de personas, según una estimación de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)”.

Aceptación social

El desarrollo del bovino transgénico Rosita ISA, es un nuevo ejemplo de las capacidades que tienen los sistemas públicos locales de investigación con conocimiento científico, trabajo colaborativo de diferentes equipos de investigación, infraestructura apropiada, recursos financieros adecuados y la planeación estratégica necesaria. Como todo desarrollo progresivo, merece atención local e internacional, por lo que es necesario tanto comunicarlo con precisión cómo leerlo con un análisis informado y una mente abierta para considerar nuevas estrategias de intervención que trabajen en las necesidades de la sociedad. (Mucci, et al. 2011).

Conclusión

La presencia de las proteínas lactoferrina y lisozima humana en la leche de la primera vaca bi-transgénica del mundo es sin duda un logro muy importante, lo que permite el punto clave en el proceso de diseño de leche maternizada con valor agregado para la nutrición y desarrollo del recién nacido. Es significativo que ambas proteínas expresadas en la leche tengan actividad antimicrobiana y constituyan el sistema de defensa inespecífico de la leche. A pesar de los bajos niveles de lactoferrina y lisozima humana en la leche y en el calostro bitransgénico, este bovino es muy prometedor, ya que podría traer grandes beneficios para la nutrición y la salud humana en un futuro cercano.

Declaración de privacidad

Los datos personales facilitados por los autores a RD-ICUAP se usarán exclusivamente para los fines declarados por la misma, no estando disponibles para ningún otro propósito ni proporcionados a terceros.

Declaración de no Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de interés alguno

Agradecimientos

Los autores agradecemos al Dr. Enrique González Vergara por la dedicación y su invaluable asesoría con la que nos enseñó toda la metodología necesaria para cumplir con los requisitos básicos para lograr este proyecto.

Así como agradecemos a la comunidad científica de Argentina por su enorme labor para lograr este avance que sin duda será de mucha ayuda para muchos lactantes.

Referencias bibliográficas

Abascal, V., & Romero, C. (2012). Hipogalactia: causas y orientación de manejo. 1(3). Retrieved from https://mgyf.org/wp-content/uploads/2017/revistas_antes/V1N3/V1N3_143_147.pdf

Adrian Mutto 2009. ODM 1 >> Erradicar la pobreza extrema y el hambre. Experiencia II: Producción de leche de alto valor nutricional en bovino bitransgénicos generados por clonación. Contribuciones de las Universidades e Institutos Universitarios que conforman el Consejo Interuniversitario Nacional Relevamiento 2012. Pag. 4-6. Recuperado de: https://bibliotecadigital.cin.edu.ar/bitstream/123456789/2308/1/odm_y_universidades_2012.pdf

Ana María Castro, Mercedes Graciela Porras Villalobos. (2003) La protección de leche materna a los recién nacidos. Una visión actualizada. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/pediat/sp-2003/spo31g.pdf>

Argentina, I. (2015). Rosita ISA dio leche maternizada [YouTube Video]. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=l5CrB-TY19o>

Base de datos mundial de UNICEF. (2016). Con base en Encuestas Agrupadas de Indicadores Múltiples (MICS), Encuestas de Demografía y Salud (DHS) y otras fuentes representativas a nivel nacional. https://www.unicef.org/media/47731/file/UNICEF_WHO_Capture_the_moment_EIBF_2018_SP.pdf

Bayarri, M., N. Oulahal, P. Degraeve, & A. Garshallaoui. (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *J. Food Eng.* 131:18–25.

Beck, K. L., Weber, D., Phinney, B. S., Smilowitz, J. T., Hinde, K., Lönnerdal, B., Lemay, D. G. (2015). Comparative Proteomics of Human and Macaque Milk Reveals Species-Specific Nutrition during Postnatal Development. *Journal of Proteome Research*, 14(5), 2143–2157. <https://doi.org/10.1021/pr501243m>

Data, P. (2016). RCSB PDB - 1QJM: Crystal Structure of a Complex of Lactoferrin with a Lanthanide Ion (SM₃⁺) at 3.4 Angstrom Resolution. *Rcsb.org*. <https://www.rcsb.org/structure/1QJM>

Drago Serrano, M. E., (2007). Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(3),30-38. ISSN: 1870-0195. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938306>

Farnaud, S., & R. W. Evans. (2003). Lactoferrin—A multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 40:395–405.

File:PDB 1qm1 EBI.jpg - Wikimedia Commons. (2022). *Wikimedia.org*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PDB_1qm1_EBI.jpg

Genome.gov. (2015). Clonación. https://www.genome.gov/sites/default/files/inline-images/clonacion_o.jpg

Gonella Diaz, Á. M., Atuesta Bustos, J. E., Bernal Ulloa, S. M., & Chacón Jaramillo, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro.

González-Chávez, S. A., S. Arévalo-Gallegos, & Q. Rascón-Cruz. (2009). Lactoferrin: Structure, function and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33:301.e1–301.e8.

Kaiser, G. G., Mucci, N. C., González, V., Sánchez, L., Parrón, J. A., Pérez, M. D., ... Mutto, A. A. (2017). Detection of recombinant human lactoferrin and lysozyme produced in a bitransgenic cow. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1605–1617. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11173>

Król, J., Z. Litwińczuk, A. Brodziak, & J. Barłowska. (2010). Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Pol. J. Vet. Sci.* 13:357–361

Latham, M. C. (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Capítulo 7. Lactancia materna. ISBN 92-5-303818-7 Retrieved November 10, 2022, from Fao.org website: <https://www.fao.org/3/wo073s/wo073soo.htm#Contents>

Montagne, P., M. L. Cuillière, C. Molé, M. C. Béné, & G. Faure. (2001). Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501:241–247.

Mucci, N., Mutto, A., & Kaiser, G. (2011). El primer bovino bitransgénico del mundo. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 37(2),112-117.[fecha de Consulta 16 de Noviembre de 2022]. ISSN: 0325-8718. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86421189002>

Niyonsaba, F., & H. Ogawa. (2005). Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *J. Dermatol. Sci.* 40:157–168

Pabst HF. Immunomodulation by breast-feeding. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 991.

Raghuveer T.S., McGuire E.M., Martin S.M., Wagner B.A., Rebouche C.J., Buettner G.R., Widness J.A. 2002. Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron induced oxidation products. *Pediatric Research*, 52(6): 964-972.

Rodríguez Aviles, D. A., Barrera Rivera, M. K., Tibanquiza Arreaga, L. del P., & Montenegro Villavicencio, A. F. (2020). Beneficios inmunológicos de la leche materna. *RECIAMUC*, 4(1), 93-104. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/4.\(1\).enero.2020.93-104](https://doi.org/10.26820/reciamuc/4.(1).enero.2020.93-104)

Rodríguez Pargas, A., Junco Barranco, J. A., Rodríguez Pargas, A. D. L. C., & de la Cruz Cardoso, M. A. (2003). Implicaciones éticas de la transgénesis y la clonación. *Humanidades Médicas*, 3(1), 0-0.

Rosita ISA produce “leche maternizada” | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2012). [Inta.gob.ar. https://inta.gob.ar/noticias/rosita-isa-produce-leche-maternizada](https://inta.gob.ar/noticias/rosita-isa-produce-leche-maternizada)

Ruiz Poyato, P., & Martínez Galiano, J. M. (2014). Causas del abandono de la lactancia materna exclusiva en una zona básica urbana. *Ene*, 8(2). <https://doi.org/10.4321/s1988-348x2014000200004>

Shellhorn, C., & Valdés, V. (1995). LA LECHE HU-MANA, COMPOSICION, BENEFICIOS Y COM-PARACIÓN CON LA LECHE DE VACA. Santiago de Chile: UNICEF. Recuperado el Enero de 2020, de <https://www.unicef.cl/lactancia/docs/modo1/Mod%201beneficios%20manual.pdf>

Sánchez, L., P. Aranda, M. D. Pérez, & M. Calvo. (1988). Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369:1005–1008 UNICEF. (2016). Retrieved November 11, 2022, from Unicef.org website: <https://www.unicef.org/es/comunicados-prensa/en-todo-el-mundo-77-millones-de-reci%C3%A9n-nacidos-no-reciben-leche-materna-en-su#:~:text=A%20nivel%20mundial%2C%20s%C3%B3lo%20el,alimentan%20s%C3%B3lo%20con%20leche%20materna.>

Yang, B., Wang, J., Tang, B., Liu, Y., Guo, C., Yang, P., ... Li, N. (2011). Characterization of Bioactive Recombinant Human Lysozyme Expressed in Milk of Cloned Transgenic Cattle. *PLoS ONE*, 6(3), e17593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017593>

Zhou, X., Y. Yu, J. Tao, & L. Yu. (2014). Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 118:420-425.