

CONSERVATION MEDICINE

Factores protectores en la secreción láctea del tapir de tierras bajas (*Tapirus terrestris*) durante el periodo perinatal.

María Eugenia Pérez^{1,4,5}, Paula González Ciccía^{2,4}, Felipe Castro^{1,4}, Francisco M. Fernández^{3,4}

¹ Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251 (4000), Tucumán, Argentina.

² Fundación Temaikén. Ruta provincial 25 Km 0,70 (1625) Escobar, Buenos Aires, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 (4000), Tucumán, Argentina.

⁴ Grupo Argentino de Tapires.

⁵ E-mail: maeuge75@hotmail.com.

Resumen

La obtención de nutrientes y factores protectores presentes en la leche es vital para asegurar la supervivencia y adecuado desarrollo de todos los mamíferos. Se caracterizaron los cambios que ocurren en la composición de la secreción láctea de *Tapirus terrestris* antes y después del nacimiento de la cría. Se analizó una serie de muestras de secreción láctea de una hembra de tapir de tierras bajas, obtenidas en forma secuencial durante un mes. Se determinó concentración de proteínas totales, proteínas del lactosuero y glúcidos. También se obtuvo información a cerca de la inmunoglobulina G y otros factores protectores como ser lisozima y amilasa, enzimas presentes en la leche. Los resultados mostraron que la concentración de lactosa fue menor en el periodo preparto comparado con el postparto. En contraste, la concentración de proteínas totales y de inmunoglobulina G fue mayor en el precalostro y calostro en comparación con la leche madura. Asimismo se observó una elevada actividad de amilasa y lisozima en el precalostro. La actividad de estas enzimas disminuyó en forma sostenida hasta el tercer día posparto, luego del cual los niveles de actividad se estabilizaron en valores constantes durante el primer mes de vida, proporcionando al recién nacido la protección que necesita.

Palabras claves: Calostro, Inmunoglobulina, Lisozima, Perinatal, Tapir.

Abstract

Obtaining nutrients and protective factors present in milk is vital to ensure the survival and proper development of all mammals. Changes occurring in the composition of *Tapirus terrestris* mammary secretion before and after birth were characterized. For this we used a series of mammary secretion samples from a female lowland tapir obtained sequentially for a month. Concentrations of total protein, whey proteins and carbohydrates were determined. We also obtained information about immunoglobulin G and protective factors such as lysozyme and amylase, enzymes found in milk. Results showed that lactose concentration was lower in the prepartum period compared with postpartum. In contrast, the concentration of total protein and immunoglobulin G were higher in precolostrum and colostrum compared with mature milk. In addition, we noted a high activity of both amylase and lysozyme in the precolostrum. The activity of these enzymes decreases steadily until day 3 postpartum, after which their activity levels stabilize and at constant values during the first month of life, giving the newborn the protection it needs.

Keywords: Colostrum, Immunoglobulin, Lysozyme, Perinatal, Tapir.

Introducción

La cría recién nacida de los tapires, como la mayoría de los mamíferos, es dependiente del calostro y de la leche de su madre para obtener los nutrientes y factores protectores necesarios para su supervivencia y adecuado desarrollo. Ello se debe al

hecho de que los perisodáctilos, como otros grupos de mamíferos, presentan una estructura placentaria de tipo epiteliocorial difusa (Pukazhenthil *et al.* 2013) que impide el paso de grandes moléculas directamente de la madre al feto durante la gestación. El estudio de estos factores protectores provee información que nos permite comprender el comportamiento fisiológico de la especie y el grado nutricional e inmunológico de la leche de tapir en distintas etapas de la lactancia. Por otra parte también la presencia de estos factores protectores podrían contribuir a la supervivencia de las crías, fundamentalmente en estado silvestre y desde este lugar contribuir a la conservación de la misma, la cual se encuentra en estado de vulnerabilidad y en Argentina particularmente, en peligro de extinción (Chalukian *et al.* 2009; Quse & González Ciccía, 2008; Ojeda *et al.* 2012).

Las concentraciones de inmunoglobulinas, especialmente inmunoglobulina G (IgG) han sido muy estudiadas en otras especies relacionadas filogenéticamente, como lo son yegua (*Equus caballus*) y burra (*Equus asinus*), debido a la importancia que presentan en la transmisión pasiva de anticuerpos a la cría (LaBlanc *et al.* 1992). Este tema también fue estudiado, aunque en menor medida, en algunas especies de rinocerontes, como *Ceratotherium simum* (Osthoff *et al.* 2007) y *Rhinoceros unicornis* (Nath *et al.* 1993). Calostros con niveles muy bajos de IgG suponen un riesgo significativo para la salud del neonato. Asimismo, son de particular interés otros factores protectores que se encuentran en calostro y leche. Sin embargo, para la mayoría de las especies existe información muy limitada acerca de los otros componentes, especialmente antes de la parición. *Tapirus terrestris* se encuentra entre las especies sobre las cuales no existe suficiente información al respecto; habiendo datos sobre la concentración de minerales, lactosa y proteínas en leche de *Tapirus terrestris* (Medici P., comunicación personal) y *Tapirus indicus* (Zainal Zahari, comunicación personal).

La lisozima (Lz) es un factor de inmunidad no específico, el cual juega un rol en la protección del neonato al ejercer una acción bacteriostática en el tracto gastrointestinal (Goldman, 1993). La lisozima hidroliza los enlaces glicosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina que forman la pared celular bacteriana. La actividad de esta enzima ha sido estudiada en la leche de un gran número de especies, incluyendo la humana, camélidos (Duhaiman, 1988), bovinos, caprinos, mamíferos marinos y equinos (Stelwagen, 2003; Castro *et al.* 2009), entre otras especies. La concentración y la actividad de lisozima varían considerablemente en la leche de las diversas especies (Jensen *et al.* 1995). Las mayores concentraciones observadas hasta el momento se encuentran en la leche humana y de yegua, mientras que la leche de vaca y cabra presentan los niveles más bajos.

La amilasa, es otra de las enzimas presente en la secreción láctea, cuya actividad es variable entre las distintas especies de mamíferos. La α -amilasa de la leche es similar a la amilasa salival, aunque su función en la secreción láctea no está del todo clara, puesto que la leche bovina no contiene almidón, solo bajos niveles de oligosacáridos, por lo tanto no habría sustrato para esta enzima. La leche humana tampoco contiene almidón, pero sí más de 130 oligosacáridos en una alta concentración. Estos oligosacáridos están formados por lactosa y contienen monosacáridos poco comunes (ej. fucosa y ácido N-acetilneuramínico) unidos por inusuales enlaces glicosídicos; por lo tanto es improbable que la α -amilasa, la cual es altamente específica para enlaces glicosídicos α (1-4), que unen moléculas de glucosa, pueda hidrolizar los oligosacáridos en la leche (Gnoth *et al.* 2002). Sin embargo existe un efecto hidrolítico de esta enzima sobre los polisacáridos que forman la pared celular de las bacterias, por lo cual se ha sugerido que la amilasa de la leche también podría tener actividad antibacteriana (Lindberg & Skude, 1982) y esta sería la principal función en la secreción láctea.

El objetivo de este trabajo consistió en obtener información acerca de la inmunoglobulina G, y otros factores protectores como son las enzimas lisozima (Lz) y amilasa en la secreción láctea de *Tapirus terrestris* durante el período perinatal, así como también los cambios que podrían acompañar la transición desde precalostro hasta leche madura.

Materiales y Métodos

Se analizaron diez muestras de leche de una hembra adulta (8 años) de tapir (*Tapirus terrestris*) perteneciente a la Fundación Temaikén, Buenos Aires, Argentina. Este ejemplar había nacido en cautiverio en la Estación de Fauna Autóctona de la provincia de Salta, Argentina y luego había sido trasladada al Centro de Reproducción de Especies Temaikén (CRET), donde se encontraba alojada en un recinto separado de otros tapires. Esto permitió que el seguimiento de su gravidez, y luego, el de la lactancia fuera el adecuado desde el punto de vista veterinario, asegurando así condiciones fisiológicas óptimas, tanto de la madre como de la cría. Las muestras fueron obtenidas fácilmente, mediante ordeño manual, ya que la hembra de tapir había sido preparada mediante condicionamiento. Dichas muestras fueron obtenidas en forma secuencial, desde una semana antes del nacimiento de la cría hasta el día 36° de lactación, aplicando un protocolo de extracción y seguimiento (Fernández & Quse, 2006, comunicación personal). Este protocolo otorga las pautas para lograr una correcta recolección de las muestras, sobre todo cuando se busca estudiar la variación de los componentes de la leche en los primeros días de lactación, y como lograr

la conservación de las mismas hasta el momento de ser procesadas. Las muestras fueron conservadas mediante el agregado de bicromato de potasio al 1% y mantenidas a -20°C hasta que fueron analizadas, aproximadamente diez días después de la última toma de muestra.

Con la finalidad de lograr la separación del lactosuero, se realizó la precipitación ácida de las caseínas a través del agregado de *buffer* acetato de sodio (pH 4,3) y posterior centrifugación (Fernández & Hernández de Sánchez, 2006). Luego se realizaron determinaciones de proteínas totales y proteínas del lactosuero utilizando el método de Lowry *et al.* (1951), con una solución de seroalbúmina bovina como estándar. Las determinaciones de glúcidos se realizaron por el método de Winzler (1955), utilizando una solución de lactosa como estándar, previa precipitación de las glicoproteínas con ácido tricloroacético. Con la finalidad de estimar la concentración de IgG en los diferentes días de lactación, se realizaron en primer lugar electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para lograr la separación de las proteínas del lactosuero, según la técnica descrita por Harris y Angal (1989). Se corrieron las muestras correspondientes a los diferentes días de lactación junto con los marcadores de peso molecular (entre 150 kDa y 15 kDa). Posteriormente los geles fueron teñidos con Coomassie *brillant blue* R250. Las proteínas específicas fueron identificadas en base a la migración en el gel y por co-migración con proteínas conocidas de leche de vaca. Los geles fueron fotografiados y las imágenes procesadas digitalmente mediante un *software* específico (QuantiScan Biosoft, USA). Este *software* permite analizar densitométricamente las imágenes, con la finalidad de determinar el porcentaje de proteína correspondiente a cada banda electroforética, en este caso, la banda correspondiente a la inmunoglobulina G.

La actividad de lisozima se determinó espectrofotométricamente utilizando el método turbidimétrico, es decir midiendo la lisis de una suspensión de bacterias susceptibles mediante la disminución de la densidad óptica. Se usó una suspensión de *Micrococcus luteus* (Sigma, MO, USA) en *buffer* Hepes 50 mM con una densidad óptica inicial de 0,600 a 540 nanómetros (Castro *et al.* 2009). Las reacciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro

con arreglo de diodo Hewlett-Packard 8453.

El análisis de la actividad enzimática de amilasa se efectuó utilizando un Kit para determinación de amilasa sérica (Wiener lab.), adaptado en nuestros laboratorios para lactosuero (Ls). El procedimiento se basa en determinar la actividad de la enzima mediante el método cinético que corresponde a la observación del incremento en la formación del producto (2-clorop-nitrofenol) durante los primeros 3 minutos de reacción, lapso en el cual la reacción es lineal. Se probó dicha actividad a diferentes pH: 4,35; 6,8 y 8,8.

Los datos aportados por los ensayos fueron procesados estadísticamente mediante el *software* OriginLab.

Resultados

El periodo final que lleva al nacimiento de la cría representa el estadio final tanto del desarrollo estructural de la glándula mamaria como de la diferenciación funcional. Las muestras colectadas entre siete días y un día antes del nacimiento corresponden al precalostro, representan los últimos estadios del desarrollo estructural mamario y formación de calostro. Las muestras desde el día cero al día tres después del nacimiento son consideradas calostro, es decir la primera leche que será consumida por la cría. Las muestras desde el día tres al día 36 posparto representan la transición desde la composición calostrual hasta leche madura.

Los resultados mostraron que la concentración de glúcidos fue menor en el período preparto comparado con el periodo posparto (Tabla 1). Los glúcidos se determinaron luego de precipitar las proteínas de las muestras con ácido tricloroacético, de manera que el componente glucídico medido fue lactosa principalmente. Se encontró una media de 1.62 ± 0.65 g/dl en precalostro, 2.98 ± 0.56 g/dl en calostro, 4.04 ± 0.34 g/dl en leche de transición y 4.66 ± 0.44 g/dl en leche madura en el primer mes de lactación. Estos datos resultan de gran interés debido a que la lactosa y los oligosacáridos son los carbohidratos de uso inmediato para la obtención de energía por el neonato.

Respecto a las proteínas, existe una mayor concentración de proteínas totales y de proteínas del lactosuero en el precalostro y calostro en relación a las presentes en leche madura (Pérez *et al.* 2010). Las

Tabla 1: Concentración de glúcidos, proteínas totales y proteínas del lactosuero en los diferentes estadios de lactación de *Tapirus terrestris*. Las concentraciones se representan como valores medios y desviación *standard*.

Concentración	Precalostro	Calostro	Leche de transición	Leche madura
Glúcidos	1,62 ± 0,65	2,98 ± 0,56	4,04 ± 0,34	4,66 ± 0,44
Proteínas totales	26,97 ± 7,1	16,7 ± 4,53	9,65 ± 2,5	7,85 ± 0,81
Proteínas del lactosuero	15,83 ± 6,3	9,57 ± 3,28	4,25 ± 0,13	4,27 ± 0,4

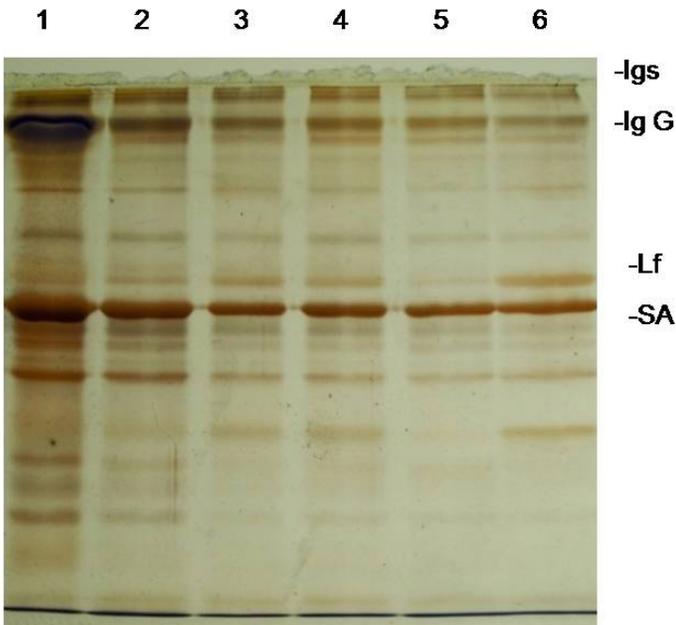


Figura 1: SDS-PAGE de lactoserum de *Tapirus terrestris* a partir del nacimiento de la cría hasta el día 36 posparto. 1: día cero (nacimiento); 2: día tres de lactación; 3: día siete de lactación; 4: día 11 de lactación; 5: día 29 de lactación; 6: día 36 de lactación. Se marcan las proteínas identificadas: Inmunoglobulinas (Igs); Inmunoglobulina G (IgG), Lactoferrina (Lf), seroalbumina (SA).

concentraciones generalmente elevadas de proteínas en las secreciones anteriores al parto y cercanas a éste, son consistentes con el incremento en las inmunoglobulinas que ocurre en ese periodo. Sin embargo, otras proteínas contribuyen también al incremento preparto en el contenido proteico, por ej. seroalbumina, α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, y otras proteínas menores, tal como se observó a partir de la medición de proteínas totales en cada uno de los días de lactación (Tabla 1) y de la intensidad relativa de las distintas bandas en los geles de electroforesis (Figura 1).

La individualización de varias de las proteínas fue posible por comparación de los patrones migratorios de las mismas, con aquellos previamente publicados para leche de otros perisodáctilos (Herrouin *et al.* 2000; Miranda *et al.* 2004; Vincenzetti *et al.* 2008).

Algunas de estas proteínas fueron identificadas, tal es el caso de inmunoglobulina G (Mr aprox.150 kDa.). Se observa que la misma está presente en mayor cantidad en el calostro que en leche madura, y su mayor concentración ocurre especialmente justo antes del nacimiento

de la cría (Figura 2). En perisodáctilos la transmisión de inmunidad pasiva, es decir de las inmunoglobulinas ocurre solamente después del nacimiento a través del calostro (Langer, 2009) y previsiblemente, disminuyen muy rápido en los primeros días.

En referencia a las determinaciones de actividad de lisozima, se observó que esta aumenta ligeramente entre el día -7 y -6 de lactación y luego disminuye en forma sostenida, desde valores elevados (respecto a lo conocido sobre Lz en leche de otros mamíferos, según Castro *et al.* 2009) en el día -4 (480 mU/min) hasta el día 3 posparto en que se estabiliza y mantiene valores medianos pero constantes durante el primer mes de vida, entre 118 y 91,4 mU/min (Figura 3A).

Respecto a la amilasa, se probó la actividad a pH 4.35, que es el grado de acidez con el que se obtiene el lactoserum después de la precipitación de las caseínas y se vio que no había actividad, por lo cual se probó también con muestras obtenidas a pH 6.8 y 8.8. En ambos casos se encontró un buen nivel de actividad de la enzima, aunque para efectuar el seguimiento de dicha actividad durante el primer mes se optó por emplear las muestras obtenidas solamente por centrifugación, que son aquellas que presentaban pH 6.8. Se observó que de igual manera a lo que ocurre con la actividad de lisozima, esta desciende de valores muy altos en el día -7 (5338 U/l) hasta el tercer día después del nacimiento (105 U/l), manteniéndose alrededor de este valor durante el primer mes (Figura 3B), con la diferencia que este descenso comienza tres días antes que el correspondiente a Lz.

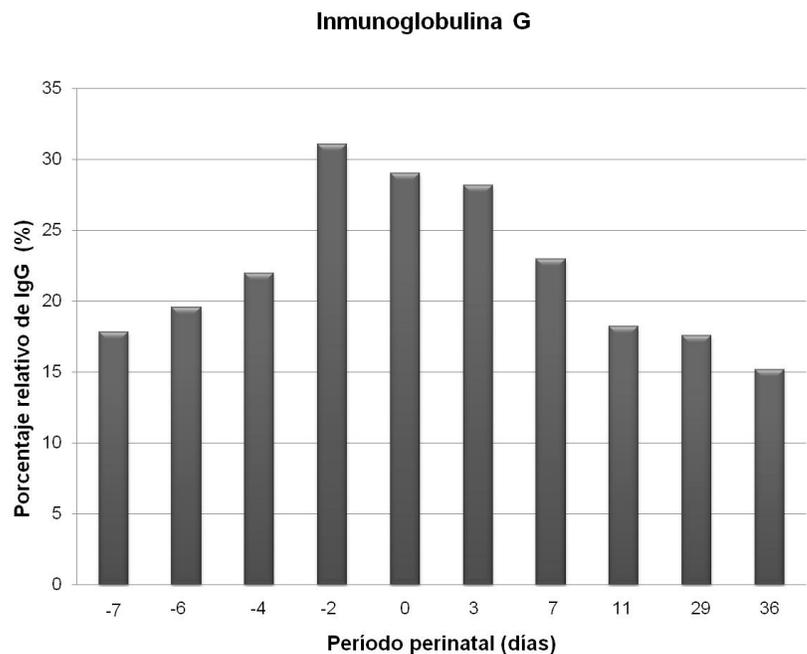


Figura 2: Variación del porcentaje relativo de IgG en los diferentes días de lactación, obtenidos a partir del análisis densitométrico de las bandas correspondientes a IgG en los geles de electroforesis.

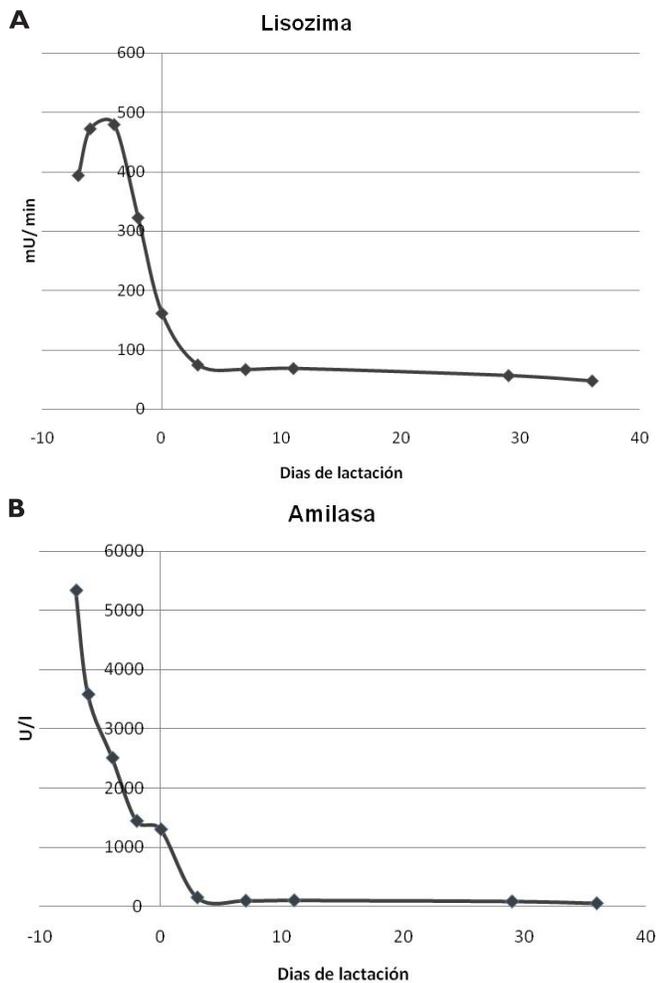


Figura 3: Actividades de lisozima (A) y amilasa (B) en la secreción láctea de *Tapirus terrestris* durante los periodos preparto y posparto. Muestras desde el día siete preparto hasta el día 36 posparto. En (A) el coeficiente de variación fue menor a 20.79 % para todos los casos graficados. En (B), el coeficiente de variación fue menor a 7.43 % para todos los casos graficados.

Discusión

El periodo inmediatamente anterior y posterior al parto es un momento de cambios rápidos y complejos en la glándula mamaria. El proceso involucrado en la lactogénesis incluye diferenciación funcional de las células mamarias hacia la síntesis de componentes lácteos y a su vez estos cambios funcionales resultan en cambios en la composición de la secreción. Los primeros estadios de lactogénesis ocurren coincidentemente con la formación de calostro, especialmente la acumulación de inmunoglobulinas. El transporte de inmunoglobulinas a través de la barrera epitelial mamaria ocurre por un mecanismo mediado por receptores como parte del proceso de formación del calostro (Larson, 1992), en preparación para la transferencia de inmunidad pasiva a la cría recién

nacida. Los cambios en el contenido de proteínas totales reflejan la acumulación de inmunoglobulinas y otras proteínas lácteas durante el periodo preparto.

Inversamente, la disminución en el contenido de proteínas inmediatamente después del nacimiento de la cría fue consistente con el descenso en la concentración de IgG, combinado con el efecto de dilución debido a un mayor volumen de secreción.

La composición de la secreción mamaria cambió drásticamente en el periodo perinatal. El incremento en la concentración de glúcidos a partir del nacimiento ocurre coincidentemente con el rápido aumento en la secreción láctea que acompaña a la lactogénesis. Una vez que comienza la síntesis plena de lactosa, el agua es osmóticamente vertida en los alvéolos mamarios resultando en la dilución de los componentes secretorios (Zou *et al.* 1998).

La lisozima presenta su mayor actividad en el precalostro de tapir. Según lo observado en este estudio, la síntesis de la enzima supera el efecto dilutorio en la glándula mamaria, por ello es evidente el aumento que se produce en su actividad. Luego, se produce un descenso en la actividad, incluso antes del nacimiento de la cría, que bien podría deberse al efecto de dilución antes mencionado asociado a una síntesis disminuida de la misma. Posteriormente, se produce un equilibrio entre la síntesis y el consumo de Lz cuando la cría se alimenta en forma regular de la leche de su madre. La Lz de la leche es generalmente resistente a enzimas digestivas y actúa sinérgicamente con otros agentes microbianos, especialmente IgA y lactoferrina, sin disparar una respuesta inflamatoria. La leche de yegua, la de burra y la leche humana tienen las mayores actividades de Lz encontradas en esta secreción. De manera similar, la leche de tapir presenta actividades que si bien no son tan elevadas como las antes mencionadas, son mayores que las descritas para otros mamíferos como pecarí (*Tayassu sp.*), antilope sable (*Hippotragus niger*) y elefante marino (*Mirounga leonina*), entre otros (Castro *et al.* 2009). En el muestreo seriado que se realizó, la enzima amilasa presentó su mayor actividad, siete días antes del parto, para luego disminuir sostenidamente hasta el momento en que la secreción deja de ser calostro. A partir de allí, se mantiene constante, durante el primer mes al menos. En el caso de la amilasa, el descenso desde su valor más alto comienza unos días antes de que se produzca el descenso en la actividad de lisozima, a pesar de que el efecto de la dilución en la glándula mamaria es similar.

Conclusiones

Durante el periodo perinatal, la concentración de los componentes de la secreción láctea experimenta cambio permanente, y ello está directamente relacionado con la función que cumplen en estas secreciones. De allí que la expresión de las proteínas

en el calostro y los primeros días de lactación sean importantes para comprender la biología de esta especie sobre la cual no existen investigaciones acerca de las proteínas propuestas. Las proteínas totales disminuyen su concentración a medida que avanza la lactación, y gran parte de este cambio es atribuible a las inmunoglobulinas que en un comienzo se encuentran acumuladas en la glándula mamaria durante el parto, en preparación para la transferencia de inmunidad pasiva a la cría de tapir recién nacida.

Los otros factores protectores, lisozima y amilasa, tienen una actividad mayor antes del parto y durante los primeros días, aunque con diferencia en el momento en que se produce este aumento de actividad. Esto evidencia una asincronía en la expresión de estas dos proteínas durante la transición desde la acumulación de calostro en el parto a la producción de leche posparto.

A pesar de que nuestros resultados contribuyen al conocimiento de la fisiología de este mamífero, el presente trabajo representa un estudio preliminar acerca de este tema, de manera que restan aún muchos estudios por ser desarrollados, sobre todo incluyendo a otras hembras de la misma especie, con la finalidad de obtener una completa interpretación sobre la biología de la misma.

Agradecimientos

A la Fundación Miguel Lillo y al Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (Proyecto 26G-415) por el financiamiento de este trabajo. Al Tec. Raúl Zalazar y demás personal de Fundación Temaikén por su invaluable colaboración en la cuidadosa obtención de las muestras empleadas en este estudio.

Literatura citada

- Castro, F., Rodríguez, A., Juárez, G. & Fernández, F. (2009). Aspectos comparativos de la determinación de la actividad lítica de la lisozima. *Acta Zoológica Lilloana* 53(1-2):49-56.
- Chalukian S., Bustos S., Lizárraga L., Varela D., Paviolo A., Quse V. (2009). Plan de Acción para la conservación del tapir (*Tapirus terrestris*) en Argentina. En: www.tapirs.org.
- Duhaiman, A. S. 1988. Purification of camel's milk lysozyme and its lytic effect on *E. coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. *Comparative and Biochemical Physiology* 91b:793-796.
- Fernández, F.M. & Hernández de Sánchez, M. (2006). Proteínas asociadas a las micelas de caseína en leche de mamíferos silvestres. *Acta Zoológica Lilloana* 50(1-2):109-113.
- Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. & Rudloff, S. (2002). Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *Journal of Nutrition* 130:3014-3020.
- Goldman, A. S. (1993). The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating properties. *Pediatric Infectious Disease Journal* 12:664-671.
- Harris, E.L.V & Angal, S. (1989). Protein purification methods: A practical approach. IRL Press, Oxford University Press, England, 327 pp.
- Herrouin, M., Molle, D., Fauquan, J., Ballestra, F., Maubois, J.L. & Leonil, J. (2000). New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. *Journal of Protein Chemistry* 19(2):105-115.
- Jensen, R., Oftedal, O. & Iverson, S. (1995). Comparative analysis of nonhuman milks. In: R. G. Jensen (ed.), *Handbook of Milk Compositions*. Academic Press, San Diego, New York, 991 pp.
- LaBlanc, M. M., Tran, T., Baldwin, J.L. & Pritchard, E. L. (1992). Factors that influence passive transfer of immunoglobulins in foals. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 200:179-183.
- Langer, P. (2009). Differences in the composition of colostrums and milk of eutherians reflect differences in immunoglobulin transfer. *Journal of Mammalogy* 90(2):332-339.
- Larson, B. L. (1992). Immunoglobulins of the mammary secretion. In: Fox P.F. (ed.), *Advanced Dairy Chemistry. Vol 1. Proteins*. New York: Elsevier Applied Science, pp 231-254.
- Linberg, T. & Skude, G. (1982). Amylase in human milk. *Pediatrics* 70:235-238.
- Lowry, O. N., Rosenbrough, J., Farr, A. L. & Randal, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Miranda, G., Mahé, M. F., Leroux, C. & Martin, P. (2004). Proteomic tools to characterize the protein fractions of Equidae milk. *Proteomics* 4:2496-2509.
- Ojeda, R. A., Chillo, V. & Díaz Isenrath, G. B. (2012). Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. SAREM (Sociedad Argentina de Mastozoología), Argentina.
- Pérez, M. E., González Ciccía, P., Zalazar, R., Rodríguez, G. & Fernández, F. (2010). Proteínas del lactosuero en el periodo perinatal y leche madura de tapir (*Tapirus terrestris*). *Acta Zoológica Lilloana* 54(1-2):102-108.
- Pukazhenthí, B.; Quse, V.; Hoyer, M.; van Engeldorp Gastelaars, H.; Sanjur, O.; Brown, J. (2013). A review of the reproductive biology and breeding management of tapirs. *Integrative Zoology* 8(1):18-34.
- Quse, V. & González Ciccía, P. (2008). El Tapir, *Tapirus terrestris*, Aspectos Biológicos y Ecológicos: Manual y Atlas. Fundación Temaikén, Buenos Aires, Argentina, 128 pp.
- Stelwagen, K. (2003). Milk Protein. In: H. Roginski, J.W. Fuquay y P. F. Fox (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Science*. Vol. 3, pp 1835-1842. London: Academic Press.
- Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F. & Vita, A. (2008). Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chemistry* 106:640-649.
- Winzler, R. J. (1955). Determination of serum glycoproteins. *Methods of Biochemistry* 2:279-311.
- Zou, S., Brady, H. A. & Hurley, W. L. (1998). Protective factor in mammary gland secretions during the periparturient period in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science* 18(3):184-188.