



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE ÁCIDOS
BILIARES EN HECES DE DISTINTAS ESPECIES DEL
SUPERORDEN XENARTHRA (MAMMALIA)**

María Soledad Araujo

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2015

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia e Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR, CONICET-UNS) durante el período comprendido entre el 26 de septiembre de 2006 y el 10 de diciembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. Emma B. Casanave, Profesora Asociada de Fisiología Animal de la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas, UNS e Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo la calificación de(.....)



DETERMINACIÓN DE LOS
PATRONES DE ÁCIDOS BILIARES
EN HECES DE DISTINTAS ESPECIES
DEL SUPERORDEN XENARTHRA
(MAMMALIA)

Lic. María Soledad Araujo

Director: Dra. Emma B. Casanave

Tesis para optar al grado de Doctora en Biología
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia
UNS

Bahía Blanca

2015

What other person, whether he be a theologian, a jurist, a doctor of medicine, a physicist, or whatever, knows more than you, a physiologist, about life? For physiology is indeed an explanation of life. What other subject matter is more fascinating, more exciting, more beautiful than the subject of life?

Arthur C. Guyton

A mis abuelos Novelia y Arturo...

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Emma, por su apoyo incondicional para realizar esta tesis y las horas dedicadas a la corrección y finalización de la misma. Gracias por su confianza y apoyo, aún en momentos difíciles de mi carrera.

A Ada, por su dedicación a la hora de enseñarme TLC, por las largas horas de mates y lecturas y por su apoyo desinteresado, siempre y en todo momento.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme apoyado económicamente a través de sus programas de becas.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, especialmente a la Cátedra de Fisiología Animal, por haberme brindado las instalaciones para la realización del trabajo de laboratorio.

A SGCyT-UNS y ANPCyT BID 1728/OC-AR-PICTR 074/03 por el apoyo económico al proyecto general en el cual se enmarca esta tesis.

A todos los miembros del GECEM, los actuales y los que ya no están, por brindarme su apoyo no solo en este trabajo, sino a lo largo de todos los años que hemos compartido juntos. De ellos aprendí el valor de la vida, la forma disciplinada de trabajo, el compartir y colaborar con el otro.

A Estela, porque sin ella nada de esto hubiera sido posible. De su mano comencé el camino de la investigación y me enseñó los primeros pasos como bióloga de campo.

A Víctor y todo el personal de la Cátedra de Química Orgánica de la Universidad Nacional de Salta, por el apoyo incondicional y la ayuda para la realización de parte de este trabajo. A ellos les debo el valor de unos buenos mates y compañía, cuando uno está lejos de casa.

A Sole Vázquez y Sole Fernández, por formar parte de este equipo en el que juntas fuimos aprendiendo, poco a poco, a investigar.

A mis amigos, por estar siempre a mi lado. A los “nuevos” y a los “viejos”, cada uno aportó, de una u otra manera, a mi formación personal.

A Gustavo, por su dedicación permanente y desinteresada, por su amor siempre dispuesto y su infinita paciencia a la hora de enseñarme.

A mis padres, porque sin ellos no hubiera sido posible este largo, pero fructífero camino.

A mis hermanos, siempre acompañándome.

RESUMEN

El análisis de las heces es una herramienta fundamental para el trabajo de campo, especialmente para identificar la presencia de una determinada especie en un área. Los ácidos biliares fecales y su concentración relativa siguen patrones que son especie-específicos, y pueden ser caracterizados por Cromatografía en Capa Fina (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). Estas técnicas han sido utilizadas para diferenciar heces de varias especies de mamíferos, pero nunca en Xenarthra.

En esta tesis se identificaron, mediante dichas técnicas, los perfiles de ácidos biliares fecales de 11 especies de Xenarthra, a partir del análisis de 107 heces de diferentes individuos: *Zaedyus pichiy* (n=10), *ChaetophRACTUS vellerosus* (n=5), *ChaetophRACTUS villosus* (n=57), *DasyPUS hybridus* (n=4), *Priodontes maximus* (n=2), *Tamandua tetradactyla* (n=14), *Myrmecophaga tridactyla* (n=4), *Tolypeutes matacus* (n=8), *Euphractus sexcinctus* (n=1), *Choloepus didactylus* (n=1) y *C. hoffmanni* (n=1). Se encontraron diferencias entre los patrones de ácidos biliares para todas las especies, pero no entre machos y hembras, ni entre animales de cautiverio y silvestres de la misma especie.

La TLC resultó ser una técnica útil, de costo relativamente bajo y rápida para el análisis de los perfiles de ácidos biliares fecales. Sin embargo, presentó ciertas limitaciones en la resolución de los ácidos biliares tauroconjugados.

La HPLC demostró ser una técnica más resolutive y sensible que la TLC, permitiendo la separación e identificación de los ácidos biliares tauroconjugados, y de otros compuestos no visualizados por TLC. El 90% o más de los ácidos biliares fueron del tipo VI, con estructura C24. Todas las especies presentaron DHCA, UDCA, CA, GCA, TCA, TDCA y LCA. Los valores de similitud entre los patrones de ácidos

biliares fecales reflejaron, en su mayoría, las relaciones filogenéticas establecidas para el Superorden Xenarthra.

Se demostró para Xenarthra que la determinación cromatográfica de los ácidos biliares fecales es un método preciso para la identificación específica de heces, por lo que resultaría una valiosa herramienta ecológica.

Estos resultados son los primeros para Xenarthra y podrían ser importantes para futuros estudios acerca de la fisiología, ecología y conservación del grupo.

ABSTRACT

The analysis of feces is a fundamental tool for field work, especially to identify the presence of certain species in an area. Fecal bile acids and their relative concentration follow patterns that are species-specific, and can be characterized by Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). These techniques have been used for differentiating feces of several mammal species; however, it has never been used for Xenarthra species.

In this thesis we identified, by those techniques, the fecal bile acid profile of 11 Xenarthra species, by the analysis of 107 feces from different individuals: *Zaedyus pichiy* (n=10), *Chaetophractus vellerosus* (n=5), *Chaetophractus villosus* (n=57), *Dasypus hybridus* (n=4), *Priodontes maximus* (n=2), *Tamandua tetradactyla* (n=14), *Myrmecophaga tridactyla* (n=4), *Tolypeutes matacus* (n=8), *Euphractus sexcinctus* (n=1), *Choloepus didactylus* (n=1) and *C. hoffmanni* (n=1).

There were differences between the bile acid patterns of all the species, but not between males and females, nor between wild and captive animals of the same species.

TLC was a useful, low cost and rapid technique to analyze fecal bile acid profiles. However, it showed some limitations in the resolution of tauroconjugated bile acids.

HPLC was more resolute and sensitive than TLC, allowing separation and identification of tauroconjugated bile acids and of other compounds which were not visualized by TLC. 90% or more of the bile acids were of the type VI, with a structure C24. All species presented DHCA, UDCA, CA, GCA, TCA, TDCA and LCA. Similitude values among fecal bile acid profiles of all species reflected, in a great majority, phylogenetic relationships established for the Superorden Xenarthra.

We established, for *Xenarthra*, that chromatographic determination of fecal bile acids is a precise method for specific identification of feces, being a useful ecological tool.

These results are the first for *Xenarthra* and would be important for future studies about the physiology, ecology and conservation of the group.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO I	16
Superorden Xenarthra	17
Ubicación sistemática de los Xenarthra	18
Ácidos biliares: Características generales	24
Formación de los ácidos biliares y circulación enterohepática	27
Funciones e importancia de los ácidos biliares	30
Utilidad filogenética de los ácidos biliares	31
Análisis de ácidos biliares en heces	33
Métodos de análisis de los ácidos biliares	34
BIBLIOGRAFÍA	37
CAPÍTULO II	51
HIPÓTESIS DE TRABAJO	52
OBJETIVO GENERAL	52
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
ESPECIES ESTUDIADAS	54
ORIGEN DE LAS MUESTRAS	55
CAPÍTULO III	57
INTRODUCCIÓN	58
Cromatografía: generalidades	58
Cromatografía en Capa Fina (CCF) o Thin-Layer Chromatography (TLC)	59
Ácidos biliares fecales	62
OBJETIVOS	64
MATERIALES Y MÉTODOS	65
Colecta de las muestras	65
Pre-tratamiento de las muestras	66
Análisis por TLC	66
Extracción	66
Extracción de pigmentos vegetales	67
Siembra	68
Desarrollo	69
Comparación de eluyentes	69
Revelado	70
TLC preparativa: cuantificación	71
Análisis de los datos	71
Factores de separación	71
Patrón de ácidos biliares fecales	73
RESULTADOS	74
Estándares de ácidos biliares	74
Comparación de eluyentes y factores de separación	76
Concentración de las muestras	79
Patrón de ácidos biliares	82
Pigmentos vegetales	85
Identificación de muestras incógnita	87
Cuantificación de los compuestos	88

DISCUSIÓN	89
BIBLIOGRAFÍA	97
CAPÍTULO IV	104
INTRODUCCIÓN	105
Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC): generalidades	105
HPLC de ácidos biliares	107
Detectores	109
HPLC de ácidos biliares fecales	111
OBJETIVOS	113
MATERIALES Y MÉTODOS	114
Preparación y extracción de las muestras	114
Equipo utilizado	116
Condiciones del análisis	117
Análisis de los datos	118
Parámetros de funcionamiento del método	119
Resolución	119
Eficiencia	119
Precisión	121
Rango de linealidad	121
Cuantificación	123
RESULTADOS	124
Resolución y determinación de los Tr de los estándares de ácidos biliares	124
Efecto de los grupos conjugados y del patrón de hidroxilación sobre el orden de elución de los estándares	126
Análisis de los cromatogramas de los solventes usados como blancos	128
Performance del método cromatográfico	130
Resolución	130
Eficiencia	130
Precisión	131
Linealidad, curvas de calibrado	132
Patrón de ácidos biliares fecales	140
Cuantificación de los ácidos biliares por especie	150
DISCUSIÓN	153
BIBLIOGRAFÍA	156
CAPÍTULO V	163
HIPÓTESIS	170
OBJETIVOS	170
MATERIALES Y MÉTODOS	171
RESULTADOS	172
Índice de Jaccard para las comparaciones por TLC	172
Índice de Jaccard para las comparaciones por HPLC	173
DISCUSIÓN	175
BIBLIOGRAFIA	181
CAPÍTULO VI	190
DISCUSIÓN	191
Consideraciones finales	194
CONCLUSIONES	195

ESTRUCTURA DE LA TESIS

El presente estudio se propone determinar los perfiles de ácidos biliares fecales de distintas especies del Superorden Xenarthra a través de la aplicación de técnicas cromatográficas, TLC y HPLC. Con la caracterización de dichos perfiles se pretende hallar una herramienta ecológica para la identificación de especies a campo. Más aun, este trabajo es una contribución al estudio de la biología general de las especies de Xenarthra.

- **Capítulo I: Introducción general.**

A partir de una revisión bibliográfica general, se describen las características biológicas y ecológicas del grupo bajo estudio y su clasificación taxonómica, destacando la insuficiencia de datos acerca de diversos aspectos de su biología y ecología. Asimismo, se describen las características de los ácidos biliares, se reseñan las técnicas aplicables a su determinación y se remarca la importancia del estudio de ácidos biliares fecales, con énfasis en los aportes que realizaría al conocimiento general de las especies estudiadas.

- **Capítulo II: Hipótesis y objetivos de trabajo.**

Se detalla el objetivo general, los objetivos específicos y las hipótesis de trabajo de la presente investigación. Se describe la procedencia de las muestras de las once especies de Xenarthra estudiadas.

- **Capítulo III: Análisis de los patrones de ácidos biliares fecales por TLC.**

Se describe la metodología de TLC utilizada para la determinación de los ácidos biliares fecales de las especies estudiadas. Se presentan los resultados comparativos por especie y se analizan los factores que determinan la eficiencia del

método cromatográfico. Por último, se discuten los posibles factores que influyen en la determinación cromatográfica de los ácidos biliares fecales.

- **Capítulo IV: Análisis de los patrones de ácidos biliares fecales por HPLC**

A partir del análisis de las heces por HPLC, se determinan los perfiles de ácidos biliares de cada una de las especies estudiadas y se comparan los mismos, identificando similitudes y diferencias. Asimismo, se precisan/estipulan los parámetros de funcionamiento del método de HPLC y se especifican los parámetros de eficiencia. Se establecen los patrones de ácidos biliares como especie-específicos.

- **Capítulo V: Los ácidos biliares como marcadores filogenéticos.**

En este capítulo se establecen los grados de similitud en el patrón de ácidos biliares fecales entre las especies estudiadas, por TLC y HPLC, a través de la aplicación del Índice de Jaccard. Asimismo, se analizan dichos valores procurando compararlos con la filogenia establecida para el Superorden Xenarthra.

- **Capítulo VI: Discusión general y conclusiones.**

Se integran y discuten las principales conclusiones obtenidas en cada uno de los capítulos anteriores.

CAPÍTULO I



INTRODUCCIÓN GENERAL

Superorden Xenarthra

Los Xenarthra constituyen uno de los grupos de mamíferos más característicos de Sud América, ancestrales, exclusivamente americanos, distribuidos a lo largo de América Central y del Sur y, por el norte, hasta el centro de Estados Unidos; su rango de distribución abarca hábitats tan diversos como la puna en los Andes, la Patagonia Argentina, la región de Monte y de Espinal, el este de Brasil y la región de monte de la costa norte de Venezuela (Redford y Wetzel, 1985). Prácticamente toda la Argentina está ocupada por xenartros, a pesar de su extensa superficie, el rango latitudinal y altitudinal y la heterogeneidad de sus hábitats (Abba y col., 2012).

Se encuentran entre los grupos de mamíferos morfológicamente más especializados (Möller-Krull y col., 2007), comprendiendo un total de 31 especies vivientes (6 especies de perezosos, 4 de osos hormigueros y 21 de armadillos), hallándose la mayor diversidad en Argentina, con 9 géneros y 13 especies (Gardner, 2005, 2007).

Este Superorden abarca especies carnívoras-omnívoras e insectívoras, altamente especializadas (Redford, 1985), incluyendo en sus dietas invertebrados, pequeños vertebrados, carroña, raíces de plantas, tubérculos y semillas (Casanave y col., 2003; Abba y col., 2011; Sandoval Gómez y col., 2012; Wallace y Painter, 2013).

El impacto humano sobre los ecosistemas se ha incrementado desde el siglo pasado y muchas especies de xenartros han sufrido disminuciones críticas de sus poblaciones naturales (Aguiar y Da Fonseca, 2008). Las principales amenazas son la pérdida de hábitat generada por la actividad agrícola-ganadera y la urbanización, la caza para consumo y control de abundancia, el ataque de perros y el atropellamiento por vehículos (Redford y Eisenberg, 1992; Cuéllar, 2008; Abba y Superina, 2010). La última determinación de su estatus de conservación reveló que más de la mitad de las

especies de armadillos enfrentan, en la actualidad, algún riesgo de extinción (Abba y Superina, 2010; Superina y col., 2014).

No obstante, la información disponible acerca de aspectos básicos sobre su taxonomía, historia de vida y posibles amenazas es insuficiente, existiendo huecos considerables en el conocimiento que poseemos acerca de este grupo, de gran importancia para la comprensión de la historia evolutiva de los mamíferos (Superina y col., 2014; Loughry y Mc Donough, 2013; Loughry y col., 2015).

Ubicación sistemática de los Xenarthra

Para la clasificación sistemática y la distribución de las especies del Superorden Xenarthra se siguió a Gardner (2005, 2007) y Barquez y col. (2006). Para los nombres vulgares, se siguió a Barquez y col. (2006), cuando correspondía a especies presentes en Argentina.

SUPERORDEN XENARTHRA Cope, 1889.

ORDEN CINGULATA Illiger, 1811.

Familia Dasypodidae Gray, 1821.

Subfamilia Dasypodinae Gray, 1821.

Tribu Dasypodini Gray, 1821.

Género *Dasypus* Linnaeus, 1758.

Especies *Dasypus hybridus* (Desmarest, 1804). n.v.

Mulita, mulita orejuda. Se distribuye en Paraguay, sur de Brasil y en Argentina en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Santa Fe y Santiago del Estero.

Dasypus kappleri Krauss, 1862. n.v. Armadillo de Kappler, mulita de Kappler. Distribuido en Colombia (este de los Andes), Venezuela (al

sur del Orinoco), Guyana, Surinam, al sur de la cuenca Amazónica del Brasil, Ecuador, Perú y noreste de Bolivia.

Dasyopus novemcinctus Linnaeus, 1758. n.v. Mulita grande. Se distribuye en el sur de los Estados Unidos, México, América Central y del Sur, Antillas menores (Granada), Trinidad, Tobago y en Argentina en Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe y Santiago del Estero.

Dasyopus pilosus (Fitzinger, 1856). n.v. Armadillo de nariz larga peluda. Se lo encuentra en los Andes del Perú en los departamentos de San Martín, La Libertad, Huánuco y Junín.

Dasyopus sabanicola Mondolfi, 1968. n.v. Armadillo sabanero. Se distribuye en los llanos de Venezuela y Colombia.

Dasyopus septemcinctus Linnaeus, 1758. n.v. Mulita chica, mulita común. Distribuida en la cuenca del Amazona, Brasil, en el Gran Chaco de Bolivia, Paraguay y en Argentina en Corrientes, Chaco, Formosa, Jujuy, Misiones y Salta.

Dasyopus yepesi Vizcaíno, 1995. n.v. Mulita de Yepes, Mulita de Mazza. Se la encuentra en el Gran Chaco en Paraguay y en Argentina en las provincias de Jujuy y Salta.

Subfamilia Euphractinae Winge, 1923.

Tribu Euphractini Winge, 1923.

Género *Chaetophractus* Fitzinger, 1871.

Especies *Chaetophractus nationi* (O. Thomas, 1894). n.v. Quirquincho, quirquincho andino. Investigaciones recientes (Abba y col., 2015) proponen que sería sinónimo de *C. vellerosus*.

Chaetophractus vellerosus (Gray, 1865). n.v. Piche llorón. En el Chaco Boreal de Bolivia, sur del Paraguay, oeste de La Puna de Tarapacá de Chile y en Argentina en Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Chaco, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan, San Luis, Santiago del Estero y Tucumán.

Chaetophractus villosus (Desmarest, 1804). n.v. Peludo o quirquincho grande. Se distribuye en el Gran Chaco de Bolivia, Paraguay, Chile y en Argentina en Buenos Aires, Córdoba, Chaco, Chubut, Formosa, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro, San Luis, Santa Cruz, Santa Fe, Santiago del Estero y Tierra del Fuego.

Género *Euphractus* Wagler, 1830.

Especie *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758). n.v. Gualacate, gualincho. Se lo encuentra en el sur de Surinam y adyacencia de Brasil, este de Brasil hasta Bolivia, Paraguay, Uruguay y en Argentina en Catamarca, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Tucumán,

Género *Zaedyus* Ameghino, 1889.

Especie *Zaedyus pichiy* (Desmarest, 1804). n.v. Piche de oreja corta, piche patagónico, piche. Se lo encuentra en el este de Chile hasta el Estrecho de Magallanes y en Argentina en Buenos Aires, Chubut, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro, San Luis y Santa Cruz.

Tribu Chlamyphorini Bonaparte, 1850.

Género *Calyptophractus* Fitzinger, 1871.

Especie *Calyptophractus retusus* (Burmeister, 1863). n.v. Armadillo de Burmeister, pichiciego mayor, pichiciego chaqueño. Oeste de Paraguay, sureste de Bolivia y en Argentina en Chaco, Formosa y Salta.

Género *Chlamyphorus* Harlan, 1825.

Especie *Chlamyphorus truncatus* Harlan, 1825. n.v. Pichiciego menor, pichiciego pampeano. Esta especie es endémica de Argentina, se distribuye en Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, La Pampa, La Rioja, Mendoza, San Juan y San Luís.

Subfamilia Tolypeutinae Gray, 1865.

Tribu Tolypeutini Gray, 1865.

Género *Tolypeutes* Illiger, 1811.

Especies *Tolypeutes matacus* (Desmarest, 1804). n.v. Mataco, quirquincho bola. Se distribuye en el este de Bolivia, suroeste de Brasil hasta el Gran Chaco paraguayo y en Argentina en Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Chaco, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán.

Tolypeutes tricinctus (Linnaeus, 1758). n. v. Tatú bola. Se lo encuentra en los estados brasileiros de Bahía, Ceará, Maranhão, Piauí y Pernambuco.

Tribu Priodontini Gray, 1873.

Género *Cabassous* McMurtrie, 1831.

Especies *Cabassous centralis* (Miller, 1899). n.v. Cabasú, tatú de rabo molle. Se lo encuentra en Honduras, México (Chiapas) hasta el norte de Colombia y noroeste de Venezuela.

Cabassous chacoensis Wetzel, 1980. n.v. Cabasú chaqueño, cabasú chico, tatú de rabo molle. Se distribuye en el Gran Chaco en el oeste de Paraguay, en el Mato Grosso de Brasil y en Argentina en Chaco, Formosa, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán.

Cabassous tatouay (Desmarest, 1804). n.v.

Cabasú grande, tatú de rabo molle, tatú-aí, tatú-aímayor, tatuay. Se lo encuentra en el Uruguay, sur de Brasil, sureste de Paraguay y en Argentina en Corrientes y Misiones.

Cabassous unicinctus (Linnaeus, 1758). n.v.

Armadillo de orejas largas o armadillo sudamericano de cola desnuda. Se distribuye en el este de Sudamérica en los Andes de Colombia hasta Bolivia y en el Mato Grosso do Sul, Brasil.

Género *Priodontes* F. Cuvier, 1825.

Especie *Priodontes maximus* (Kerr, 1792). n. v. Tatú

carreta, tatú gigante, tatú-guazú. Se lo encuentra en Sudamérica al este de los Andes, Norte de Venezuela y el sur de las Guayanas hasta Bolivia, Paraguay y en Argentina en Chaco, Formosa, Salta y Santiago del Estero.

ORDEN PILOSA Flower, 1883.

Suborden Folivora Delsuc, Catzeflis, Stanhope y Douzery, 2001.

Familia Bradypodidae Gray, 1821.

Género *Bradypus* Linnaeus, 1758.

Especies *Bradypus pygmaeus* Anderson y Handley, 2001.

n.v. Perezoso pigmeo. Se lo conoce sólo para la Isla Escudo de Veraguas en Panamá.

Bradypus torquatus Illiger, 1811. n.v. Perezoso

de collar. Se lo encuentra en la costa forestal al sureste de Brasil.

Bradypus tridactylus Linnaeus, 1758. n.v.

Perezoso de tres dedos. Se distribuye en Guayana, Surinam, Guyana Francesa, sur de Venezuela hasta el Orinoco y norte de Brasil.

Bradypus variegatus Schinz, 1825. n.v. Aí-aí, perezoso bayo, perezoso de tres dedos. Se lo encuentra desde Honduras a Colombia, Ecuador, Brasil, oeste de Venezuela, este de Perú y Bolivia, Paraguay y es probable en el norte de Argentina en las provincias de Jujuy y Misiones.

Familia Megalonychidae P. Gervais, 1855

Género *Choloepus* Illiger, 1811.

Especies *Choloepus didactylus* (Linnaeus, 1758). n.v.

Perezoso de dos dedos o perezoso de Lineo. Se distribuye en Guayanas, Venezuela (sur y delta del río Orinoco), centro sur de Brasil (oeste de Maranhão lo largo del río Amazonas/Solimões), oeste de la cuenca superior del Amazonas de Ecuador y Perú.

Choloepus hoffmanni W. Peters, 1858. n.v.

Perezoso de dos dedos o perezoso de Hoffmann. Se lo encuentra en América Central (Nicaragua), este de América del Sur al oeste de Venezuela y sur de Brasil (Mato Grosso) y este de Bolivia.

Suborden Vermilingua Illiger, 1811.

Familia Cyclopedidae Pocock, 1924.

Género *Cyclopes* Gray, 1821.

Especie *Cyclopes didactylus* (Linnaeus, 1758).n. v.

Cíclope. Se lo encuentra desde México (Veracruz y Oaxaca) hasta Colombia y en el oeste de Los Andes hasta el sur de Ecuador, este de Los Andes de Venezuela, Trinidad, Guyana, Surinam, Guyana Francesa y sur de Colombia y Venezuela, sur de Bolivia (La Paz y Santa Cruz) y Brasil (este de Acre hasta Alagoas).

Familia Myrmecophagidae Gray, 1825.

Género *Myrmecophaga* Linnaeus, 1758.

Especie *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758. n.v.

Oso hormiguero, yurumí. Se distribuye en Belice, Guatemala, por América del Sur hasta Uruguay y en el Gran Chaco de Bolivia, Paraguay y en Argentina en Chaco, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Tucumán.

Género *Tamandua* Gray, 1825.

Especies *Tamandua mexicana* (Saussure, 1860). n.v.

Tamandúa. Se lo encuentra en el este de México (Tamaulipas), América Central y en América del Sur al noroeste de Perú y noroeste de Venezuela.

Tamandua tetradactyla (Linnaeus, 1758). n.v.

Tamandúa. Se distribuye en el este de América del Sur, de Los Andes de Colombia, Venezuela, Trinidad y las Guayanas, sur de Uruguay y norte de Argentina en las provincias de Corrientes, Chaco, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe y Tucumán.

Ácidos biliares: Características generales

Los ácidos biliares se agrupan junto a los alcoholes biliares bajo el término colectivo de “*sales biliares*”.

El largo de la cadena lateral y el estado de oxidación en el C27 se utiliza para dividir a las sales biliares en tres grandes grupos: alcoholes biliares C27, ácidos biliares C27 y ácidos biliares C24 (Hagey y col., 2010a). La estructura de la cadena lateral determina la clase de compuesto, ácidos biliares (cadena lateral con un grupo carboxilo) o alcoholes biliares (cadena lateral con un grupo alcohol primario) (Hofmann y Hagey, 2008, 2014).

Los ácidos biliares son los principales componentes de la bilis y se encuentran entre los primeros productos naturales aislados de forma pura, generalmente de la vesícula biliar (Hofmann, 1999). Son ácidos esteroides producidos durante el

metabolismo del colesterol en el hígado y secretados en la vesícula biliar o en el intestino (Hofmann, 2009).

Estos compuestos son producidos por todos los vertebrados y muestran una gran diversidad estructural entre las diferentes especies (Haslewood, 1967; Une y Hoshita, 1994; Hofmann y col., 1995; Hofmann y col., 2010; Hagey y col., 2010a), debido a la evolución de múltiples caminos bioquímicos para convertir el colesterol en ácidos o alcoholes biliares conjugados (Hofmann y Hagey, 2008, 2014).

Consisten en dos unidades conectadas: un núcleo esteroide rígido de 19 carbonos (C19) y una cadena lateral alifática corta. El núcleo esteroide posee un ciclo pentanoperhidrofenantreno hidrocarbonado tetracíclico saturado, compuesto por tres anillos de seis lados A, B y C, y uno de 5 lados, D (Russell, 2003; Mukhopadhyay y Maitra, 2004; Hofmann y Hagey, 2008; Monte y col., 2009). Tanto el núcleo esteroide como la cadena lateral, pueden sufrir variaciones de distinto tipo. La variación estructural que ocurre en el C19 del núcleo esteroide puede ser la estereoquímica de la unión A/B, los sitios donde se ubican los grupos oxo o hidroxilo y la orientación de los grupos hidroxilo (α o β). La variación estructural de la cadena lateral incluye el largo de la misma, la presencia y orientación de los grupos OH, la presencia de insaturación, la estereoquímica del C25 y la ubicación del grupo carboxilo en los ácidos biliares, y del grupo OH en los alcoholes biliares (Hofmann, 1999; Hagey y col., 2010a; Hofmann y col., 2010).

Dentro de los ácidos biliares hay dos tipos principales, dependiendo del largo de la cadena lateral, los C24 (cadena lateral C5) y los C27 (cadena lateral C8) (Mukhopadhyay y Maitra, 2004; Hofmann y Hagey, 2008), siendo los C24 los más comunes en los vertebrados superiores (Mukhopadhyay y Maitra, 2004; Hofmann y Hagey, 2008; Monte y col., 2009).

Los ácidos biliares con un número total de átomos de C distinto de 24 ó 27 son poco comunes, pero pueden estar presentes en algunas especies, usualmente como componentes menores de la bilis (Une y Hoshita, 1994; Hofmann col., 2010). Hay algunas especies de ranas, por ejemplo, cuyos ácidos biliares poseen cadenas laterales de C7 o C9, y peces con cadenas laterales C4; sin embargo, estos ejemplos son extremadamente raros y constituyen excepciones a la regla general de que los ácidos biliares C24 y C27 son los productos finales del colesterol en los vertebrados (Hofmann y Hagey, 2008; Hagey y col., 2010c).

La cadena lateral también puede sufrir variaciones estructurales que incluyen la presencia y orientación de los grupos OH, la presencia de insaturación y, sobre todo, la sustitución en el átomo de C terminal. La unión de los anillos A/B es variable, siendo *cis* en la mayoría de las sales biliares, pero *trans* en ciertas especies de peces y lagartijas (Hagey y col., 2010a; Hofmann y Hagey, 2014). Las sales biliares con unión A/B *trans* (5 α) tienen una orientación extendida y plana de los anillos esteroides, mientras que las sales biliares A/B *cis* (5 β) tienen una orientación curvada del anillo A respecto a los otros tres anillos. Virtualmente, todas las sales biliares tienen un grupo OH en el C3 (como el colesterol) y en el C7 debido a que la enzima 7-colesterol hidroxilasa es la limitante en la biosíntesis de los ácidos biliares (Russell, 2003; Norlin y Wikvall, 2007; Hagey y col., 2010a). Otros sitios comunes para la hidroxilación son el C12 y el C16, pero también se han encontrado otros sitios menos comunes (Hagey y col., 2010a).

Los grupos OH también pueden variar respecto a su proyección hacia abajo (configuración α) o hacia arriba (β) respecto al plano del núcleo esteroide (Hofmann y Hagey, 2008; Hagey y col., 2010a) (Fig. 1).

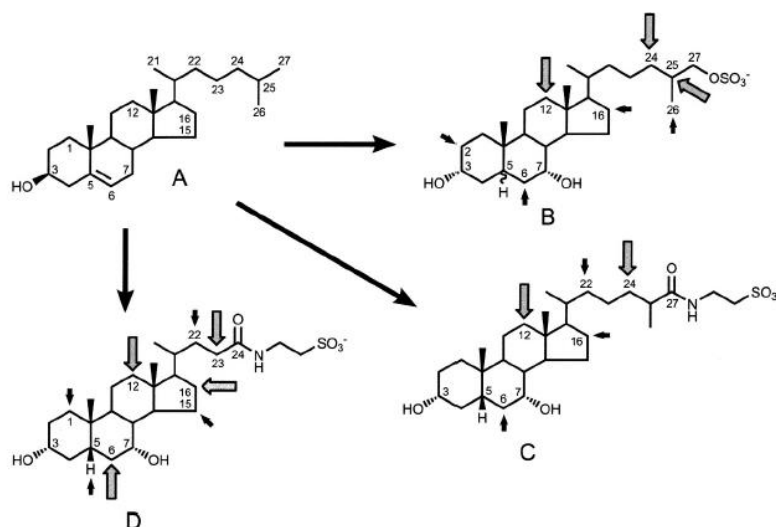


Figura 1: Sitios de hidroxilación (flechas grises) de las tres clases principales de sales biliares. Las flechas negras indican la conversión del colesterol en los compuestos B, C y D. A: colesterol; B: alcoholes biliares C₂₇ (sulfatos); C: ácidos biliares C₂₇ (como sus tauroamidados) y D: ácidos biliares C₂₄ (también como tauroamidados) (tomado de Hofmann y Hagey, 2008).

Formación de los ácidos biliares y circulación enterohepática

Los ácidos biliares primarios naturales son moléculas planas, anfipáticas, que poseen una cara hidrofóbica (cara β) sin ningún sustituyente, y una cara hidrofílica (cara α) que contiene los grupos hidroxilos (Fig. 2) (Mukhopadhyay y Maitra, 2004; Hofmann y Hagey, 2008). Los ácidos biliares primarios se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, en un proceso en el que intervienen más de 17 enzimas diferentes. Durante este proceso, una molécula de colesterol se convierte en una molécula de ácido biliar que, cuando se ioniza, es soluble en agua. Los ácidos biliares se encuentran típicamente N- acilamidados (“conjugados”) con los aminoácidos taurina o glicina. Se ha observado que la conjugación con taurina es más frecuente que con glicina, para varias especies de vertebrados (Haslewood, 1967; Hofmann, 1999; Moschetta y col., 2005). Los detalles de las vías biosintéticas de los ácidos biliares se conocen sólo en humanos y en animales de laboratorio como ratas y ratones; y no han sido estudiadas en ninguna especie silvestre (Hagey y col., 2010a).

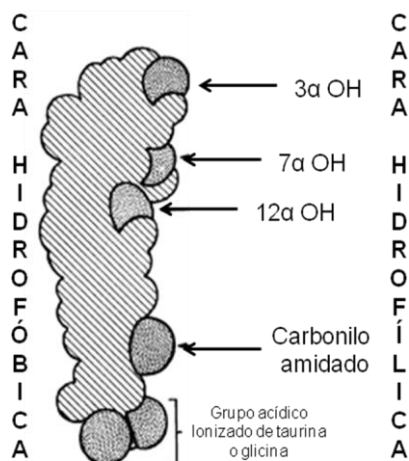


Figura 2: Esquema que muestra un ejemplo del ácido biliar cólico, conjugado con taurina, donde se ve la estructura plana anfipática de la molécula, con una cara hidrofílica y la otra hidrofóbica.

Los ácidos biliares primarios más comunes en humanos son los ácidos cólico y quenodeoxicólico; este último es el “ladrillo” a partir del cual se forman los restantes ácidos biliares (Hofmann y Hagey, 2008, 2014, Fig. 3).

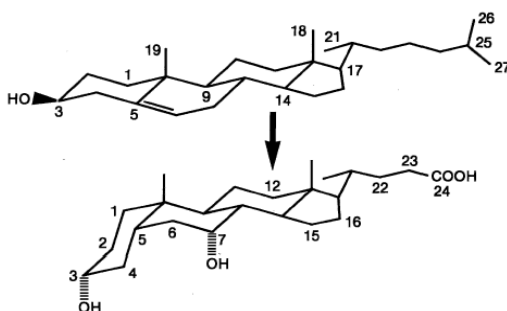


Figura 3: Conversión del colesterol en ácido quenodeoxicólico, el ácido biliar “raíz”. Los principales cambios incluyen: hidroxilación en el C-7, β -oxidación de la cadena lateral que resulta en el acortamiento de la cadena C₈ a C₅, epimerización del grupo OH del C-3 y reducción del doble enlace (tomado de Hofmann y Hagey, 2008).

En los roedores, el ácido muricólico es un ácido biliar primario, mientras que el ácido ursodeoxicólico es en los úrsidos (Russell, 2003; Alnouti y col., 2008). Los ácidos biliares primarios son deconjugados y dehidroxilados por las bacterias presentes en el colon y el intestino delgado distal, para formar ácidos biliares secundarios, como

el deoxicólico a partir del cólico, y el litocólico a partir del quenodeoxicólico (Fig. 4) (Hofmann, 2004, 2009; Alnouti y col., 2008; Hofmann y Hagey, 2014).

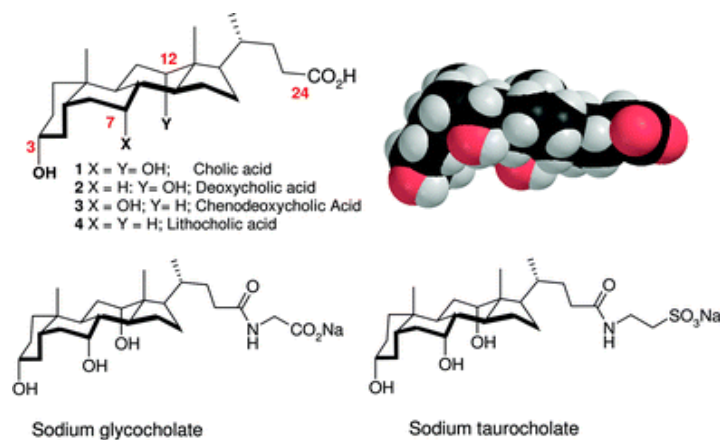


Figura 4: Estructura de los ácidos biliares primarios y secundarios principales de los mamíferos (tomado de Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

Las sales biliares sufren un mecanismo único de absorción desde el intestino, retorno al hígado vía sistema porta y resecretión nuevamente en la bilis, llamado *circulación enterohepática*. La reabsorción ocurre principalmente en el *ileum* por transporte activo, siendo muy eficiente y recuperando del 95 al 98% de los ácidos biliares circulantes al día; excretándose sólo una pequeña cantidad en las heces (Hofmann y Hagey, 2008). El hígado sintetiza nuevos ácidos biliares para compensar la pérdida fecal y mantener constante el tamaño del pool (Dowling, 1973; Hofmann y Hagey, 2008).

Durante la circulación enterohepática, la estructura de los ácidos biliares se ve alterada por las enzimas bacterianas del intestino, que realizan el proceso contrario a las enzimas hepáticas, a nivel de la cadena lateral y el núcleo de la molécula. En la cadena lateral, los ácidos biliares sufren deconjugación para dar, como productos, ácidos biliares deconjugados y glicina o taurina; algunos de estos ácidos deconjugados son absorbidos, retornados al hígado y reconjuguados durante el tránsito a través de los hepatocitos (Russell, 2003; Hofmann y Hagey, 2014).

Funciones e importancia de los ácidos biliares

La cualidad más remarcable de estos compuestos es su habilidad para solubilizar bicapas y vesículas lipídicas, para formar micelas mixtas (Hofmann, 2009, Fig. 5).

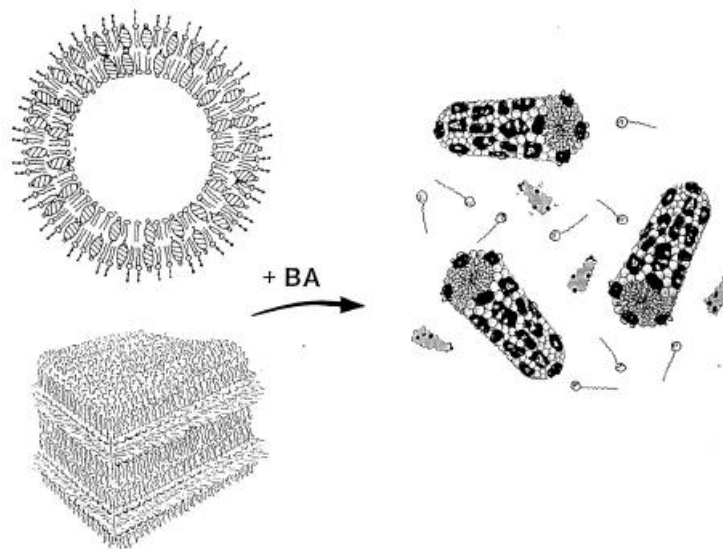


Figura 5: Conversión de vesículas lipídicas o bicapas, por medio de los ácidos biliares (BA), En micelas mixtas cilíndricas (tomado de Hofmann y Hagey, 2008).

Son moléculas rígidas, anfipáticas, solubles en agua, que facilitan la digestión y absorción intestinal de lípidos, eliminan colesterol del cuerpo, aumentan la actividad microbiana en el intestino delgado, inducen el flujo biliar, solubilizan metales polivalentes como hierro y calcio en el duodeno, promoviendo su absorción, y estimulan la secreción de mucus en el intestino delgado, inhibiendo la adhesión bacteriana (Hofmann, 1999, 2009; Mukhopadhyay y Maitra, 2004; Moschetta y col.,2005; Hofmann y Hagey, 2008, 2014).

Algunos ácidos biliares poseen roles específicos y de relevancia ecológica y biológica en especies de vertebrados, como peces salmónidos y lampreas, en los cuales funcionan como señales químicas especie-específicas para el reconocimiento entre con-específicos, como feromonas, durante la migración y como disparadores de respuestas

comportamentales (Li y col., 1995; Baker y col., 2006; Huertas y col., 2007; Zhang y col., 2001; Giaquinto y col., 2015).

Por otro lado, un gran número de enfermedades hepato-biliares se encuentran asociadas con el metabolismo de los ácidos biliares, en especial con defectos en su biosíntesis. Se sabe que los ácidos biliares, particularmente los secundarios, son citotóxicos, promotores de tumores, jugando un rol prevalente en la etiología del cáncer de colon y de hígado, habiéndose encontrado que son carcinogénicos en algunos modelos animales (Kamano y col., 1999, Hofmann, 2009; Sevco y col., 2015).

Se ha reconocido también que los ácidos biliares funcionan como moléculas de señalización, que regulan la expresión de varios genes a través de receptores nucleares (Chiang, 2004; Zollner y col., 2006).

Utilidad filogenética de los ácidos biliares

El estudio de las estructuras de compuestos de interés biológico como los ácidos biliares ha contribuido a la elucidación de las relaciones filogenéticas entre las especies de vertebrados (Hagey y col., 2010a,b; Hofmann y Hagey, 2008, 2014).

Haslewood fue un pionero en la identificación de dichos compuestos en un gran número de especies de vertebrados (Sjovall y col., 2010). A partir del año 1950, él y su equipo aislaron y establecieron la estructura de los ácidos biliares más comunes en los vertebrados, al mismo tiempo que desarrollaron el uso de técnicas cromatográficas para su estudio (Haslewood, 1954, 1967; Andersson y Haslewood, 1962; Haslewood y Tammar, 1968).

Posteriormente, se han realizado diversos trabajos para estudiar la estructura y composición de los ácidos biliares en matrices biológicas de vertebrados (Hagey, 1992; Picton y Kendall, 1994; Capurro y col., 1997; Cazón y Sühring, 1999; Hagey y col.,

2002; Guerrero y col., 2006; Khorozyan y col., 2007). Sin embargo, son escasos los estudios que han utilizado el perfil de ácidos biliares para analizar relaciones evolutivas entre especies de vertebrados (Hagey y col., 1993, 1994, 2010a,b,c; Reyes, 1994; Krasowski y col., 2005; Moschetta y col., 2005; Kakiyama y col., 2006; Hofmann y col., 2010), y nunca a partir de las heces.

Se ha propuesto que los ácidos biliares son los estados apomórficos o derivados de las sales biliares (Hagey y col., 2010a). Es interesante destacar que se ha demostrado que la estructura molecular de las sales biliares muestra un patrón de desarrollo progresivo a lo largo de la línea evolutiva de los vertebrados, desde los alcoholes biliares C27, pasando por los ácidos biliares C27 hasta los ácidos biliares C24 (Hofmann, 1999; Mukhopadhyay y Maitra, 2004). La evolución progresiva de dichos compuestos es detectable no sólo entre miembros de diferentes familias y órdenes, sino aún entre miembros del mismo género.

Las sales biliares evolutivamente “más tempranas” son alcoholes biliares 5 α que poseen una unión *trans* entre los anillos A/B y que retienen los 27 átomos de carbono del colesterol, además de poseer una cadena lateral de 8 carbonos en el anillo D (Reschly y col., 2008; Hagey y col., 2010a,b). Los ácidos biliares cólico y quenodeoxicólico, presentes en la mayoría de las especies de mamíferos, son ejemplos de ácidos biliares “más recientes” en términos evolutivos, que poseen 24 átomos de carbono y forma curvada debido a la unión *cis* entre los anillos A/B; la cadena lateral es más corta con 5 átomos de carbono (Hagey y col., 2010a). Las sales biliares con un número total de átomos de carbono diferente a 24 ó 27 son poco comunes, pero pueden aparecer como componentes menores de la bilis (Une y Hoshita, 1994; Hagey y col., 2010a).

Análisis de ácidos biliares en heces

El análisis de las heces colectadas a campo es una herramienta fundamental que se aplica en estudios de tamaño poblacional, análisis de la dieta y para identificar la presencia de una especie en un área determinada (Fernández y col., 1997; Khorozyan y col., 2007). Esta técnica es particularmente útil cuando se trabaja con especies elusivas, difíciles de observar en la naturaleza, que se encuentran amenazadas o que comparten un mismo hábitat (Kohn y Wayne, 1997; Burnham y col., 2008).

Si bien la identificación de las heces puede realizarse visualmente a través de sus características físicas externas como tamaño, forma, olor y color, o a través de señales específicas asociadas a su deposición como huellas y otras marcas (Fernández y col., 1997; Khorozyan y col., 2007), se presentan ciertas dificultades. Muchas de dichas características son sensibles a las condiciones ambientales como el calor, la desecación o la descomposición en ambientes húmedos y lluviosos; más aún, pueden ser afectadas por otro tipo de factores como la salud, la dieta, el tamaño y la edad de los individuos (Capurro y col., 1997; Fernández y col., 1997; Chame, 2003). Es por ello que la identificación visual comúnmente debe ser confirmada a través de otros métodos.

El análisis de compuestos esteroides fecales, como los ácidos biliares, presenta importantes ventajas, por ser una técnica no invasiva y porque existen diferencias especie-específicas en cuanto al metabolismo esteroide (Schwarzenberger, 2007). Particularmente, la determinación cromatográfica de los ácidos biliares fecales ha sido un método utilizado para la identificación de heces de algunas especies; ello fue posible mediante la comparación de patrones de ácidos biliares entre heces colectadas a campo y heces de origen conocido, lo que ha permitido, incluso, la identificación de especies cercanamente relacionadas (Taber y col., 1997; Cazón y Sühring, 1999; Khorozyan y

col., 2007), evitando procedimientos invasivos como la captura y manipulación de los animales.

Métodos de análisis de los ácidos biliares

Las técnicas más utilizadas para el análisis de ácidos biliares en muestras biológicas son las cromatográficas, principalmente Cromatografía en Capa Fina, TLC (Eneroth, 1963; McNamara y col., 1981; Zarzycki y col., 1999; Martina y col., 2010), Cromatografía Gaseosa, GC (Grundy y col., 1965; Eneroth y col., 1966; Batta y col., 2002; Iida y col., 2004; Kumar y col., 2011) y Cromatografía Líquida de Alta Presión, HPLC (Yeh y Hwang, 2001; Zhang y col., 2001; Kakiyama y col., 2014), acopladas a una gran variedad de métodos de detección (Sarbu y col., 2001; Goto y col., 2005; Natalini y col., 2006; Hagio y col., 2009; Wang y col., 2011; Kakiyama y col., 2014; Zhang y col., 2013). Asimismo, se han desarrollado métodos no cromatográficos como, por ejemplo, espectroscópicos, enzimáticos, inmunológicos y electroquímicos (Scalia, 1995; Saric y col., 2007; Griffiths y Sjövall, 2010).

Con respecto a los primeros métodos utilizados para el análisis de ácidos biliares en muestras biológicas, como la colorimetría, la fluorimetría y la cromatografía en papel, no eran sensibles ni específicos, y fueron ampliamente desplazados por las técnicas modernas como TLC, HPLC y GC; todas ellas altamente específicas y sensibles, detectando concentraciones del orden de los picomoles y aumentando la eficiencia de la resolución (Batta y Salen, 1999; Griffiths y Sjövall, 2010).

La elección de un método cromatográfico depende del objetivo del estudio, de la naturaleza de la matriz, de la concentración de los analitos y de la detectabilidad y precisión requeridas (Roda y col., 1998). Debido a que son pequeñas las diferencias entre los ácidos biliares en relación a las propiedades fisicoquímicas como lipofilicidad

y polaridad (Roda y col., 1983), es de esperar que la utilización de un único método cromatográfico no provea una completa separación de los componentes de la mezcla compleja de ácidos biliares fecales.

La GC y la GC acoplada a detectores de masa (GC-MS) se han utilizado para análisis cualitativos y cuantitativos de ácidos biliares en distintas matrices biológicas (Evrard y Janssen, 1968; Tint y col., 1978; Keller y Jahreis, 2004; Solá y col., 2006; Kumar y col., 2011). Sin embargo, estas técnicas se ven limitadas debido al complejo pretratamiento y derivatización de las muestras, ya que se deben aislar y purificar los ácidos biliares, previo a su análisis (Batta y Salen, 1999).

El requerimiento de la GC de volatilizar las muestras fue eliminado con la introducción de la HPLC (Shaw y Elliott, 1976 en Griffiths y Sjövall, 2010). Así, la HPLC ha sido utilizada para el análisis de los perfiles de ácidos biliares en diferentes matrices biológicas (Lin y col., 2000; Burkard y col., 2005; Persson y col., 2007; Vertzoni y col., 2008; Hagio y col., 2009; Sardella y col., 2012; Xiay col., 2014). La ventaja principal de la HPLC sobre otras técnicas cromatográficas es su simplicidad, ya que algunas clases de ácidos biliares pueden ser analizadas directamente, sin largas derivatizaciones, usando detectores UV convencionales (Roda y col., 1992; Kakiyama y col., 2014).

Particularmente, el análisis de los ácidos biliares en heces presenta algunos desafíos debido a la estructura de dichos compuestos, a su baja concentración y a la complejidad de su composición (Batta y Salen, 1999; Perwaiz y col., 2001), habiéndose propuesto varios métodos para la extracción (Manes y Schneider, 1971; Setchell y col., 1983; Locket y Gallaher, 1989; Chaudhury y Chaplin, 1999; Batta y col., 1999; Saric y col., 2007); sin embargo, algunos de ellos insumen mucho tiempo y tienen un costo elevado en cuanto a las cantidades de solventes que utilizan. Asimismo, la elección de

los procedimientos para la colecta, el almacenamiento y el pre-tratamiento de las muestras es importante para la obtención e interpretación de los resultados.

Considerando que se ha propuesto que los ácidos biliares y su concentración relativa siguen patrones que son especie-específicos (Haslewood, 1967), en esta tesis se propone identificar y describir los patrones de ácidos biliares fecales en especies del Superorden Xenarthra. Mediante la determinación cromatográfica de los patrones de ácidos biliares fecales, por medio de TLC y HPLC, se espera encontrar una herramienta para la identificación de las heces a nivel específico, de utilidad para estudios ecológicos, de conservación y distribución de estas especies en la naturaleza.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBA AM & M SUPERINA (2010) The 2009/2010 armadillo Red List assessment. *Edentata* 11: 135-184.
- ABBA AM, GH CASSINI, MH CASSINI & SF VIZCAÍNO (2011) Historia natural del piche llorón *Chaetophractus vellerosus* (Mammalia: Xenarthra: Dasypodidae). *Revista Chilena de Historia Natural* 84:51-64.
- ABBA AM, MF TOGNETTI, VP SEITZ, JB BENDER & SF VIZCAÍNO (2012) Distribution of extant xenarthrans (Mammalia: Xenarthra) in Argentina using species distribution models. *Mammalia* 76: 123-136.
- ABBA AM, GH CASSINI, G VALVERDE, M TILAK, SF VIZCAÍNO, M SUPERINA & F DELSUC (2015) Systematics of hairy armadillos and the taxonomic status of the Andean hairy armadillo (*Chaetophractus nationi*) *Journal of Mammalogy* 94: 673-689.
- AGUIAR JM & GAB DA FONSECA (2008) Conservation status of the Xenarthra. En: Vizcaíno SF & WJ Loughry (eds). *The biology of the Xenarthra*. University Press of Florida. Pp. 215-231.
- ALNOUTI Y, IL CSANAKY & CD KLAASSEN (2008) Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 873: 209-217.
- ANDERSON IG & GAD HASLEWOOD (1962) Comparative Studies of Bile Salts 15. The natural occurrence and preparation of allocholic acid. *Biochemistry Journal* 85: 236-242.

- ANDERSON RP & CO HANDLEY (2001) A new species of three-toed sloth (Mammalia: Xenarthra) from Panama', with a review of the genus *Bradypus*. Proceedings Biological Society Washington 114:1-33.
- BAKER CF, FAG CARTON, JM FINE & PW SORENSEN (2006) Can bile acids function as migratory pheromones in banded kokopu *Galaxius fasciatus* (Gray)? Ecology of Freshwater Fishes 15: 275-283.
- BARQUEZ MR, MM DIAZ & RA OJEDA (2006) Mamíferos de Argentina. Sistemática y Distribución. SAREM. ISBN 987-98497-1-X. Pp. 358.
- BATTA AK & G SALEN (1999) Gas chromatography of bile acids. Journal of Chromatography B 723: 1-16.
- BATTA AK, G SALEN, KR RAPOLE, M BATTA, P BATTA, D ALBERTS & D EARNEST (1999) Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. Journal of Lipid Research 40:1148-1154.
- BATTA AK, G SALEN, P BATTA, GS TINT, DS ALBERTS & DL EARNEST (2002) Simultaneous quantitation of fatty acids, sterols and bile acids in human stool by capillary gas-liquid chromatography. Journal of Chromatography B 775: 153-161.
- BURKARD I, A VON ECKARDSTEIN & KM RENTSCH (2005) Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 826: 147-159.
- BURNHAM E, LC BENDER, GA EICEMAN, KM PIERCE & S PRASAD (2008) Use of volatile organic components in scat to identify canid species. Journal of Wildlife Management 72(3): 792-797.

- CAPURRO AF, AJ NOVARO, A TRAVAINI & M ROMERO (1997) Improved bile acid thin layer chromatography to identify feces of Neotropical carnivores. *Journal of Wildlife Management* 61:1424-1427.
- CASANAVE EB, C MANFREDI & EM LUENGOS VIDAL (2003) Ecología comportamental de los armadillos en un pastizal serrano. En: Vaquero MC y MN Cernadas de Bulnes (eds). *II Jornadas Interdisciplinarias del Sudoeste Bonaerense*. EdiUNS, Bahía Blanca, Argentina. Pp. 115-125.
- CAZÓN AV & SS SÜHRING (1999) A technique for extraction and thin layer chromatography visualization of fecal bile acids applied to Neotropical felid scats. *Revista de Biología Tropical* 47: 245-249.
- CUÉLLAR E (2008) Biology and ecology of armadillos in the Bolivian Chaco. En: Vizcaíno SF & WJ Loughry (eds). *The biology of the Xenarthra*. University Press of Florida. Pp. 306-312.
- CHAME M (2003) Terrestrial Mammal Feces: a Morphometric Summary and description. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 71-94.
- CHAUDHURY S & MF CHAPLIN (1999) Determination of bile acids in human faecal samples using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 726: 71-78.
- CHIANG JY (2004) Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of Hepatology* 40: 539-551.
- DELSUC F, FM CATZEFLIS, MJ STANHOPE & EJP DOUZERY (2001) The evolution of armadillos, anteaters and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: implications for the status of the enigmatic fossil *Eurotamandua*. *Proceedings of the Royal Society of London B*: 1605-1615.

- DOWLING RH (1973) The enterohepatic circulation of bile acids as they relate to lipid disorders. *Journal of Clinical Pathology Suppl.* 5: 59-67.
- ENEROTH P (1963) Thin-layer chromatography of bile acids. *Journal of Lipid Research* 4(1): 11-16.
- ENEROTH P, B GORDON, R RYHAGE & J SJOVALL (1966) Identification of mono- and dihydroxy bile acids in human feces by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 7: 511-523.
- EVARD E & G JANSSEN (1968) Gas-liquid chromatographic determination of human fecal bile acids. *Journal of Lipid Research* 9: 226-236.
- FERNANDEZ GJ, JC CORLEY & AF CAPURRO (1997) Identification of cougar and jaguar feces through bile acid chromatography. *Journal of Wildlife Management* 61: 506-510.
- GARDNER AL (2005) Order Cingulata, Order Pilosa. En: Wilson DE & DM Reeder (eds). *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. Third Edition, Volume 1.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. Pp. 94-102.
- GARDNER AL (2007) Magnorder Xenarthra. En: Gardner AL (ed). *Mammals of South America.* The University of Chicago Press, Chicago. Pp. 127-176.
- GIAQUINTO PC, RE BARRETO, GL VOLPATO, M FERNANDES-DE-CASTILHO & E GONÇALVES-DE-FREITAS (2015) Bile acids as potential pheromones in pintado catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829): electrophysiological and behavioral studies. *Neotropical Ichthyology* 13(1): 237-244.

- GOTO T, A SHIBATA, D SASAKI, N SUZUKI, T HISHINUMA, G KAKIYAMA, T IIDA, N MANO & J GOTO (2005) Identification of a novel conjugate in human urine: bile acid acyl galactosides. *Steroids* 70: 185-192.
- GRIFFITHS WJ & J SJOVALL (2010) Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *Journal of Lipid Research* 51: 23-41.
- GRUNDY SM, EHAHRENS & TA MIETTINEN (1965) Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids. *Journal of Lipid Research* 6:397-410.
- GUERRERO C, L ESPINOZA, HM NIEMEYER & JA SIMONETTI (2006) Empleo del perfil de ácidos biliares fecales para evaluar uso del hábitat por carnívoros amenazados en el bosque maulino de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 89-95.
- HAGEY LR (1992) Bile acid biodiversity in vertebrates: chemistry and evolutionary implication. PhD. thesis, University of California, San Diego, CA. Pp. 205.
- HAGEY LR, CD SCHTEINGART, H-T TON-NU & AF HOFMANN (1994) Biliary bile acids of fruit pigeons and doves (Columbiformes): presence of 10-hydroxychenodeoxycholic acid and conjugation with glycine as well as taurine. *Journal of Lipid Research* 35: 2041-2048.
- HAGEY LR, CD SCHTEINGART, HT TON-NU & AF HOFMANN (2002) A novel primary bile acid in the Shoebill stork and herons and its phylogenetic significance. *Journal of Lipid Research* 43: 685-690.
- HAGEY LR, DL CROMBIE, E ESPINOSA, MC CAREY, H IGIMI & AF HOFMANN (1993) Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *Journal of Lipid Research* 34: 1911-1917.

- HAGEY LR, N VIDAL, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2010a) Evolutionary diversity of bile salts in reptiles and mammals, including analysis of ancient human and extinct giant ground sloth coprolites. *BMC Evolutionary Biology* 10: 133.
- HAGEY LR, PR MOLLER, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2010b) Diversity of bile salts in fish and amphibians: evolution of a complex biochemical pathway. *Physiological Biochemistry Zoology* 83: 308-321.
- HAGEY LR, PR MØLLER, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2010c) Diversity of bile salts in fish and amphibians: evolution of a complex biochemical pathway. *Physiological and Biochemical Zoology* 83:308-321.
- HAGIO M, M MATSUMOTO, M FUKUSHIMA, H HARA & S ISHIZUKA (2009) Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents using LC/ESI-MS. Marked concentration differences in two strains of rats. *Journal of Lipid research* 50(1): 173-180.
- HASLEWOOD GAD & AR TAMMAR (1968) Comparative Studies of Bile Salts. Bile salts of sturgeons (Acipenseridae) and of the paddlefish *Polyodon spathula*: a new partial synthesis of 5 α -cyprinol. *Biochemical Journal* 108: 263-268.
- HASLEWOOD GAD (1954) Comparative Studies of Bile Salts. Bile acids of the coypu, *Myocastor coypus*. *Biochemical Journal* 56: 581-587.
- HASLEWOOD GAD (1967) Bile salts. Methuen & Co. Ltd (ed). London. Pp. 116.
- HOFMANN AF & LR HAGEY (2008) Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology and Therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 2461-2483.
- HOFMANN AF & LR HAGEY (2014) Bile acid chemistry, biology, and therapeutics during the last 80 years: historical aspects. *Journal of Lipid Research* 55: 1553-1595.

- HOFMANN AF (1999) Bile acids: The good, the bad, and the ugly. *News in Physiological Sciences* 14:24-29.
- HOFMANN AF (2004) Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews* 36:703-722.
- HOFMANN AF (2009) The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Frontiers in Bioscience* 14: 2584-2598.
- HOFMANN AF, CD SCHTEINGART & LR HAGEY (1995) Species differences in bile acid metabolism. En: G Paumgartner & U Beuers (eds). *Bile Acids and Liver Diseases (International Falk Workshop)*. Kluwer Academic Publishers, Boston. Pp. 3-30.
- HOFMANN AF, LR HAGEY & MD KRASOWSKI (2010) Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *Journal of Lipid Research* 51:226-246.
- HUERTAS M, PC HUBBARD, AVM CANARIO & J CERDA (2007) Olfactory sensitivity to conspecific bile fluid and skin mucus in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* 70: 1907-1920.
- IIDA T, S OGAWA, G KAKIYAMA, T GOTO, N MANO, J GOTO & T NAMBARA (2004) Capillary gas chromatographic separation of bile acid acyl glycosides without thermal decomposition and isomerization. *Journal of Chromatography A* 1057: 171-176.
- KAKIYAMA G, A HOSODA, T IIDA, Y FUJIMOTO, T GOTO, N MANO, J GOTO & T NAMBARA (2006) A direct method for the separation and quantification of bile acid acyl glycosides by High-Performance Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector. *Journal of Chromatography A* 1125:112-116.

- KAKIYAMA G, A MUTO, H TAKEI, HNITTONO, S IKEGAWA, S REN, WM PANDAK & J BAJAJ (2014) A Simple and Accurate Method in the Analysis of Fecal Bile Acids by Conventional HPLC-UV Is Demonstrated in Cirrhotic Patients. *Gastroenterology* 144(5): S-996.
- KAMANO T, Y MIKAMI, T KURASAWA, M TSURUMARU, M MATSUMOTO, M KANO & K MOTEGI (1999) Ratio of primary and secondary bile acids in feces. Possible marker for colorectal cancer? *Diseases of the Colon & Rectum* 42: 668-672.
- KELLER S & G JAHREIS (2004) Determination of underivatized sterols and bile acid trimethylsilyl ether methyl esters by gas chromatography–mass spectrometry–single ion monitoring in faeces. *Journal of Chromatography B* 813: 199-207.
- KHOROZYAN IG, AV CAZON, AG MALKHASYAN & AV ABRAMOV (2007) Using Thin-Layer Chromatography of Fecal Bile Acids to Study the Leopard (*Panthera pardus cis caucasica*) Population. *Biology Bulletin* 34: 361-366.
- KOHN MH & RK WAYNE (1997) Facts from feces revisited. *Tree* 12(6): 223-227.
- KRASOWSKI MD, K YASUDA, LR HAGEY & EG SCHUETZ (2005) Evolution of the pregnane X receptor: adaptation to cross-species differences in biliary bile salts. *Molecular Endocrinology* 19:1720-1739.
- KUMAR BS, BC CHUNG, Y-J LEE, HJ YI, B-H LEE & BH JUNG (2011) Gas chromatography–mass spectrometry-based simultaneous quantitative analytical method for urinary oxysterols and bile acids in rats. *Analytical Biochemistry* 408:242–252.
- LI W, PW SORENSEN & DD GALLAHER (1995) The olfactory system of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is specifically and acutely sensitive to

- unique bile acids released by conspecific larvae. *Journal of General Physiology* 105: 569-587.
- LIN D-L, H-C CHANG & C-Y CHEN (2000) Identification and quantitation of bile acids in bear bile by HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis* 8(4): 283-288.
- LOCKET PL & DD GALLAHER (1989) An Improved Procedure for Bile Acid Extraction and Purification and Tissue Distribution in the Rat. *Lipids* 24: 221-223.
- LOUGHRY WJ & CM MCDONOUGH (2013) Beyond Natural History: Some Thoughts About Research Priorities in the Study of Xenarthrans. *Edentata* 14:9-14.
- LOUGHRY WJ, M SUPERINA, CM MCDONOUGH & AM ABBA. 2015. Research on armadillos: a review and prospectus. *Journal of Mammalogy*. En prensa.
- MANES JD & DL SCHNEIDER (1971) Extraction of bile acids from rat feces containing cholestyramine. *Journal of Lipid Research* 12: 376-377.
- MARTINA PF, NM SOSA, HA VILTE, GA DUETTE & EC VALDEZ (2010) Mejoras en la técnica de cromatografía en capa delgada de ácidos biliares fecales para la identificación de felinos. *Revista de Ciencia y Tecnología* 14:49-52.
- MCNAMARA DJ, A PROIA & TA MIETTINEN (1981) Thin-layer and gas-liquid chromatographic identification of neutral steroids in human and rat feces. *Journal of Lipid Research* 22: 474-484.
- MÖLLER-KRULL M, F DELSUC, G CHURAKOV, C MARKER, M SUPERINA, J BROSIUS, EJP DOUZERY & J SCHMITZ (2007) Retroposed Elements and Their Flanking Regions Resolve the Evolutionary History of Xenarthran Mammals (Armadillos, Anteaters, and Sloths). *Molecular Biology and Evolution* 24(11): 2573-2582.

- MONTE MJ, JJG MARIN, A ANTELO & J VAZQUEZ-TATO (2009) Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology* 15(7): 804-816.
- MOSCHETTA A, F XU, LR HAGEY, GP VAN BERGE-HENEGOUWEN, KJ VAN ERPECUM, JF BROUWERS, JC COHEN, M BIERMAN, HH HOBBS, JH STEINBACH & AF HOFMANN (2005) A phylogenetic survey of biliary lipids in vertebrates. *Journal of Lipid Research* 46: 2221-2232.
- MUKHOPADHYAY S & U MAITRA (2004) Chemistry and biology of bile acids. *Current Science* 87(12): 1666-1683.
- NATALINI B, R SARDELLA, E CAMAIONI, S NATALINI & R PELLICCIARI (2006) Dominant factors affecting the chromatographic behaviour of bile acids. *Chromatographia* 64(5):343-349.
- NORLIN M & K WIKVALL (2007) Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Current Molecular Medicine* 7:199-218.
- PERSSON E, L LOFGREN, G HANSSON, B ABRAHAMSSON, H LENNERNAS & R NILSSON (2007) Simultaneous assessment of lipid classes and bile acids in human intestinal fluid by solid-phase extraction and HPLC methods. *Journal of Lipid Research* 48: 242-251.
- PERWAIZ S, B TUCHWEBER, D MIGNAULT, T GILAT & IM YOUSEF (2001) Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 42: 114-119.
- PICTON HD & KC KENDALL (1994) Chromatographic (TLC) differentiation of grizzly bear and black bear scats. *International Conference Bear Research and Management* 9: 497-501.

- REDFORD KH & JF EISENBERG (1992) Order Xenarthra (Edentata): Family Dasypodidae. En: Redford KH & JF Eisenberg (eds). Mammals of the Neotropics, Volume 2: The southern Cone: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. The University of Chicago Press, Chicago & London. Pp. 52-68.
- REDFORD KH & RM WETZEL (1985) “*Euphractus sexcinctus*”. Mammalian Species 252:1-4.
- REDFORD KH (1985) Food habits of armadillos (Xenarthra: Dasypodidae). En: Montgomery GG (ed). The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington & London. Pp. 429-437.
- RESCHLY EJ, N AI, S EKINS, WJ WELSH, LR HAGEY, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2008) Evolution of the bile salt nuclear receptor FXR in vertebrates. J. Lipid Res. 49: 1577-1587.
- REYES H (1994) Phylogenetic vision of bile acids. Revista Médica de Chile 122(8): 944-950.
- RODA A, AF HOFMANN & KJ MYSELS (1983) The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. Journal of Biological Chemistry 258: 6362-6370.
- RODA A, C CERRE, P SIMONI, C POLIMENI, C VACCARI & A PISTILLO (1992) Determination of free and amidated bile acids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering mass detection. Journal of Lipid Research 33: 1393-1402.
- RODA A, F PIAZZA & M BARALDINI (1998) Separation techniques for bile salts analysis. Journal of Chromatography B 717: 263-278.
- RUSSELL DW (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. Annual Reviews in Biochemistry 72: 137-174.

- SANDOVAL GÓMEZ V, H RAMÍREZ-CHÁVEZ & D MARÍN (2012) Registros de hormigas y termitas presentes en la dieta de osos hormigueros (Mammalia: Myrmecophagidae) en tres localidades de Colombia. *Edentata* 13: 1-9.
- SARBU C, K KUHAJDA & S KEVRESAN (2001) Evaluation of the lipophilicity of bile acids and their derivatives by thin-layer chromatography and principal component analysis. *Journal of Chromatography A* 917: 361-366.
- SARDELLA R, A GIOIELLO, F IANNI, F VENTURONI & B NATALINI (2012) HPLC/ELSD analysis of amidated bile acids: An effective and rapid way to assist continuous flow chemistry processes. *Talanta* 100: 364-371.
- SARIC J, Y WANG, J LI, M COEN, J UTZINGER, JR MARCHESI, J KEISER, K VESELKOV, JC LINDON, JK NICHOLSON & ELAINE HOLMES (2007) Species Variation in the Fecal Metabolome Gives Insight into Differential Gastrointestinal Function. *Journal of Proteome Research* 7: 352-360.
- SCALIA S (1995) Bile acid separation. *Journal of Chromatography B* 671:299-317.
- SCHWARZENBERGER F (2007) The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook* 41: 52-74.
- SETCHELL KDR, AM LAWSON, N TANIDA & J SJOVALL (1983) General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids and related compounds in feces. *Journal of Lipid Research* 24: 1085-1100.
- SEVCO T, JP DELANY & SJ O'KEEFE (2015) Association Between Low Fecal Short-Chain Fatty Acids, High Fecal Bile Acids and the High Colon Cancer Risk of the Yup'ik Alaska Native People. *Gastroenterology* 148(4): S-99-100.
- SJOVALL J, WJ GRIFFITHS, KDR SETCHELL, N MANO & J GOTO (2010) Analysis of bile acids. En: HLJ Makin y DB Gower (eds). *Steroid Analysis*, Springer Dordrecht Heidelberg, London, UK. Pp. 837-966.

- SOLÁ S, DL GARSHELIS, JD AMARAL, KV NOYCE, PL COY, CJ STEER, PA IAIZZO & CMP RODRIGUES (2006) Plasma levels of ursodeoxycholic acid in black bears, *Ursus americanus*: seasonal changes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143: 204-208.
- SUPERINA M, N PAGNUTTI & AM ABBA (2014) What do we know about armadillos? An analysis of four centuries of knowledge about a group of South American mammals, with emphasis on their conservation. *Mammal Review* 44: 69-80.
- TABER AB, AJ NOVARO, N NERIS & FH COLMAN (1997) The food habits of sympatric jaguar and puma in the Paraguayan Chaco. *Biotropica* 29: 204-213.
- TINT GS, B. DAYAL, AK BATTI, S SHEFER, FW CHENG, G SALEN & EH MOSBACH (1978) Gas- liquid chromatography-mass spectrometry of trimethylsilyl ethers of bile alcohols. *Journal of Lipid Research* 19: 956-966.
- UNE M & T HOSHITA (1994) Natural occurrence and chemical synthesis of bile alcohols, higher bile acids, and short side chain bile acids. *Hiroshima Journal of Medical Science* 43:37-67.
- VERTZONI M, H ARCHONTAKI & C REPPAS (2008) Determination of intraluminal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. *Journal of Lipid Research* 49: 2690-2695.
- WALLACE RB & RLE PAINTER (2013) Observations on the diet of the giant armadillo (*Priodontes maximus* Kerr, 1792). *Edentata* 14:85-86.
- WANG N, Y FENG, TN XIE, W SU, M ZHU, O CHOW, Y ZHANG, K-M NG, C-H LEUNG & Y TONG (2011) Chemical and biological analysis of active free and conjugated bile acids in animal bile using HPLC-ELSD and MTT methods. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2: 125-130.

- XIA L, C WU, Z SUN & J YOU (2014) 2-(2-(Pyren-1-yl)-1 H-benzo [d] imidazol-1-yl)-ethyl-4-methyl benzenesulfonate (PBITS) and its application for determination of bile acids by HPLC-FLD-MS. *Analytical Methods*6(4): 1135-1141.
- YEH YH & DF HWANG (2001) High-Performance Liquid Chromatographic determination for bile components in fish, chicken and duck. *Journal of Chromatography B* 751:1-8.
- ZARZYCKI PK, M WIERZBOWSKA & H LAMPARCZYK (1999) Retention and separation studies of cholesterol and bile acids using thermostated thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* 857: 255-262.
- ZHANG C, SB BROWN & TJ HARA (2001) Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycush*) function as chemical signals. *Journal of Comparative Physiology B* 171:161-171.
- ZHANG JY, Q ZHANG, HX ZHANG, LY DONG, JQ LU&YJ QIAO (2013) Rapid identification of 14 bile acids contained in qingkailing injection by HPLC-ESI-MS/MS. *China journal of Chinese Materia Medica* 38(7): 990-994.
- ZOLLNER G, H-U MARSCHALL, M WAGNER & M TRAUNER (2006) Role of Nuclear Receptors in the Adaptive Response to Bile Acids and Cholestasis: Pathogenetic and Therapeutic Considerations. *Molecular Pharmaceutics* 3(3): 231-251.

CAPÍTULO II



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a que los patrones de ácidos biliares fecales resultaron ser especie-específicos para varias especies de mamíferos, proponemos que también lo son para las especies del Superorden Xenarthra estudiadas.

En el marco de esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos de trabajo:

OBJETIVO GENERAL

Identificar los patrones de ácidos biliares fecales en especies del Superorden Xenarthra y determinar si resultan útiles para la diferenciación de las heces a nivel específico.

A través de la identificación de dichos patrones, se espera encontrar una herramienta útil para estudios ecológicos, de conservación y distribución de estas especies en la naturaleza.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Poner a punto técnicas cromatográficas de TLC y HPLC para identificar el patrón de ácidos biliares presentes en heces de distintas especies del Superorden Xenarthra.
2. Determinar el patrón de ácidos biliares en las heces de distintas especies del Superorden Xenarthra mediante ambas técnicas.
3. Establecer la relación entre la concentración y caracterización de los patrones de ácidos biliares en las heces de las especies estudiadas.

4. Analizar comparativamente los resultados obtenidos mediante TLC y HPLC, para la determinación del patrón de ácidos biliares fecales en *Xenarthra*, con énfasis en la *performance* de ambas técnicas.
5. Establecer el grado de similitud entre las especies estudiadas, tomando como carácter de comparación el perfil de ácidos biliares fecales y relacionarlo con la filogenia establecida para *Xenarthra*.

ESPECIES ESTUDIADAS

Se colectaron y analizaron muestras de heces de diversas especies del Superorden Xenarthra, incluyendo representantes de los órdenes Cingulata y Pilosa, según el siguiente detalle:

Orden Cingulata

- Piche común, *Zaedyus pichiy* (Desmarest, 1804).
- Piche llorón, *Chaetophractus vellerosus* (Gray, 1865).
- Peludo, *Chaetophractus villosus* (Desmarest, 1804).
- Mulita o mulita orejuda, *Dasyus hybridus* (Desmarest, 1804).
- Tatú carreta, *Priodontes maximus* (Kerr, 1792).
- Tatú bola, *Tolypeutes matacus* (Desmarest, 1804).
- Gualacate o tatú amarillo, *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758).

Orden Pilosa

- Suborden Vermilingua
 - Tamandú u oso melero, *Tamandua tetradactyla* (Linnaeus, 1758).
 - Oso hormiguero, *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758.
- Suborden Folivora
 - Perezoso de dos dedos de Hoffmann, *Choloepus hoffmanni* W. Peters, 1858.
 - Perezoso de dos dedos o perezoso de Lineo, *C. didactylus* (Linnaeus, 1758).

ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de heces de las especies estudiadas provinieron de diferentes lugares, tanto de Argentina como del exterior, de animales silvestres y de cautiverio.

Las muestras de individuos silvestres de *Dasyopus hybridus*, *Chaetophractus villosus*, *C. vellerosus* y *Zaedyus pichyi*, fueron colectadas principalmente en dos campos privados ubicados al sudoeste de la Provincia de Buenos Aires; uno de ellos a 17 km al NO de la ciudad de Bahía Blanca (38°35'30'' S / 62°19'00'' O) siguiendo la Ruta Provincial N° 33, y el otro en cercanías a la localidad de Cabildo (38°S 61W), Provincia de Buenos Aires.

Las muestras de animales de cautiverio de *C. villosus*, *C. vellerosus* y *Z. pichyi* fueron obtenidas en el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, y en áreas de muestreo de las localidades de Saladillo (35°S 59°W), Taco Ralo (27°S 65°W) y Cipolletti (38°S 67W).

Las muestras de *Priodontes maximus* provinieron del Parque Nacional El Copo, Provincia de Santiago del Estero, y de reservas privadas de la Provincia de Buenos Aires.

Las heces de *Myrmecophaga tridactyla* provinieron del Zoológico de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, y de la Estación de Fauna Silvestre Finca Las Costas, Provincia de Salta.

Las heces de *Tamandua tetradactyla* provinieron del Zoológico de La Plata, Provincia de Buenos Aires, de la Estación de Fauna Silvestre Finca Las Costas, Provincia de Salta y del Parque Nacional Calilegua, Jujuy.

Las heces de *Euphractus sexcinctus* y *Tolypeutes matacus* provinieron del Parque Nacional El Rey, de la localidad Lumbreras (Dpto. de Metán) y de la Estación de Fauna Silvestre Finca Las Costas, todos en la Provincia de Salta.

Las heces de *Choloepus didactylus* y *C. hoffmanni* provinieron del Zoológico de San Diego, California, Estados Unidos.

CAPÍTULO III



ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE ÁCIDOS BILIARES FECALES POR TLC

INTRODUCCIÓN

Cromatografía: generalidades

La Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a la cromatografía de la siguiente manera:

“La cromatografía es un método de separación físico en el cual los componentes a ser separados se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es fija (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida. Una fase móvil se define como “un fluido que fluye a través, o a lo largo de una cama estacionaria en una dirección definida”. Puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido, un gel o un líquido. Si es un líquido, puede estar distribuido en un sólido, que puede o no contribuir al proceso de separación” (Robards y col., 1994; Ardrey, 2003).

De forma práctica, es una técnica de separación de una mezcla de solutos, que se logra por la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil, y se basa en la diferente velocidad con la que éstos se mueven a través de la fase estacionaria, arrastrados por la fase móvil en movimiento. La muestra se coloca sobre la fase estacionaria y se mueve por el sistema en la fase móvil; así los componentes de dicha muestra son separados en base a sus propiedades físicas y químicas, que les otorgan diferentes afinidades por ambas fases (Peterson y Cummings, 2006). Aquellos componentes que permanecen preferentemente en la fase estacionaria, son retenidos por más tiempo en el sistema que aquellos que se distribuyen selectivamente en la fase móvil. Independientemente de esta definición, la cromatografía es una técnica universal y muy versátil. Es igualmente aplicable a todas las áreas de la química y bioquímica, biología, control de calidad, investigación,

análisis, separaciones de escala preparativa y medidas fisicoquímicas (Robards y col., 1994).

A pesar de que es una técnica principalmente de separación, es también utilizada para purificar pequeñas cantidades de material que poseen un alto valor intrínseco para el investigador. En un solo paso se puede separar una mezcla en sus componentes individuales y, simultáneamente, proveer una estimación cuantitativa de cada constituyente. Las muestras pueden encontrarse en estado gaseoso, sólido o líquido, y pueden ir desde una simple mezcla de dos compuestos hasta una mezcla multicomponente que contenga especies químicamente diferentes. Además, el análisis puede realizarse tanto con un instrumento costoso y complejo, como en una simple y fina placa cromatográfica de muy bajo costo (Scott, 2003).

Aunque originalmente los solutos que se separaban eran coloreados, de ahí el nombre de la técnica, también puede usarse para separar sustancias incoloras que pueden ponerse de manifiesto mediante diversos métodos de detección, tales como la luz UV (López Solanas, 1991; Faust, 1995).

Cromatografía en Capa Fina (CCF) o Thin-Layer Chromatography (TLC)

La TLC, descubierta en el año 1938 (Izmailov y Shreiber, 1983 en Berezkin y col., 2005) fue una de las primeras formas de cromatografía utilizada para el análisis de lípidos y, particularmente, de esteroides y ácidos biliares (Hofmann, 1961; Eneroth, 1963; Gregg, 1966; De Souza y Nes, 1969; Chavez, 1979).

Ya en el año 1963, Roscoe y Fahrenbach mencionaron la importancia de la TLC para la determinación de los ácidos biliares fecales. En la actualidad, la TLC sigue siendo utilizada para el análisis de los ácidos biliares en distintos tipos de muestras biológicas.

La TLC es un tipo de cromatografía plana, en la cual la fase estacionaria es un adsorbente sólido de partículas muy finas, y la fase móvil es líquida. Se utilizan placas de vidrio o aluminio recubiertas por una capa fina y uniforme de la fase estacionaria que, generalmente, es sílica gel modificada químicamente para proveer las condiciones de separación adecuadas según el compuesto a analizar. La correcta elección de la fase móvil o solvente de desarrollo, es esencial para obtener una eficiente separación de los compuestos a analizar (Scalia, 1995; Pyka y Dolowy, 2004, 2005b). La fase móvil generalmente consiste en un sistema de solventes formado por 2, 3 ó 4 componentes que varían en cuanto a su polaridad y pueden incluir agua, solventes orgánicos y buffers (Sherma y Fried, 2005; Peterson y Cummings, 2006).

La sílica gel es el adsorbente más utilizado como fase estacionaria para las separaciones por TLC, especialmente para la identificación y separación de esteroides, como los ácidos biliares en muestras biológicas, debido a sus atractivas propiedades de adsorción como su gran superficie activa, el gran volumen de poro y las posibilidades de regeneración (Gocan, 2002; Dolowy, 2007).

El mecanismo de separación por TLC consiste en la migración diferencial de los componentes de una mezcla a través de la placa cromatográfica, arrastrados por un solvente en movimiento; la distancia recorrida por cada compuesto dependerá de su estructura química y de su afinidad por ambas fases. Son varios los mecanismos de separación que están involucrados, y las fuerzas predominantes dependen de las propiedades de ambas fases y de los solutos a separar (Sherma, 2003; Sherma y Fried, 2005; Peterson y Cummings, 2006).

La TLC es utilizada para el análisis de una gran variedad de lípidos y esteroides; permitiendo la separación e identificación de compuestos en mezclas complejas con

diferentes grados de polaridad, en una misma placa cromatográfica y con un único sistema de solventes (Sherma, 2003).

Debido a la gran similitud que existe en sus estructuras químicas, la separación de los ácidos biliares y sus metabolitos, es dificultosa (Scalia, 1995; Pyka y Dolowy, 2004). A pesar de que son varias las técnicas cromatográficas que comúnmente se aplican para la determinación de los ácidos biliares, la TLC ofrece ventajas prácticas como su relativa simplicidad, los bajos costos del equipo necesario, fácil operación, tiempos cortos de análisis, una alta eficiencia en el análisis simultáneo de un gran número de muestras en una misma placa cromatográfica y una gran tolerancia a muestras “sucias” (Poole, 2003; Palamarev y col., 2004; Luftmann, 2004; Berezkin y col., 2005; Zarzycki y col., 2005). Asimismo, permite la separación confiable y el análisis de una gran variedad de compuestos, a partir de diferentes tipos de matrices biológicas, sin una previa purificación de la muestra (Scalia, 1995).

La TLC puede ser modificada usando diferentes tipos de fases móviles y estacionarias, así como reveladores (Pyka y Dolowy, 2004; Dolowy, 2007); varios tipos de compuestos pueden ser detectados a través de la aplicación de un simple reactivo de visualización post-corrída, y desde un punto de vista práctico, la determinación cuantitativa de los analitos es posible, dependiendo del reactivo de derivatización, del procedimiento seguido, de la técnica de adquisición de datos a partir de las placas y de las habilidades manuales del operador (Zarzycki y col., 2007).

Respecto a los procedimientos de cuantificación por TLC es sabido que, a pesar de que pueden ser sensibles, generalmente no son robustos (Prosek y col., 2001) debido a que estos procedimientos involucran condiciones empíricas; generalmente la cuantificación por TLC requiere de mucha habilidad por parte del operador, ya que se realiza mediante el raspado y elución de las zonas donde se encuentran los analitos

separados (Sherma, 2003), y requiere, además, sumergir la placa, calentarla, controlar la temperatura y luego enfriarla (Zarzycki y col., 2006). Por lo tanto, para una cuantificación confiable, todos estos pasos deben ser adecuadamente controlados, optimizados y validados.

Ácidos biliares fecales

La TLC ha sido utilizada para diferenciar heces de diferentes especies a través de la identificación de sus patrones de ácidos biliares; para lo cual esta técnica debe cumplir ciertos requisitos: permitir diferenciar aquellas heces que se confunden por su aspecto externo, los caracteres que se utilizan para la identificación deben ser estables frente a las condiciones ambientales y la degradación química, y el análisis debe ser relativamente simple y poco costoso (Major y col., 1980).

Los ácidos biliares son compuestos relativamente estables en el tiempo; se ha demostrado que existe muy poca variación entre los perfiles de ácidos biliares fecales de humanos modernos y coprolitos de 2000 años de antigüedad (Lin y col., 1978). Debido a que los ácidos biliares fecales y sus concentraciones relativas son diferentes entre las especies de mamíferos, es posible identificar las heces comparando los patrones de ácidos biliares de muestras no identificadas con aquellas de origen conocido (Major y col., 1980).

La TLC de ácidos biliares fecales ha sido utilizada, desde hace varios años, para diferenciar las heces de varias especies de mamíferos, principalmente carnívoros, tales como hurón (*Galictis cuja*), gato guiña (*Leopardus guigna*), zorro colorado (*Lycalopex culpaeus*), zorro gris (*Lycalopex griseus*), puma (*Puma concolor*), gato del pajonal (*Lynchailurus colocolo*), gato montés (*Leopardus geoffroyi*), yaguareté (*Panthera onca*), leopardo del Cáucaso (*Panthera pardus ciscaucasica*), pandas y distintas

especies de osos (Major y col., 1980; Johnson y col., 1984; Hagey y col., 1993; Picton y Kendall, 1994; Jiménez y col., 1996; Capurro y col., 1997; Fernández y col., 1997; Taber y col., 1997; Cazón y Sühling (1999), Guerrero y col., 2006; Khorozyan y col., 2007; Martina y col., 2010; Salame-Méndez y col., 2012). Sin embargo, hasta nuestro trabajo, nunca había sido aplicada para la identificación de heces de *Xenarthra*.

Particularmente, algunas de las especies de armadillos estudiadas en esta tesis son simpátricas, usan un mismo tipo de hábitat (Ciuccio y col., 2007) y sus heces poseen características físicas externas semejantes, resultando, por ello, difícil la correcta identificación al ser colectadas en el campo. Si dichas heces pueden ser identificadas a través de sus patrones de ácidos biliares, podrían utilizarse como indicadoras de la presencia, e incluso distribución y abundancia, de una determinada especie en un área dada. Más aún, el uso de una técnica relativamente sencilla, de bajo costo, que permite obtener resultados de forma rápida y sin requerimientos de grandes equipamientos, como la TLC, podría resultar una herramienta ecológica importante para la identificación de las heces colectadas a campo.

OBJETIVOS

1. Poner a punto la técnica de TLC para separar e identificar los ácidos biliares presentes en heces de distintas especies del Superorden Xenarthra.
2. Determinar, mediante TLC, el patrón de ácidos biliares fecales de las especies del Superorden Xenarthra estudiadas.
3. Establecer la relación entre la concentración y caracterización de los ácidos biliares fecales en dichas especies.
4. Determinar si existen diferencias en el patrón y concentración de los ácidos biliares fecales, entre individuos de cautiverio y silvestres.
5. Determinar si existen diferencias en la composición de los ácidos biliares fecales entre individuos machos y hembras de una misma especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de las muestras

Las muestras de heces de las especies estudiadas provinieron de individuos silvestres y de cautiverio, tanto de diferentes puntos de Argentina como del exterior (Ver detalle en el Capítulo 2). Asimismo, se analizaron muestras incógnita recolectadas en diferentes regiones del país.

Luego de la colecta a campo, se colocaron en sobres de papel debidamente rotulados. Una vez en el laboratorio, se secaron en estufa a 30°C por 24 horas. Se almacenaron en un lugar seco y fresco, fuera del alcance de la luz, a temperatura ambiente, hasta su análisis. Si las heces se encontraban mezcladas con el sustrato del cual fueron colectadas, la fecha resulta igualmente útil.

En total, se colectaron 105 muestras de las siguientes especies: piche común, *Zaedyus pichiy* (Desmarest, 1804) (n=10), piche llorón, *Chaetophractus vellerosus* (Gray, 1865) (n=5), peludo, *Chaetophractus villosus* (n=57), mulita, *Dasyurus hybridus* (Desmarest, 1804) (n=4), tamandú, *Tamandua tetradactyla* (Linnaeus, 1758) (n=14), oso hormiguero, *Myrmecophaga tridactyla* (Linnaeus, 1758) (n=4), tatú carreta, *Priodontes maximus* (Kerr, 1792) (n=2), tatú bola, *Tolypeutes matacus* (Desmarest, 1804) (n=8) y gualacate, *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) (n=1).

Respecto a la cantidad de muestras por sexo, fueron las siguientes: *Zaedyus pichiy*: 1 hembra (H), 9 machos (M); *Chaetophractus vellerosus*: 4H y 1 M, *Chaetophractus villosus*: 22H, 34M y 1 no identificada, *Dasyurus hybridus*: 3H y 1M, *Tamandua tetradactyla*: 8H, 2M y 4 no identificada, *Myrmecophaga tridactyla*: 2H, 1M y 1 no identificada, *Priodontes maximus*: 1H y 1 no identificada, *Tolypeutes matacus*: 8 no identificadas y *Euphractus sexcinctus*: 1 no identificada.

Una vez colectadas, las muestras fueron almacenadas en sobres de papel con su correspondiente etiqueta de identificación.

Pre-tratamiento de las muestras

En el laboratorio, las heces (Fig. 1) fueron secadas durante un día en estufa a 30°C, y pesadas. Luego, cada hez fue molida con el uso de un mortero y, posteriormente, tamizada con un tamiz de malla fina, con el objetivo de eliminar los restos de mayor tamaño como hojas, restos de invertebrados, ramas, huesos y semillas (Fig. 2).



Figura 1: Heces de *E. sexcinctus* (izquierda), *P. maximus* (medio) y *T. matacus* (derecha).

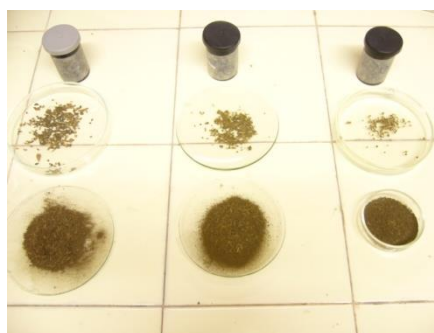


Figura 2: Heces molidas y tamizadas. Arriba se observan los restos de mayor tamaño una vez separados.

Análisis por TLC

Extracción

Para la extracción de los ácidos biliares a partir de las heces se siguió la metodología puesta a punto por Cazón y Sührling (1999). Luego de que las heces fueron

molidas y tamizadas, se obtuvo un polvo para cada muestra. Se extrajo un gramo de cada muestra en 20 mL de benceno: metanol (1:1 v/v) durante 3 horas (Fig. 3) en agitador magnético con controlador de temperatura (Decalab). Los extractos obtenidos fueron filtrados con papel de filtro de malla fina (Fig. 4) y concentrados a temperatura ambiente hasta un volumen final de 5 mL.

En particular, para las muestras de *T. matacus* en las que la visualización de las bandas no fue clara a partir de 1 gramo de hez, se realizó la extracción de los ácidos biliares a partir de 2 gramos en 20 mL de benceno: metanol (1:1 v/v).



Figura 3: Extracción de los ácidos biliares en agitador magnético.



Figura 4: Filtración de los extractos obtenidos.

Extracción de pigmentos vegetales

Debido a que algunas de las especies de *Xenarthra* estudiadas consumen material vegetal, como por ejemplo *E. sexcinctus* (Dalponte y Tavares-Filho, 2004), se decidió probar la separación de los pigmentos vegetales presentes en las heces, y establecer si producen interferencia en la corrida e identificación de los ácidos biliares. Algunas de

las muestras de dichas especies se extrajeron con 100% acetona (Holden, 1976). Se siguió la misma metodología que para la extracción con benceno: metanol (1:1 v/v). Un gramo del polvo de hez fue extraído en 20 mL de acetona durante tres horas en agitador magnético; luego, el extracto obtenido fue filtrado, evaporado a seco y resuspendido en 5 mL de benceno: metanol (1:1 v/v), para ser sembrado, corrido y revelado.

Siembra

Cada extracto y los estándares de los ácidos biliares más comunes para mamíferos fueron sembrados simultáneamente en placas de silicagel 60F₂₅₄ con base de aluminio de 20x20 cm y 0,2 mm de espesor de cama (Merck) con indicador de fluorescencia.

Los estándares de ácidos biliares utilizados fueron los ácidos taurocólico (TCA), taurocólico sódico (TCA sod.), glicodeoxicólico (GCDCA), glicocólico (GCA), glicocólico sódico (GCA sod.), cólico (CA), quenodeoxicólico (CDCA), deoxicólico (DCA), dehidrocólico (DHCA), litocólico (LCA), ursodeoxicólico (UDCA), taurodeoxicólico (TDCA), taurolitocólico (TLCA), glicodeoxicólico (GDCA) y cólico-metil-éster (CME), además del colesterol, todos ellos de Sigma Aldrich Argentina. Asimismo, y luego de haber encontrado compuestos que no correspondieron a los estándares de ácidos biliares, se evaluó la posibilidad de que algunas de las bandas no identificadas correspondieran a ácidos grasos libres, debido a sus propiedades fisicoquímicas y a la polaridad del sistema de solventes utilizados en la TLC. Es por ello que a título informativo se sembró como estándar, el ácido graso oleico (Química Córdoba). Las soluciones de todos los estándares fueron preparadas en metanol, a una concentración de 0.1%.

Se sembraron diferentes cantidades de las muestras (75, 90, 105, 120, 150 y 180 μ l) y de las soluciones estándares (7.5, 15, 22.5 y 30 μ l) con el objetivo de establecer las concentraciones óptimas para lograr una mejor visualización de las bandas en las placas. Se utilizó el punto mezcla (mezcla de todos los estándares de ácidos biliares sembrada en un único punto, un estándar por vez) para observar el comportamiento de los estándares, de forma individual y conjunta.

Desarrollo

Las placas de silicagel se desarrollaron en cubas cromatográficas de vidrio de 20x20 cm y de 20x10 cm, con tapa (Fig. 5). Todas las corridas se realizaron bajo condiciones de saturación de vapor de la cuba con la fase móvil, a temperatura ambiente. Las placas se retiraron cuando la línea del solvente se encontraba aproximadamente a 1 cm del borde superior, marcándose de forma inmediata el frente de solvente.



Figura 5: Desarrollo de una placa en cuba de vidrio de 20x10 cm (izq.) y de 20x20 cm (der.).

Comparación de eluyentes

Con el objetivo de testear el sistema de solventes que permitiese la resolución de la mayor cantidad de compuestos, se probó la utilización de diferentes fases móviles para la separación de los estándares de ácidos biliares utilizados como referencia.

Se utilizaron nueve sistemas de solventes que se detallan a continuación: 1) 100% ciclohexano; 2) 100% éter de petróleo; 3) benceno: metanol (1:1 v/v); 4) benceno: metanol (9.5:0.5 v/v); 5) cloroformo: metanol (0.25:0.5 v/v); 6) tolueno: ácido acético (1:1 v/v); 7) tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5 v/v); 8) tolueno: ácido acético: agua (1.5:5:5 v/v) y 9) tolueno: ácido acético: agua (4:6:1.5 v/v).

Revelado

La placa desarrollada se secó bajo campana y se observó bajo luz UV para detectar cualquier compuesto que pudiera aparecer antes del revelado (Fig. 6). Posteriormente, las bandas se visualizaron rociando la placa con una solución reveladora compuesta por anisaldehído: ácido acético glacial: ácido sulfúrico (0.5:50:1 v/v). Finalmente, las placas fueron calentadas en estufa a 150°C durante 15 minutos y se escanearon para su posterior estudio.

El análisis de las bandas que aparecieron luego del revelado se realizó inmediatamente después de sacar la placa de la estufa y escanearla, ya que los colores característicos de cada compuesto comienzan a desaparecer con el tiempo, tornándose de una coloración marrón uniforme.

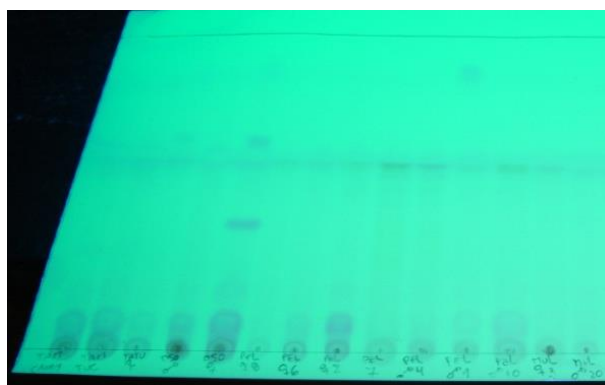


Figura 6: Observación de una placa cromatográfica antes del revelado, bajo luz UV.

TLC preparativa: cuantificación

Con el objetivo de aislar, purificar y cuantificar las bandas obtenidas para cada especie, se realizó la TLC Preparativa (PTLC). Para este paso, la totalidad de cada muestra fue sembrada en forma de banda sobre la línea de siembra de la placa de TLC. La placa fue corrida en cuba de vidrio con una solución de tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5 v/v). Se cortaron y revelaron los extremos de la placa en la dirección del flujo del solvente, con una solución de anisaldehído: ácido acético glacial: ácido sulfúrico (0.5:50:1 v/v).

Luego del revelado de las tiras, se identificaron las zonas correspondientes a cada compuesto y, con la ayuda de una espátula metálica, se levantó la sílica en las zonas previamente demarcadas; se lavó cada fracción con el solvente de extracción, filtrando con papel de filtro para extraer la sílica. Los extractos obtenidos para cada banda, de cada especie estudiada, se resembraron siguiendo el procedimiento tradicional de la TLC, con el objetivo de purificar las bandas y cuantificarlas.

Análisis de los datos

Factores de separación

Para identificar los compuestos, se calculó el factor de retención o *retention factor* R_f (relación que existe entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia recorrida por el frente del solvente) (Fig. 7).

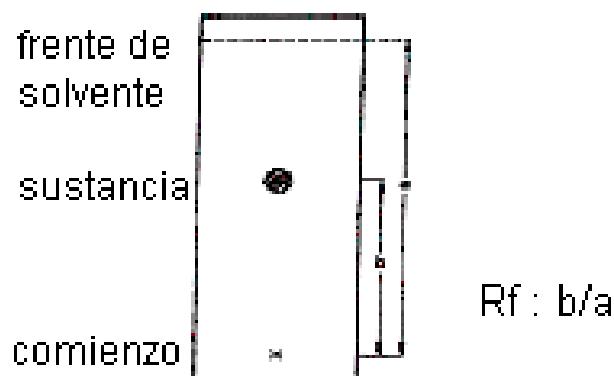


Figura 7: Esquema del factor de retención R_f .

Para los pares de estándares que mostraron valores de R_f muy cercanos entre sí (*pares críticos*), se calcularon dos parámetros de separación, ΔR_f y R_s que caracterizan la posibilidad de separación, por TLC, entre dos bandas adyacentes determinadas. Ambos parámetros se calcularon para los pares críticos de compuestos para los nueve sistemas de solventes utilizados.

El ΔR_f se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Pyka y Dolowy, 2004):

$$\Delta R_f = R_{f1} - R_{f2}$$

Donde R_{f1} y R_{f2} son los valores de dos bandas adyacentes, siendo $R_{f1} > R_{f2}$.

El factor de resolución, R_s , se calculó según la fórmula (Pyka y Dolowy, 2004):

$$R_s = 2 \times (a/b)$$

Donde **a** es la distancia entre el centro de dos bandas adyacentes (en cm), y **b** es la suma de los anchos de dos bandas en la dirección en que se mueve el flujo de solvente (en cm).

La separación de un par de ácidos biliares determinado se consideró satisfactoria cuando el $\Delta R_f \geq 0.05$ y el $R_s > 1$ (Pyka y Dolowy, 2004).

Patrón de ácidos biliares fecales

El patrón de ácidos biliares de cada especie se determinó por comparación de los valores del R_f y por el color e intensidad (concentración) de cada compuesto, con los correspondientes a los estándares utilizados como referencia. El R_f mide la migración relativa de un determinado compuesto en la placa cromatográfica. Los componentes individuales de una mezcla segregan por sus capacidades de movimiento diferenciales (Jiménez y col., 1996).

Se calculó la media (X) y el desvío estándar (DE) de los valores de R_f para cada compuesto y para cada especie (número de repeticiones).

Para los casos en los que se disponía de muestra, se analizó el perfil de ácidos biliares de forma comparativa, entre machos y hembras de la misma especie, y entre individuos de cautiverio y silvestres. Para el caso de *C. villosus*, se analizaron muestras de un mismo individuo de cautiverio que fueron tomadas aleatoriamente en días diferentes y en momentos diferentes de cada día. Asimismo, una muestra de *C. villosus* fue almacenada en el laboratorio, a temperatura ambiente, fuera del alcance de la luz, durante dos años, con el objetivo de analizar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el perfil de ácidos biliares fecales.

RESULTADOS

Estándares de ácidos biliares

En cada placa cromatográfica, todos los ácidos biliares estándares utilizados mostraron un color y un valor de R_f característicos (Tabla 1), que posibilitaron la correcta identificación de los compuestos presentes en las muestras. Todos los estándares se visualizaron como una única banda, a excepción del DHCA que mostró dos y, en algunos casos, tres bandas, todas ellas con un color naranja característico, con diferentes valores de R_f .

Los estándares corridos de forma individual y en el punto mezcla, no mostraron diferencias en cuanto a la coloración y a los valores del R_f (Fig. 1).

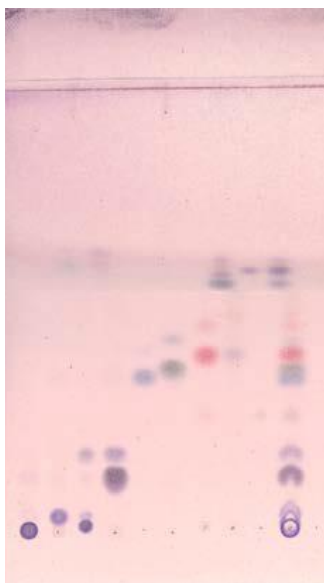


Figura 1: Placa cromatografica revelada en la cual se observan los estandares sembrados de forma separada (izquierda) y el punto mezcla (derecha).

Los estándares que mostraron los colores más intensos fueron el LCA con un color verde oscuro, el TCA con un color azul grisáceo y el colesterol, que se visualizó de un color rosa fuerte característico en todas las placas analizadas. El resto de los

compuestos mostraron colores menos intensos, que variaron entre los azules, grises y violetas (Tabla 1).

Con respecto a la identificación cromatográfica del ácido graso sembrado junto a los estándares de ácidos biliares y muestras de heces, el ácido oleico presentó un valor de R_f que coincidió con un compuesto no identificado presente en las muestras analizadas (X_4), que no correspondió a ninguno de los ácidos biliares estándares. Este compuesto posee un color verde característico y muestra una forma particular de sombrero, por encima del colesterol (Fig. 2).

Estándar	Color	R_f medio \pm DS	n
TCA/TCAsod. /TLCA/TDCA	Azul-grisáceo	0 \pm 0	8
GCDCA	Violeta claro	0.04 \pm 0.01	4
CA/GDCA	Gris-verdoso	0.11 \pm 0.02	6
GCA/GCAsod.	Violeta	0.14 \pm 0.03	8
CDCA/UDCA	Violeta claro	0.28 \pm 0.03	12
DCA	Verde	0.30 \pm 0.03	12
DHCA		0.35 \pm 0.03	12
(2 bandas)	Naranja-rojizo	0.41 \pm 0.05	11
LCA	Verde oscuro	0.52 \pm 0.05	12
Colesterol	Rosa oscuro	0.59 \pm 0.04	12

Tabla 1: Color y valores de R_f (media \pm DS) de los ácidos biliares estándares. Por abreviaturas, ver el texto. n: número de repeticiones de cada estándar en diferentes corridas. Nota: para el ácido dehidrocólico (DHCA) aparece más de una banda en la placa.

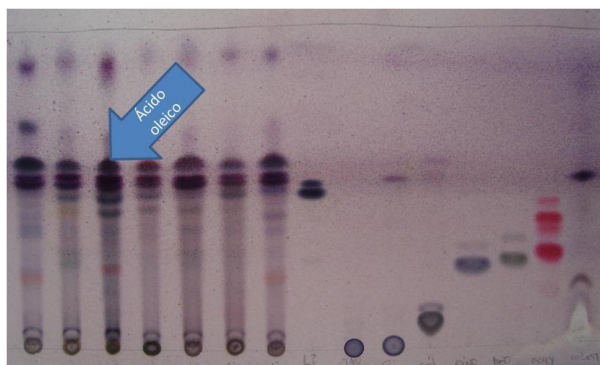
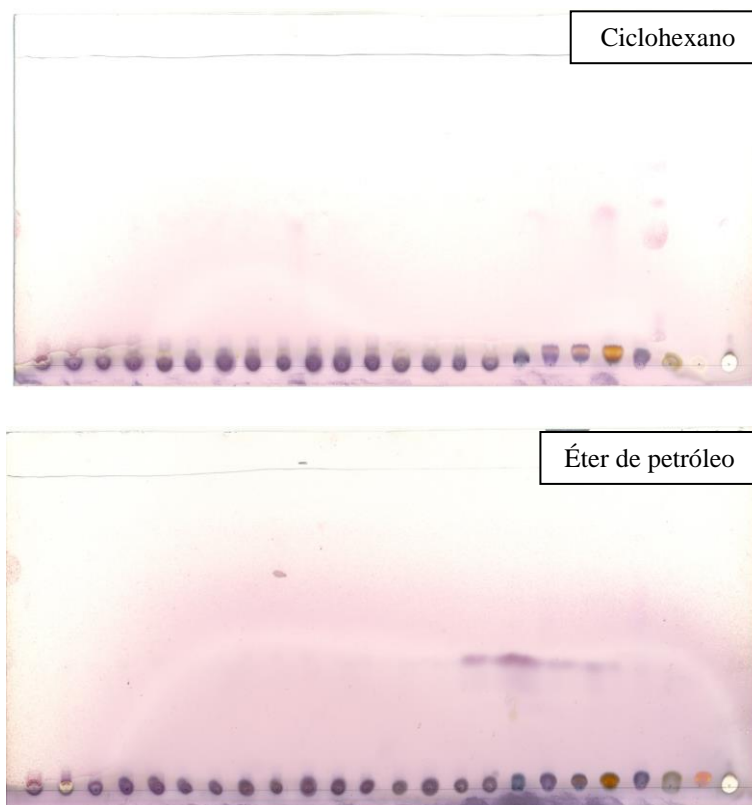


Figura 2: Placa cromatográfica revelada donde se indica la presencia del ácido oleico como una banda en forma de sombrero (flecha), en diferentes muestras.

Comparación de eluyentes y factores de separación

Se probaron los nueve sistemas de solventes descritos como fase móvil para separar los pares críticos de ácidos biliares estándares, cuyos valores de R_f se encontraban cercanos entre sí. Para ello, se calcularon los factores de separación, ΔR_f y R_s , para cada sistema, seleccionándose aquel que permitiese la separación de la mayor cantidad de compuestos. Las Tablas 2 y 3 presentan los valores de ΔR_f y R_s de los pares de ácidos biliares que fueron eluidos con las fases móviles probadas y con las que se logró la separación de, al menos, un par de compuestos.

Algunas de las fases móviles utilizadas para la corrida de las placas cromatográficas no lograron que los compuestos sembrados migraran por las mismas, permaneciendo en la línea de siembra; ello ocurrió en el caso del ciclohexano y el éter de petróleo en concentraciones del 100%, la mezcla de benceno: metanol (1:1 v/v) y la mezcla compuesta por tolueno: ácido acético: agua (1.5:5:5 v/v) (Fig. 3).



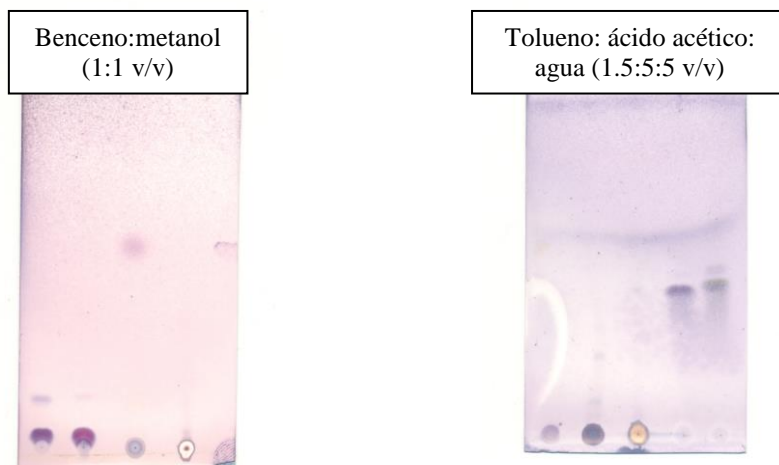


Figura 3: Placas corridas con distintas fases móviles que no produjeron migración de los compuestos.

El sistema de solventes con el que se logró la resolución del mayor número de compuestos fue la mezcla de tolueno: ácido acético: agua, en la proporción de 5:5:1.5 v/v (Tablas 2 y 3). Para aquellos estándares que fueron resueltos con este sistema de solventes no se probaron otros sistemas.

Los pares de compuestos que presentaron una resolución satisfactoria, es decir que presentaron valores de $\Delta R_f \geq 0.05$ fueron TCA/GCA, TCA/GCDCA, GCA/GCA sód., GDCA/GCA, GDCA/GCA sód. y GDCA/GCDCA con el sistema de solventes compuesto por tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5 v/v) y para el par de ácidos biliares DCA/DHCA con el sistema compuesto por tolueno: ácido acético (1:1 v/v) (Tabla 2). Los pares de compuestos que arrojaron valores de $R_s > 1$ fueron: TCA/GCA, TCA/GCDCA, GCA/GCA sód., GDCA/GCA, GDCA/GCA sód., GDCA/GCDCA, DHCA/CDCA y LCA/colesterol con tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5 v/v) y para el par de ácidos biliares DCA/DHCA con el sistema compuesto por tolueno: ácido acético (1:1 v/v) (Tabla 3).

La fase móvil compuesta por tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5 v/v) fue la más eficiente en términos de resolución, ya que con ella se obtuvieron valores de $R_s > 1$ a pesar de la diferencia entre los R_f de algunos pares críticos, como DHCA y CDCA con

0.04; y para el par LCA-colesterol, la diferencia de los valores de R_f fue de tan sólo 0.01 (Tablas 2 y 3).

Por otro lado, si bien algunos ΔR_f y R_s no llegaron a valores de 0.05 y 1 respectivamente, fueron igualmente altos, como por ejemplo el par GCDCA/GCA sód. y DHCA/CDCA para el sistema tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5 v/v) que mostraron valores de 0.04 para el ΔR_f (Tabla 2); y el par DCA/DHCA con un valor de R_s de 0.89 (Tabla 3).

Los ácidos biliares UDCA y CDCA no pudieron ser resueltos con ninguno de los sistemas de solventes utilizados (Tablas 2 y 3), mostrando no sólo un mismo valor de R_f , sino también el mismo color violeta. Si bien ambos compuestos mostraron casi el mismo R_f que el DCA, éste presentó un color verde característico, posibilitando su diferenciación.

Pares críticos	ΔR_f				
	A	B	C	D	E
TCA/TDCA	0	0	0	0	0
TLCA/TDCA	0	0	0	0	0
TLCA/TCA	0	0	0	0	0
TCA/GCA	0.05				
TCA/GCDCA	0.06				
GCDCA/GCA	0.01				
GDCA/GCA	0.14				
GDCA/GCDCA	0.15				
GDCA/CA	0				
DCA/CDCA	0.02	0		0.01	0.02
CDCA/UDCA	0.01	0.01	0	0.01	
DCA/UDCA	0.02	0.01		0	
DCA/DHCA	0.02				0.05
DHCA/CDCA	0.04				0.03
LCA/colesterol	0.01	0.01			0.04

Tabla 2: Valores de ΔR_f para los pares críticos de ácidos biliares estándares, separados en placas de silicagel con diferentes fases móviles: A) tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5); B) cloroformo: metanol (0.25:0.5); C) benceno: metanol (9.5:0.5); D) tolueno: ácido acético: agua (4:6:1.5) y E) tolueno: ácido acético (1:1). Por abreviaturas, ver el texto.

Los ácidos biliares tauroconjugados, TCA, TCA sód., TDCA y TLCA, no pudieron ser resueltos con ninguno de los sistemas de solventes utilizados (Tablas 2 y

3), permaneciendo todos ellos en la línea de siembra; la única diferencia que se encontró es el color azulado más oscuro del TDCA.

La mayoría de los pares de ácidos biliares glicoconjugados comparados pudieron ser eficientemente resueltos con el sistema compuesto por tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5 v/v); a excepción del par GCDCA/GCA que mostró valores de ΔR_f y R_s bajos (Tablas 2 y 3).

De aquí en adelante, se tomarán al GCA y GCA sod. y al TCA y TCA sod. como un mismo compuesto, debido a que no se encontraron diferencias en la migración de los mismos y, por lo tanto, tampoco en sus valores de R_f .

Pares críticos	Rs				
	A	B	C	D	E
TCA/TDCA	0	0	0	0	0
TLCA/TDCA	0	0	0	0	0
TLCA/TCA	0	0	0	0	0
TCA/GCA	1.14				
TCA/GCDCA	1.45				
GCDCA/GCA	0.57				
GDCA/GCA	4.80				
GDCA/GCDCA	4.67				
GDCA/CA	0				
DCA/CDCA	0.73	0		0	0.50
CDCA/UDCA	0	0	0	0.40	
DCA/UDCA	0.73	0		0.40	
DCA/DHCA	0.89				1.11
DHCA/CDCA	1.60				0.75
LCA/colesterol	1.60	0.31			0.62

Tabla 3: Valores de R_s para algunos pares cercanos de ácidos biliares estándares, separados en placas de silicagel con diferentes fases móviles: A) tolueno: ácido acético: agua (5:5:1.5); B) cloroformo: metanol (0.25:0.5); C) benceno: metanol (9.5:0.5); D) tolueno: ácido acético: agua (4:6:1.5) y E) tolueno: ácido acético (1:1). Por abreviaturas, ver el texto.

Concentración de las muestras

Para el análisis de las muestras, la intensidad de cada banda fue proporcional a la concentración del compuesto. Las muestras provenientes de animales de cautiverio mostraron extractos más concentrados que aquellos correspondientes a individuos

silvestres, obteniéndose bandas más intensas en las placas cromatográficas, manteniendo los perfiles de ácidos biliares para la especie (Fig. 4 y 5).

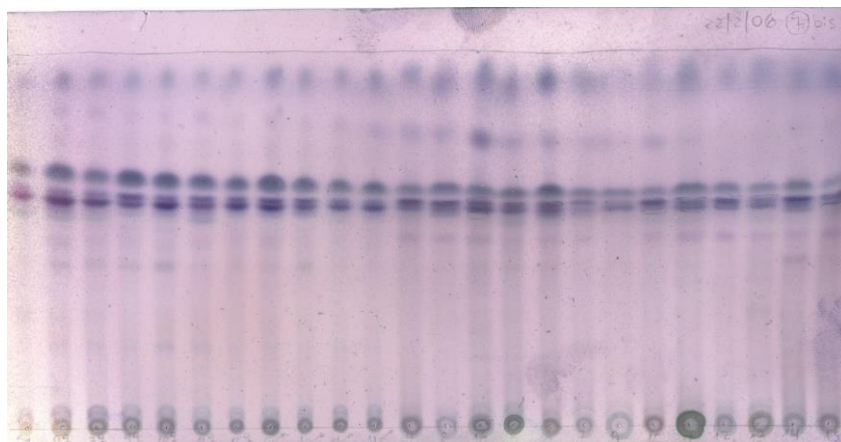


Figura 4: Placa cromatográfica revelada de muestras de individuos machos y hembras de *C. villosus* silvestres.

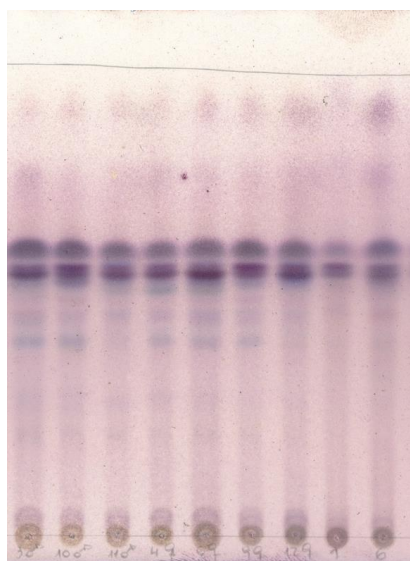


Figura 5: Placa cromatográfica revelada de muestras de individuos hembras y machos de *C. villosus* de cautiverio.

Para los extractos fecales, la cantidad sembrada que nos permitió lograr una buena visualización de las bandas dependió, principalmente, de la condición del animal, 90 μ l para heces de animales de cautiverio y 150-180 μ l para los extractos de individuos silvestres. Los extractos obtenidos a partir de muestras de *D. hybridus*, fueron los más diluidos de todas las especies estudiadas, haciéndose difícil la correcta visualización de

las bandas en las placas cromatográficas; para esta especie se debieron sembrar 180 μ l de cada extracto.

Respecto a la antigüedad de las muestras recolectadas a campo, se analizó una muestra de un individuo silvestre de *C. villosus*, dos años más vieja que el resto de las muestras.

Esta muestra de *C. villosus* se almacenó durante dos años, con el objetivo de conocer si el periodo de almacenamiento afectaba la composición de ácidos biliares. Solo fue factible hacerlo con una muestra, ya que del resto se poseía muy poca cantidad. Las bandas pudieron ser perfectamente visualizadas e identificadas en las placas cromatográficas. Cabe aclarar que el resto de las muestras recolectadas eran frescas o se analizaron inmediatamente luego de su recolección, desconociéndose el tiempo que permanecieron a la intemperie.

Para algunas especies de las cuales se tenía gran cantidad de hez, se probó la extracción de los ácidos biliares tanto a partir de 1 como de 2 gramos de hez, de una misma muestra. Para el resto de las especies, no se encontraron diferencias en el patrón de ácidos biliares, identificado a partir de 1 o 2 gramos de hez. Sin embargo, para *T. matacus*, las placas reveladas obtenidas a partir de 1 gramo de hez, mostraron la presencia de un menor número de bandas y en baja concentración (Fig. 6, calles 1 y 2). Por el contrario, cuando se sembraron extractos obtenidos a partir de 2 gramos de hez, pudo observarse la aparición de algunos compuestos no visualizados previamente, como por ejemplo el ácido dehidrocólico con su distintivo color anaranjado y el ácido cólico de color verde en el patrón de *T. matacus* (Fig. 6, calle 3).

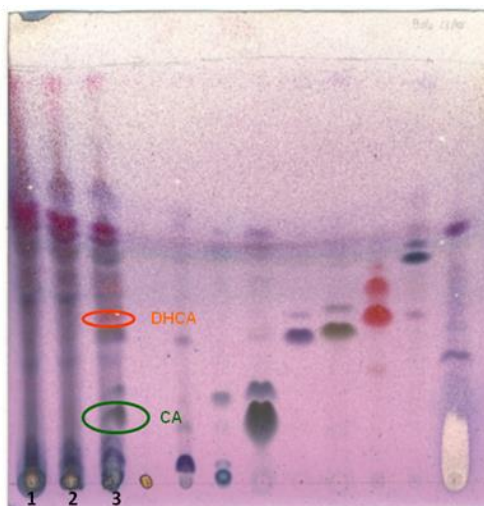


Figura 6: Comparación de las cantidades sembradas respecto al CA y DHCA para *T. matacus*. Extracción a partir de 1 g de hez (calles 1 y 2) y a partir de 2 g de hez (calle 3).

Patrón de ácidos biliares

Las heces de todas las especies estudiadas mostraron, en total, 17 compuestos en las placas cromatográficas. De ellos, ocho correspondieron a ácidos biliares estándares: TCA, GCDCA, CA, GCA, CDCA, DCA, DHCA y LCA, ocho correspondieron a compuestos no identificados, los que se denominaron $X_{1matacus}$, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 (ácido oleico), X_5 , X_6 y X_7 , ya que no coincidieron con ninguno de los estándares de ácidos biliares utilizados, y también se encontró colesterol (Tabla 4).

Se encontraron diferencias en los patrones de ácidos biliares fecales de todas las especies estudiadas (Tabla 4, Fig. 7), pero no entre machos y hembras de una misma especie, o entre individuos de la misma especie (Fig. 4 y 5). Todas las especies presentaron TCA, GCDCA y LCA, además de colesterol y X_4 (ácido oleico) (Fig. 7).

	<i>D. hybridus</i>	<i>Z. pichiy</i>	<i>C. vellerosus</i>	<i>C. villosus</i>	<i>T. tetradactyla</i>	<i>M. tridactyla</i>	<i>P. maximus</i>	<i>T. matacus</i>	<i>E. sexcinctus</i>
TCA	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
GCDCA	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.03	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0	0,04	0.07±0
CA	0.13±0.03	0.15±0.03	0.17±0.01	0.18±0.03		0.20±0	0,19	0,11	
GCA								0,15	0.12±0
CDCA		0.25±0.04	0.23±0.04	0.27±0.01			0,27	0.24±0.01	0,43
DCA				0.30±0.01				0.32±0.00	0.47±0
DHCA 1		0.29±0.06	0.34±0.08	0.29±0.08	0.26±0.02			0,37	
DHCA 2		0.43±0.04	0.45±0.02	0.45±0.08			0,42		
LCA	0.52±0.05	0.52±0.03	0.50±0.03	0.53±0.04	0.55±0.03	0.56±0.05	0,51	0.57±0.01	0,59
CHOL	0.54±0.04	0.56±0.03	0.53±0.03	0.56±0.04	0.54±0.03	0.57±0.04	0.53±0.01	0.60±0.01	0,68
X1 matacus								0,07	
X ₁		0.38±0.03	0.38±0.02	0.40±0.04	0.39±0.03	0.45±0	0.37±0.01	0.41±0.03	
X ₂		0.41±0.03	0.43±0.02	0.45±0.03	0.45±0.02	0.49±0.01		0.49±0.014	
X ₃		0.57±0.02		0.59±0.03	0.58±0.02	0.63±0.02	0,56		0,61
X ₄	0.58±0.03	0.62±0.03	0.58±0.03	0.61±0.04	0.63±0.03	0.65±0.06	0.6±0.02	0.64±0.01	0,64
X ₅		0.73±0.04	0.66±0.07	0.74±0.07	0.81±0.04	0.69±0.05	0.73±0.06	0.71±0.01	0,75
X ₆	0.91±0.05	0.85±0.06	0.87±0.04	0.92±0.03	0.93±0.04	0.91±0.04	0,87		
X ₇		0.93±0.03		0.92±0.02	0.96±0.01		0,93	0.95±0	0.98±0
n	15	33	31	112	16	6	3	9	3

Tabla 4: Presencia y/o ausencia de cada compuesto para todas las especies expresado como media de los valores de R_f (\pm DS). Nota: los espacios en blanco significan que el compuesto no está presente en esa especie. Por abreviaturas, ver el texto. n: número de repeticiones.

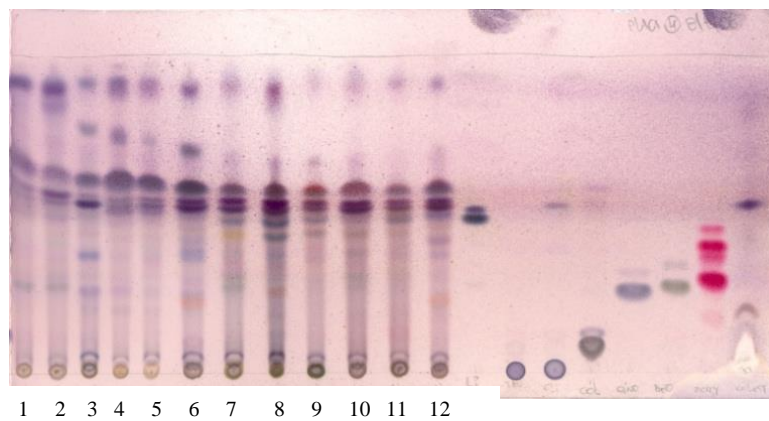


Figura 7: Placa cromatográfica revelada que muestra los diferentes ácidos biliares como bandas de distintos colores para algunas de las especies estudiadas. Calles 1 y 2: *T. tetradactyla*, Calle 3: *P. maximus*, Calles 4 y 5: *M. tridactyla*, Calle 6: *Z. pichiy*, Calle 7: *C. vellerosus*, Calles 8, 9, 10, 11 y 12: *C. villosus* Nota: a la derecha se muestran los ácidos biliares estándares.

Respecto a la frecuencia de ocurrencia absoluta de los diferentes ácidos biliares en todas las especies, se encontró que los ácidos biliares primarios, CA y CDCA, aparecieron en siete y en seis de las nueve especies respectivamente; mientras que los ácidos biliares secundarios, DCA y LCA aparecieron en tres y en todas las especies respectivamente. El compuesto que apareció con la menor frecuencia fue el GCA (Fig. 8).

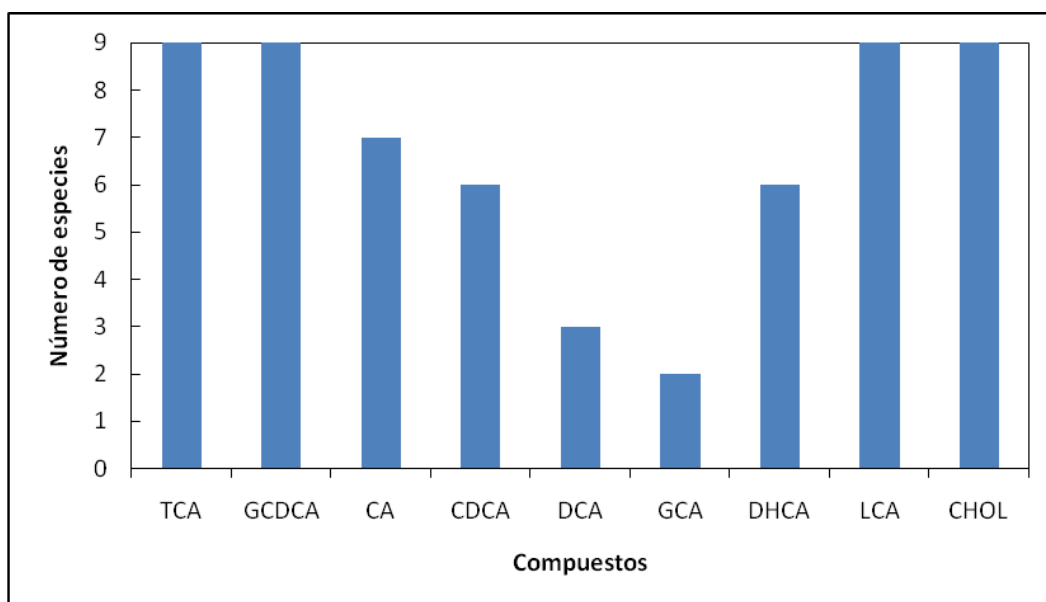


Figura 8: Frecuencia de aparición de los ácidos biliares identificados y el colesterol en relación al número de especies. Por abreviaturas, ver el texto.

Para las muestras de *C. villosus*, única especie que pudo estudiarse de esta forma, en cautiverio, se estableció que no hubo diferencias en los perfiles de ácidos biliares fecales a lo largo del día, ni en días diferentes, para un mismo individuo.

D. hybridus mostró el menor número de compuestos (siete), seguida de *M. tridactyla* y *E. sexcinctus* con 11, *T. tetradactyla* y *C. vellerosus* con 12, *P. maximus* con 13, *Z. pichiy* con 14 y *C. villosus* y *T. matacus* con 15 compuestos en total.

T. matacus fue la única especie que presentó un compuesto no identificado exclusivo (X_1 *matacus*), no presente en el resto de las especies, permitiendo una rápida identificación de la misma (Tabla 4).

Sólo tres especies presentaron más de una banda del DHCA: *C. villosus* (R_f : 0.29 ± 0.08 y 0.45 ± 0.08), *C. vellerosus* (R_f : 0.34 ± 0.08 y 0.45 ± 0.02) y *Z. pichiy* (R_f : 0.29 ± 0.06 y 0.43 ± 0.04) (Tabla 4).

Z. pichiy y *C. vellerosus* difirieron por la presencia en *Z. pichiy* de los compuestos no identificados X_3 (R_f : 0.57 ± 0.02) y X_7 (R_f : 0.93 ± 0.03); *Z. pichiy* se diferenció de *D. hybridus*, *P. maximus*, *T. tetradactyla* y *M. tridactyla* porque tuvo un

mayor número de compuestos (Tabla 4). *D. hybridus* difirió de *Z. pichiy*, *C. vellerosus* y *C. villosus* porque no presentó CDCA, DHCA, X₁, X₂ ni X₅; se diferenció de *T. tetradactyla* por presentar CA (R_f: 0.13±0.03), y no presentar DHCA1, X₁, X₂, X₃, X₅ y X₇ y de *P. maximus* y *M. tridactyla* por no presentar X₁, X₃ ni X₅ (Tabla 4).

P. maximus difirió de *T. tetradactyla* y *M. tridactyla* porque presentó CDCA (R_f: 0.27) y DHCA2 y no presentó X₂. *T. tetradactyla* se diferenció de *M. tridactyla* por presentar DHCA1 y X₇ y por no presentar CA (Tabla 4).

E. sexcinctus se diferenció de *T. matacus* por no presentar CA, DHCA, X₁ y X₂, además de X₁ matacus. Asimismo, se diferenció de *P. maximus* por poseer GCA y DCA y por no poseer CA, DHCA, X₁, y X₆.

Debido a la variabilidad encontrada entre muestras de una misma especie, en este trabajo establecimos que son necesarias entre 4 y 5 corridas de cada muestra, en placas diferentes, para confirmar la presencia de los compuestos encontrados, particularmente para las muestras de animales silvestres en las cuales la concentración de algunos compuestos era muy pequeña.

Pigmentos vegetales

Durante la corrida de las placas en las cubas cromatográficas, se observaron bandas coloreadas que correspondieron a los pigmentos vegetales. Estas bandas mostraron colores amarillos y naranjas para las muestras de animales de cautiverio, y bandas de color verde para muestras de animales silvestres. Para las muestras de individuos de *Z. pichiy*, *C. vellerosus* y *D. hybridus*, estas bandas fueron de un color menos verdoso y menos intenso que para muestras de *C. villosus*, que mostraron las bandas más intensas de todas las especies de armadillos analizadas. Por otro lado, *M. tridactyla*, *T. tetradactyla* y *P. maximus* mostraron bandas de color marrón.

En las muestras de *E. sexcinctus* se encontró una gran cantidad de pigmentos vegetales, que pudieron observarse durante el desarrollo de la placa (Fig. 9). Los pigmentos vegetales se visualizaron a simple vista como bandas de color amarillo, naranja y verde, y fueron identificados con facilidad debido a la carencia de color de las bandas de los ácidos biliares antes del revelado. En las muestras de *T. matacus* no se observaron pigmentos.

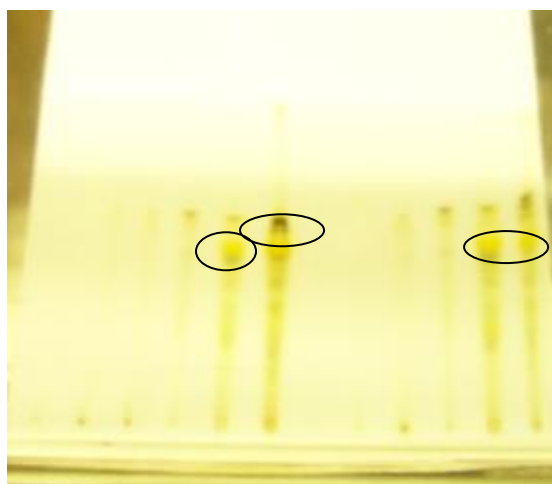


Figura 9: Corrida de una placa cromatográfica de *E. sexcinctus* (izq.), donde se observan los pigmentos vegetales como bandas de color amarillo y verde (círculos).

Cuando se realizó la extracción de los pigmentos vegetales presentes en las heces con acetona, no se obtuvo la separación de los mismos en cantidades significativas; y las muestras sembradas a partir de estos extractos arrojaron los mismos perfiles de ácidos biliares que aquellas muestras extraídas con benceno: metanol (1:1 v/v).

Por otro lado, la presencia de cantidades significativas de pigmentos vegetales en las muestras de *E. sexcinctus* y *D. hybridus* no interfirió en la corrida cromatográfica de los ácidos biliares ya que, una vez revelada la placa, se observaron bandas correspondientes a ácidos biliares por encima de la línea de los pigmentos, indicando que corrieron sin ninguna dificultad.

Identificación de muestras incógnita

Se recolectaron tres muestras incógnita en el Parque Nacional El Rey, Salta, que mostraron características físicas externas propias de las heces de *E. sexcinctus*, tales como color, forma y tamaño. Sin embargo, al analizar dichas muestras por TLC, se determinó que los patrones de ácidos biliares no coincidieron con el patrón de la especie establecido a partir de muestras de animales de cautiverio, ni fueron iguales entre sí (Fig. 10). Estas heces tampoco coincidieron con el patrón de ácidos biliares fecales de ninguna otra especie de *Xenarthra* estudiada. En una de las tres muestras se observaron nueve bandas con distinto valor de R_f , que no correspondieron a ninguno de los estándares utilizados como referencia, pero sí, algunos de ellos, coincidieron con los compuestos no identificados de las especies estudiadas.

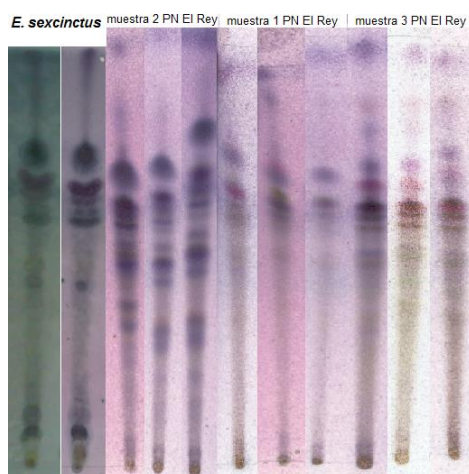


Figura 10: Patrón de ácidos biliares de las muestras incógnitas del PN El Rey que no correspondieron a las especies estudiadas. Izq.: patrón de *E. sexcinctus*, como referencia.

En cuanto a las heces incógnita recolectadas en el Parque Nacional El Copo, los patrones de ácidos biliares fecales de dichas muestras tampoco coincidieron con el patrón de ninguna de las especies de *Xenarthra* estudiadas.

Por otro lado, en el caso de una muestra de un individuo de *C. vellerosus* proveniente de una captura, en la cual el recolector no pudo asegurar la tipificación de la especie, se realizó el análisis de los patrones de ácidos biliares fecales por TLC y éste

coincidió con el patrón de dicha especie. En otro caso, se analizó una muestra que el recolector aseguraba que se trataba de *C. villosus*. Sin embargo, el perfil de ácidos biliares fecales correspondió al patrón de *C. vellerosus*.

Cuantificación de los compuestos

Los extractos obtenidos por medio de la TLC preparativa para cada banda y cada especie estudiada, se resembraron en placas cromatográficas siguiendo la metodología clásica de TLC. Sin embargo, no fue posible la completa purificación de los mismos y las bandas no fueron visibles en las placas reveladas (Fig. 11).

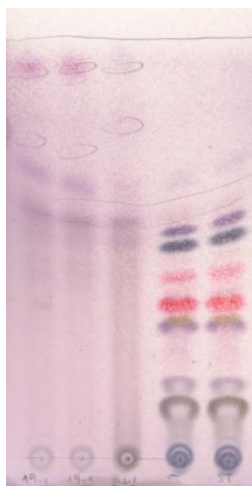


Figura 11: Placa cromatográfica revelada a partir de la TLC preparativa. Calles 1, 2 y 3: compuestos puros aislados de una muestra de *D. hybridus*. Calles 4 y 5: punto mezcla de los estándares.

DISCUSIÓN

La TLC ha sido ampliamente utilizada para la separación e identificación de ácidos biliares en muestras biológicas, debido a que es relativamente fácil de operar, posee un bajo costo y puede realizarse directamente en muestras biológicas sin un paso previo de purificación (Perwaiz y col., 2001; Sherma y Fried 2005; Pyka y Dolowy, 2005b). Asimismo, como cualquier técnica de laboratorio, necesita de mucha práctica y experiencia (Khorozyan y col., 2007) y requiere de un análisis detallado y cuidadoso por parte del investigador. Varias características de las bandas tales como su color, intensidad y valores de R_f de cada ácido biliar, deben analizarse cuidadosamente en las placas cromatográficas para determinar el patrón completo de cada especie.

En algunas investigaciones se ha reportado que la TLC presenta insuficiente poder de resolución, especialmente cuando se trata de extractos biológicos de composición compleja (Scalia, 1995; Jiménez y col., 1997). No obstante, en este trabajo demostramos la gran sensibilidad del sistema de TLC utilizado para resolver los componentes presentes en las heces, debido a que pudieron discriminarse incluso algunos pares de ácidos biliares con valores de R_f muy similares, tales como el CDCA-DCA y CA-GCA. A pesar de que algunos valores de R_f de los estándares estuvieron parcialmente solapados, fue posible establecer un rango de R_f para cada compuesto y, junto con su color característico, las bandas fueron correctamente identificadas.

Asimismo, se ha reportado con anterioridad que los compuestos presentes en mezclas complejas parecen interferir entre ellos, y no siempre corren a la misma velocidad que los estándares sembrados de forma individual (Haslewood, 1967; Major y col., 1980). En este trabajo ello no ocurrió, ya que no se observaron diferencias en los valores del R_f para los compuestos corridos individualmente y en el punto mezcla.

Nuestros resultados corroboran la importancia de sembrar las soluciones estándares junto con las muestras en una misma placa cromatográfica, como ha sido mencionado por otros autores (Hofmann, 1961; Kritchevsky y col., 1963). De esta manera, tanto los estándares como las muestras sembradas quedan sujetas a las mismas condiciones de experimentación en un mismo momento, minimizando variaciones debidas a condiciones ambientales, placas, operabilidad, entre otros, que podrían afectar los valores de R_f .

Durante varios años, la TLC de ácidos biliares fecales ha sido utilizada para identificar las heces colectadas a campo, principalmente para especies con bajos contenidos de material vegetal en sus dietas, como los carnívoros (Fernández y col., 1997; Cazón y Sühring, 1999).

Esta técnica ha resultado particularmente útil en estudios ecológicos que tienen como objetivo diferenciar las heces de especies simpátricas, que poseen características físicas externas muy similares, como en el caso de algunas especies de osos y carnívoros (Picton y Kendall, 1994; Khorozyan y col., 2007). Hay que tener en cuenta que aún cuando la identificación de las heces a través de los sentidos sea hecha por un experto, se pueden cometer errores en la determinación de la especie, debidos a que la apariencia, textura, el olor o el tamaño de las heces pueden ser similares entre distintas especies, lo cual es especialmente cierto si sólo se cuenta con muestras incompletas (Johnson y col., 1984, Cazón y col., 1999; Salame-Méndez y col., 2012). Este sería el caso de las muestras incognita referidas, cuya tipificación no correspondió a la esperada.

A pesar de la utilidad demostrada de la TLC de ácidos biliares fecales, en algunos estudios no dio los resultados esperados por los autores, tal es el caso de Johnson y col. (1986) que no pudieron diferenciar las heces de *Mustela nigripes* de otras especies de carnívoros simpátricos, y de Jiménez y col. (1996), quienes no lograron

diferenciar las heces de *Lycalopex culpaeus* y *L. griseus* en Chile, argumentando una alta variabilidad en el patrón de bandas, aún entre heces de un mismo individuo. Por el contrario, Capurro y col. (1997) sí pudieron discriminar las heces de ambas especies. Más aún, Guerrero y col. (2006) demostraron que el patrón de ácidos biliares fecales fue específico para algunas especies de carnívoros amenazados de Chile.

Como se expuso en los resultados, a pesar de que hubo algunas variaciones entre muestras de una misma especie, especialmente entre heces de animales de cautiverio y silvestres debidas a la baja concentración de los ácidos biliares en estas últimas, todas las especies estudiadas pudieron ser identificadas. Más aún, se comprobó la utilidad de la técnica para confirmar o refutar la identificación específica hecha a campo.

Variaciones entre algunas muestras de la misma especie, como las aquí encontradas, han sido reportadas con anterioridad por otros autores (Jiménez y col., 1996; Capurro y col., 1997; Fernández y col., 1997) para otras especies, y se pueden deber a diferentes factores.

El primer factor a tener en cuenta es la cantidad de ácidos biliares presente en las muestras; en general, en las heces de animales provenientes de cautiverio, los ácidos biliares se visualizaron con mayor nitidez. En el caso de las muestras de animales silvestres, fue necesario realizar más de una corrida cromatográfica y repetir las extracciones con mayor cantidad de material, debido a la baja concentración de algunos compuestos, posiblemente por lavado de material durante la permanencia a la intemperie.

El segundo factor es el efecto del tipo de dieta, que ha sido considerado en varias investigaciones para interpretar los resultados obtenidos (Picton y Kendall, 1994; Quinn y Jackman, 1994). Es posible que la presencia de algunas sustancias químicas en las heces, tales como ésteres y grasas provenientes de los frutos incorporados en la dieta,

tenga un efecto sobre la detectabilidad de los ácidos biliares, enmascarando las bandas (Jiménez y col., 1996) como fue observado, por ejemplo, para coyotes por Quinn y Jackman (1994).

Las especies de *Xenarthra* estudiadas en este trabajo consumen diversos ítems alimenticios, incluyendo invertebrados, pequeños vertebrados, carroña, raíces de plantas, tubérculos y semillas en sus dietas (Casanave y col., 2003; Dalponte y Tavares-Filho, 2004; Soibelzon y col., 2007; McDonough y Loughry, 2008). Las diferencias en el color de los extractos entre las especies podrían reflejar dichas variaciones en la composición de sus dietas, principalmente debido a los pigmentos vegetales, ya que los ácidos biliares carecen de coloración. En trabajos previos con otras especies de mamíferos, como osos, se ha reportado que los pigmentos vegetales enmascararon las bandas de ácidos biliares en las placas cromatográficas haciendo difícil su identificación, y que la extracción de los mismos no dio buenos resultados (Goodwin, 1984 y Picton, 1986 en Picton y Kendall, 1994). En nuestro trabajo, si bien encontramos material vegetal en las heces, éstas contenían sólo pequeñas cantidades; y, como fue establecido en los resultados, no hubo evidencias de que algún ítem presa natural ingerido por alguna de las especies haya interferido con los ácidos biliares durante la corrida cromatográfica.

Otro factor a tener en cuenta para el análisis de los resultados obtenidos, es la edad de las heces colectadas a campo, ya que las condiciones ambientales juegan un rol muy importante en la habilidad de la TLC de ácidos biliares fecales para identificar las especies a partir de sus heces (Taber y col., 1997; Khorozyan y col., 2007). Algunos autores (Major y col., 1980; Picton y Kendall, 1994; Ray, 1996; Khorozyan y col., 2007) también sugirieron que la permanencia de las heces a la intemperie o el almacenamiento de las mismas por largos periodos de tiempo en el laboratorio, podrían

disminuir la concentración de los ácidos biliares, llevando a una tipificación errónea de las mismas. En este estudio, se demostró que los ácidos biliares pueden ser claramente identificados aún en heces viejas, como fue el caso de la muestra de *C. villosus* de mayor antigüedad que el resto, estableciéndose, por lo tanto, que el almacenamiento de la muestra en el laboratorio no interfirió con la correcta identificación de los ácidos biliares presentes en ella.

La precisión en el uso de la TLC en el laboratorio es otro factor importante para ser considerado, y que ha sido tomado en cuenta en otros trabajos (Picton y Kendall, 1994; Jimenez y col., 1996; Cazón y Sühling, 1999). En este estudio, se observó que las variaciones en la TLC dentro de las condiciones controladas del laboratorio fueron menores, e incluyeron variaciones en la migración del frente del solvente entre placas y dentro de una misma placa, dificultad en la lectura de la placa debido a la baja concentración de algunos compuestos, bandas ensanchadas (siembra incorrecta), bandas excesivamente oscuras (gran cantidad sembrada) y un rociado de las placas con el agente visualizador no siempre uniforme.

Todos estos factores podrían resultar en que algunas áreas de la placa cromatográfica queden poco coloreadas, llevando a una interpretación incorrecta de las bandas. No obstante, los resultados de este trabajo sugieren que la técnica de TLC para identificar los patrones de ácidos biliares fecales de *Xenarthra* es lo suficientemente robusta como para compensar dichas variaciones y permitir una caracterización exitosa.

Particularmente, uno de los desafíos que se presentan al utilizar la TLC para el análisis de ácidos biliares es la elección de las condiciones de separación óptimas, como por ejemplo la composición de la fase móvil, el adsorbente adecuado y la temperatura de desarrollo de las placas entre otras (Pyka y Dolowy, 2005a,b,c). La sílicagel aquí utilizada es la primera opción en cuanto a la fase estacionaria, y ha sido muy empleada

para la identificación y separación de diferentes esteroides, especialmente ácidos biliares presentes en muestras biológicas (Dolowy, 2007). Por lo tanto, el mayor problema de la TLC se presenta en casos específicos para la selección de una adecuada fase móvil. En la bibliografía se han citado infinidad de fases móviles utilizadas para la separación de ácidos biliares, con diferentes grados de éxito (Fernández y col., 1997; Pyka y Dolowy, 2004; Zarzycki y col., 2006). En esta tesis, la solución compuesta por tolueno: ácido acético: agua en la proporción 5:5:1.5 v/v fue la fase móvil más adecuada para nuestro objetivo, permitiendo la resolución de la mayoría de los compuestos presentes en las heces de *Xenarthra*. Esto mismo fue observado en trabajos previos para otras especies de mamíferos (Major y col., 1980; Capurro y col., 1997; Cazón y Sühring, 1999; Khorozyan y col., 2007).

Por otro lado, la TLC es una cromatografía de desarrollo, ya que los compuestos permanecen en la placa luego de su separación; sin embargo, es necesario recuperar dichos compuestos para los análisis posteriores de identificación. La técnica más utilizada con este objetivo es raspar la sílica de la placa en el lugar donde se encuentran las bandas de interés y extraer el compuesto con solventes orgánicos, tal como fue realizado en esta tesis. Sin embargo, al igual que en el trabajo de Luftmann (2004), este método insumió mucho tiempo, produjo soluciones diluidas de las bandas y recontaminación de los compuestos aislados, impidiendo la completa purificación de los mismos. Una de las posibles explicaciones acerca de las limitaciones para obtener una completa purificación de los compuestos, es la gran cantidad de bandas que se generan en el perfil de las especies estudiadas, haciéndose difícil la identificación de compuestos individuales.

Con respecto a los compuestos no identificados por TLC, cabe destacar que pudimos establecer que el compuesto X₄ correspondía al ácido graso oleico. Además, tal

como fue establecido en la bibliografía (Capurro y col., 1996; Cazón y Sühring, 1999; Khorozyan y col., 2007), con el sistema de TLC utilizado, los ácidos biliares migraron entre la línea de siembra y el colesterol, por lo tanto, aquellos compuestos que se encuentran por encima del colesterol (X₅, X₆ y X₇, además del X₄) no serían ácidos biliares. Cabe destacar que las especies estudiadas pudieron ser igualmente identificadas aún sin considerar esos cuatro compuestos.

Cabe aclarar que en este trabajo no fue posible investigar si existen variaciones en la composición de ácidos biliares debido a la edad de los individuos en *Xenarthra*, estudiado para otras especies de vertebrados, debido a que en este trabajo las muestras utilizadas provenían de individuos adultos o de edad desconocida. Al respecto, se encontraron diferencias en la concentración de ciertos ácidos biliares en individuos de diferentes edades, por ejemplo, para osos y humanos (Hagey y col., 1993; Lundell y Wikvall, 2008), conservándose siempre el perfil específico.

Con las limitaciones expuestas, en esta parte de la tesis se demostró la utilidad de la TLC para identificar las heces de especies de *Xenarthra*, ya que permitió la extracción, visualización e identificación de los perfiles ácidos biliares fecales de todos los individuos, de todas las especies estudiadas. Por ello, proponemos que la técnica podría ser útil para futuros estudios ecológicos en *Xenarthra*.

Finalmente, si bien la TLC demostró ser una técnica rápida, relativamente sencilla y poco costosa para la determinación de los patrones de ácidos biliares fecales en especies de *Xenarthra*, mostró ciertas limitaciones en la detección de algunos ácidos biliares, que no pudieron ser totalmente resueltos, como en el caso de los tauroconjugados y del par de ácidos biliares no conjugados, UDCA-CDCA.

Es por ello que surge la necesidad de aplicar una técnica más sensible y resolutive para la detección y separación de todos los ácidos biliares presentes en las heces de Xenarthra, como la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

BIBLIOGRAFÍA

- ARDREY RE (2003) Liquid Chromatography. En: J Wiley & Sons, Ltd. (eds). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An introduction. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England. Pp. 7-31.
- BEREZKIN V G, AO BALUSHKIN, BV TYAGLOV & EF LITVIN (2005) Use of low volatility mobile phases in electroosmotic thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* 1084: 13-17.
- CAPURRO AF, AJ NOVARO, A TRAVAINI & M ROMERO (1997) Improved bile acid thin layer chromatography to identify feces of Neotropical carnivores. *Journal of Wildlife Management* 61: 1424-1427.
- CASANAVE EB, C MANFREDI & EM LUENGOS VIDAL (2003) Ecología comportamental de los armadillos en un pastizal serrano. En: M del C Vaquero y M N Cernadas de Bulnes (eds). II Jornadas Interdisciplinarias del Sudoeste Bonaerense. EdiUNS, Bahía Blanca, Argentina. Pp. 115-125.
- CAZÓN AV & SS SÜHRING (1999) A technique for extraction and thin layer chromatography visualization of fecal bile acids applied to Neotropical felid scats. *Revista de Biología Tropical* 47: 245-249.
- CHAVEZ MN (1979) Thin-layer chromatographic separation of keto derivatives of free bileacids. *Journal of Chromatography* 162: 71-75.
- CIUCCIO M, MS ARAUJO & EB CASANAVE (2007) Estudio ecológico de las especies de armadillos presentes en cercanías de Bahía Blanca. En: N Cazaña y M del C Vaquero (eds). Ambiente natural, campo y ciudad: Estrategias de uso y conservación en el Sudoeste Bonaerense. EdiUNS, Bahía Blanca, Argentina. Pp. 183-190.

- DALPONTE JC & JA TAVARES-FILHO (2004) Diet of the yellow armadillo, *Euphractus sexcinctus*, in south-central Brazil. *Edentata* 6: 37-41.
- DE SOUZA NJ & WR NES (1969) Improved separation of sterols by reversed-phase thin-layer chromatography. *Journal of Lipid Research* 10: 240-243.
- DOLOWY M (2007) Separation of selected bile acids by TLC. IX. Separation on Silica gel 60 and on silica gel 60F254 aluminum plates impregnated with Cu (II), Ni (II), Fe (II) and Mn (II) cations. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 30: 405-418.
- ENEROTH P (1963) Thin-layer chromatography of bile acids. *Journal of Lipid Research* 4(1): 11-16.
- FAUST CB comp. (1995) *Modern Chemical Techniques*. The Royal Society of Chemistry. Londres, UK. Cap. 1: 1-29, Cap. 5: 116-159.
- FERNANDEZ GJ, JC CORLEY & AF CAPURRO (1997) Identification of cougar and jaguar feces through bile acid chromatography. *Journal of Wildlife Management* 61: 506-510.
- GOCAN S (2002) Stationary phases for thin-layer chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 40(10): 538-549.
- GOODWIN E (1984) Differentiation of brown bear and black bear scats: an evaluation of bile acid detection by thin layer chromatography. *Big game studies: Vol. VI- Black bear and brown bear*, S. Miller, principle investigator. Alaska Dep. of Fish and Game Document 2325: 46-67.
- GREGG JA (1966) New solvent systems for thin-layer chromatography of bile acids. *Journal of Lipid Research* 7: 579-581.
- GUERRERO C, L ESPINOZA, HM NIEMEYER & JA SIMONETTI (2006) Empleo del perfil de ácidos biliares fecales para evaluar uso del hábitat por carnívoros

- amenazados en el bosque maulino de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 89-95.
- HAGEY LR, DL CROMBIE, E ESPINOSA, MC CAREY, H IGIMI & AF HOFMANN (1993) Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *Journal of Lipid Research* 34: 1911-1917.
- HASLEWOOD GAD (1967) *Bile salts*. Methuen & Co. Ltd., London. Pp. 116.
- HOFMANN AF (1961) Thin-layer adsorption chromatography of free and conjugated bile acids on silicic acid. *Journal of Lipid Research. Notes on Methodology* 127-128.
- HOLDEN M (1976) Chlorophylls. En: TW Goodwin (ed). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Academic Press, New York. Pp. 2-37.
- IZMAILOV NA & MS SHREIBER (1983) *Farmatsiya* 3: 1-7. *Journal of Planar Chromatography* 8 (1995) 402 (translation).
- JIMENEZ JE, JL YÁÑEZ & FM JAKSIC (1996) Inability of Thin layer chromatography to distinguish feces from congeneric foxes by their bile acid contents. *Acta Theriologica* 41: 211-215.
- JOHNSON MK, R BELDEN & DR ALDRED (1984) Differentiating mountain lion and bobcat scats. *Journal of Wildlife Management* 48: 239-244.
- JOHNSON MK, TW CLARK, MH SCHROEDER & L RICHARDSON (1986) Fecal bile acids of black-footed ferrets. *Great Basin Naturalist Memoirs* 8: 141-144.
- KHOROZYAN IG, AV CAZON, AG MALKHASYAN & AV ABRAMOV (2007) Using Thin-Layer Chromatography of Fecal Bile Acids to Study the Leopard (*Panthera pardus ciscaucasica*) Population. *Biology Bulletin* 34: 361-366.
- KRITCHEVSKY D, DS MARTAK & GH ROTHBLAT (1963) Detection of bile acids in thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry* 5(5): 388-392.

- LIN DS, WE CONNOR, LK NAPTON & RF HEIZER (1978) The steroids of 2000-year-old human coprolites. *Journal of Lipid Research* 19: 215-221.
- LOPEZ SOLANAS (1991) *Técnicas de laboratorio*. EDUNSA. Barcelona, España. Cap. 15: 171-181.
- LUFTMANN H (2004) A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer. *Anal Bioanalytical Chemistry* 378: 964-968.
- LUNDELL K & K WIKVALL (2008) Species-specific and age-dependent bile acid composition: aspects on CYP8B and CYP4A subfamilies in bile acid biosynthesis. *Current Drug Metabolism* 9: 323-331.
- MAJOR M, MK JOHNSON, WS DAVIS & TF KELLOG (1980) Identifying scats by recovery of bile acids. *Journal of Wildlife Management* 44: 290-293.
- MARTINA PF, NM SOSA, HA VILTE, GA DUETTE & EC VALDEZ (2010) Mejoras en la técnica de cromatografía en capa delgada de ácidos biliares fecales para la identificación de felinos. *Revista de Ciencias y Tecnología* 14: 49-52.
- MC DONOUGH CM & WJ LOUGHRY (2008) Behavioral ecology of armadillos. En: Vizcaíno SF & WJ Loughry (eds). *The biology of the Xenarthra*. University Press of Florida. Pp. 281-293.
- PALAMAREV CE, M I KANDINSKA & MD PALAMAREVA (2004) Automatic Selection of Mobile Phases. IV. Thin-Layer Chromatography on Silica of Simple and Complex Organic Compounds. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 27: 2003-2018.
- PERWAIZ S, B TUCHWEBER, D MIGNAULT, T GILAT & IM YOUSEF (2001) Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 42: 114-119.

- PETERSON BL & CUMMINGS BS (2006) A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography* 20: 227-243.
- PICTON HD & KC KENDALL (1994) Chromatographic (TLC) differentiation of grizzly bear and black bear scats. *International Conference Bear Research and Management* 9: 497-501.
- PICTON HD (1986) The chromatographic identification of bear scats. Rep. for contract 60 181-05034-6 U.S. Fish and Wildl.Serv. Pp. 16.
- POOLE CF (2003) *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam. Pp. 925.
- PROSEK M, A GOLC-WONDRA & I VOVK (2001) Quantifying uncertainty in quantitative TLC *Journal of Planar Chromatography* 14(2): 100-108.
- PYKA A & M DOLOWY (2005a) Lipophilicity of selected bile acids as determined by TLC. I. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 26(16): 2741-2748.
- PYKA A & M DOLOWY (2005b) Separation of selected bile acids by TLC. VII. Separation by reversed partition HPTLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28: 1573-1581.
- PYKA A & M DOLOWY (2005c) Separation of selected bile acids by TLC. VI. Separation on Cyano-and Diol-Modified silica layer. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28: 1383-1392.
- PYKA A & M DOLOWY (2004) Separation of selected bile acids by TLC. III. Separation on Various Stationary Phases. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 27(16): 2613-2623.
- QUINN T & WR JACKMAN (1994) Influence of diet on detection of fecal bile acids by thin-layer chromatography. *Journal of Wildlife Management* 58: 295-299.

- RAY JC (1996) Resource use patterns among mongooses and other carnivores in a central African rainforest. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville.
- ROBARDS K, PR HADDAD & PE JACKSON (1994) Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods. Academic Press, London, San Diego. Pp. 495.
- ROSCOE HG & MJ FAHRENBACH (1963) Removal of fecal pigments and its application to the determination of fecal bile acids in the rat. *Analytical Biochemistry* 6: 520-529.
- SALAME-MÉNDEZ A, M ANDRADE-HERRERA, L ZAMORA-TORRES, H SERRANO, S SOTO-MENDOZA, A CASTRO-CAMPILLO, J RAMÍREZ-PULIDO & J HARO-CASTELLANOS (2012) Método optimizado para evaluar ácidos biliares de muestras fecales secas o preservadas en etanol como herramienta para identificar carnívoros silvestres. *Acta Zoológica Mexicana* 28(2): 305-320.
- SCALIA S (1995) Bile acid separation. *Journal of Chromatography B* 671: 299-317.
- SCOTT RPW (2003) Introduction. En: Principles and Practice of Chromatography: Book 1, Chrom-Ed Book Series. Pp. 1-15.
- SHERMA J & B FRIED (2005) Thin layer chromatographic analysis of biological samples. A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28: 2297-2314.
- SHERMA J (2003) Basic TLC Techniques, Materials, and Apparatus. En: M Dekker, Inc. (eds). *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, New York. Pp. 1-46.
- SOIBELZON E, G DANIELE, J NEGRETE, AA CARLINI & S PLISCHUK (2007) Annual diet of the little hairy armadillo, *Chaetophractus vellerosus* (Mammalia, Dasypodidae) in Buenos Aires Province, Argentina. *Journal of Mammalogy* 88: 1319-1324.

- TABER AB, AJ NOVARO, N NERIS & FH COLMAN (1997) The food habits of sympatric jaguar and puma in the Paraguayan Chaco. *Biotropica* 29: 204-213.
- ZARZYCKI PK, MA BARTOSZUK & AI RADZIWON (2006) Optimization of TLC Detection by Phosphomolybdic Acid Staining for Robust Quantification of Cholesterol and Bile Acids. *Journal of Planar Chromatography* 19: 52-57.
- ZARZYCKI PK, M BARAN, E WLODARCZYK & MA BARTOSZUK (2007) Improved Detection of Ergosterol, Stigmasterol, and Selected Steroids on Silica Coated TLC Plates using Phosphomolybdic Acid Staining. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 30: 2629-2634.
- ZARZYCKI PK, KM KULHANEK, R SMITH, MA BARTOSZUK & H LAMPARCZYK (2005) Planar Chromatography versus Column Chromatography: A Performance Comparison. *LCGC North America* 23(3): 286-300.

CAPÍTULO IV



ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE ÁCIDOS BILIARES FECALES POR HPLC

INTRODUCCIÓN

Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC): generalidades

Actualmente se encuentran en uso una gran variedad de técnicas cromatográficas que difieren en cuanto a sus componentes. En general, un sistema cromatográfico de HPLC está compuesto por (Fig. 1): un dispositivo para la introducción de la muestra, una fase móvil, una bomba o sistema dispensador de solventes, una columna (fase estacionaria), un detector y un sistema de procesamiento de datos que comprende hardware y software (Ardrey, 2003). Obtener el máximo aprovechamiento de una columna de HPLC exige la utilización de sistemas de cromatografía integrados, es decir, que todos sus componentes estén específicamente diseñados y acoplados en busca de la eficiencia máxima (García-Segura y col., 1996).

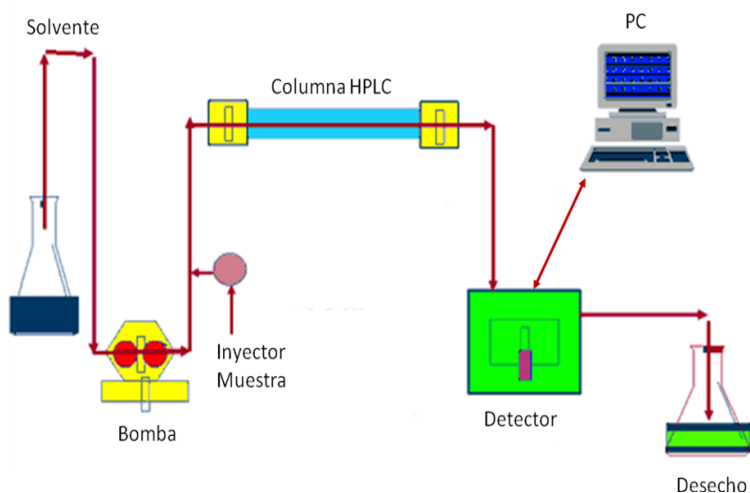


Figura 1: Representación esquemática de un sistema de HPLC.

En HPLC, el dispositivo para la introducción de la muestra (inyector), sólo se requiere para la introducción de la muestra en la fase móvil y, generalmente, se utiliza un inyector que puede ser operado manual o automáticamente. Los detectores y

columnas utilizados varían ampliamente dependiendo de los objetivos de trabajo y de las propiedades de los analitos que se quiera detectar. Los dos componentes que se encuentran directamente asociados al proceso de separación son la fase móvil y la fase estacionaria (Ardrey, 2003).

En este tipo de cromatografía líquida, la fase móvil es bombeada a alta presión para asegurar un flujo constante, a través de una columna cilíndrica, rellena con un soporte particulado al cual se encuentra unida la fase estacionaria (Fig. 2). Una pequeña cantidad de muestra líquida es inyectada en la fase móvil, que fluye hacia la columna y, a medida que la fase móvil arrastra a la muestra, los componentes individuales de la mezcla se van separando entre sí (García-Segura y col., 1996; Ardrey, 2003).

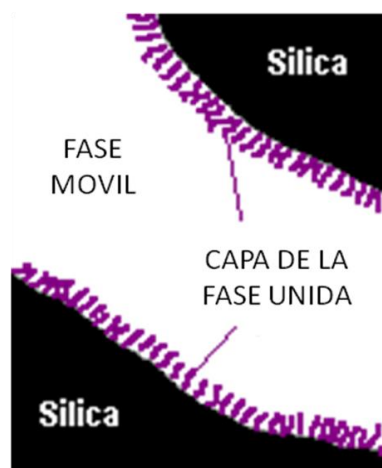


Figura 2: Esquema de la unión de la fase estacionaria al soporte, en este caso sílica gel.

La separación cromatográfica propiamente dicha ocurre cuando los componentes de una mezcla interactúan en diferentes proporciones con la fase móvil y la estacionaria (Fig. 3), moviéndose a diferentes velocidades desde la posición de introducción de la muestra hasta la posición en la cual son detectados. En este sentido, existen dos extremos hipotéticos de separación: a) todos los analitos se distribuyen totalmente en la fase móvil y no interactúan con la fase estacionaria, por lo tanto, todos ellos se mueven a la misma velocidad que la fase móvil, llegan al detector muy rápidamente y no son

separados; y b) todos los analitos se distribuyen totalmente en la fase estacionaria, no interactúan con la fase móvil y, por lo tanto, todos son retenidos en la columna y no llegan al detector. En general, la separación de los analitos presentes en una determinada mezcla de interés se encuentra entre estos dos extremos, presentando diferentes grados de distribución entre ambas fases (Katz y col., 1998; Ardrey, 2003).

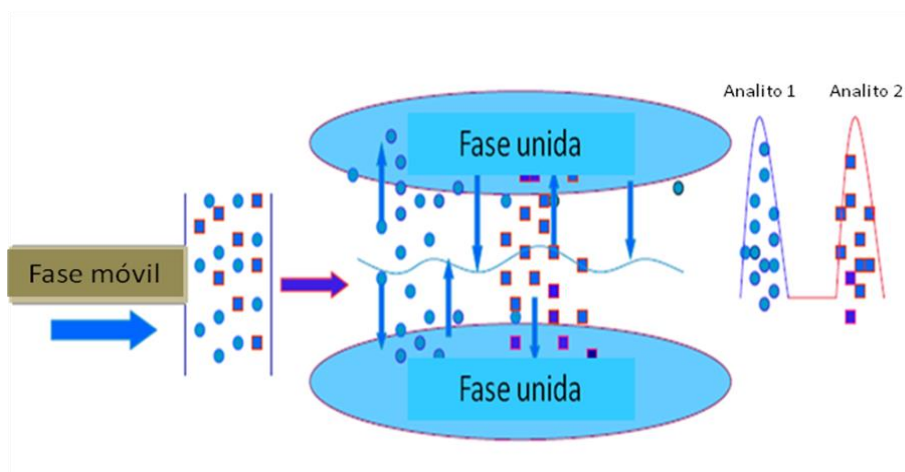


Figura 3: Esquema del proceso de partición de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil, en HPLC.

HPLC de ácidos biliares

La HPLC ha sido, y es, una de las técnicas más utilizadas para la separación y cuantificación de los ácidos biliares y sus derivados en diferentes muestras biológicas (Vertzoni y col., 2008; Wang y col., 2011; Kakiyama y col., 2014).

Uno de los primeros reportes de la aplicación de HPLC para la separación de ácidos biliares en bilis humana, fue en el año 1978 (Shaw y Elliott, 1978 en Street y col., 1983). A partir de allí, la mayoría de los trabajos ha descrito los perfiles de ácidos biliares en bilis, hígado, plasma y heces, en humanos y otras especies como ratas, ratones, conejos y peces (Hagey y col., 1993; Coca y col., 1994; Lin y col., 2000; Zhang y col., 2001; Jones y col., 2003; Yeh y col., 2003; Hagio y col., 2009).

Es una de las técnicas más poderosas y confiables para el análisis de los ácidos biliares y sus conjugados (Roda y col., 1992; Alnouti y col., 2008; Sardella y col., 2012). No obstante, en la mayoría de los trabajos en los que el objetivo fue separar ácidos biliares se suman, a la aplicación de HPLC, otras técnicas cromatográficas como TLC y GC; sin embargo, la HPLC presenta ciertas ventajas que la convierten en el método de elección. Entre ellas, se mencionan la rapidez, precisión, resolución, alta sensibilidad y especificidad (Lima y Abdalla, 2002; Peterson y Cummings, 2006).

Debido a la presencia de grupos funcionales del tipo OH en el núcleo esteroide y aniónicos en la cadena lateral, resulta difícil obtener picos definidos con un sistema de HPLC de fase normal y es necesario usar un sistema de fase reversa (Persson y col., 2007; Sjovald y col., 2010). Específicamente, la HPLC de fase reversa es el tipo de cromatografía líquida más ampliamente utilizado para el análisis de compuestos poco volátiles y polares, como los ácidos biliares (Kakiyama y col., 2006; Sjovald y col., 2010).

La principal característica de la HPLC de fase reversa es que la fase móvil es más polar que la fase estacionaria y, por lo tanto, los componentes de la muestra eluyen de la columna en base a su hidrofobicidad, número, posición y configuración de los grupos hidroxilos en el núcleo esteroide (Torchia y col., 2001; Perwaiz y col., 2001; Peterson y Cummings, 2006).

El tiempo de retención de un determinado compuesto en la HPLC de fase reversa depende de su coeficiente de partición entre la fase móvil y estacionaria. La hidrofobicidad de una molécula controla su solubilidad en la fase móvil mientras que la hidrofobicidad juega un rol importante en la interacción con la fase estacionaria. Los ácidos biliares tienen una región hidrofóbica en la cara β del núcleo esteroide, un área que es constante entre los ácidos biliares comunes. Por lo tanto, al aumentar el número

de grupos OH en la cara α de la molécula, aumenta la polaridad de la molécula y mejora la solubilidad en una fase móvil acuosa. Por otro lado, la presencia de un grupo OH β o carbonilo, reduce el área hidrofóbica de la cara β , resultando en una disminución del tiempo de retención (Shaw y col., 1980; Roda y col., 1992; Batta y col., 1992; Sakakura y col., 1998; Sjovall y col., 2010). Bajo dichas condiciones, los ácidos biliares eluirán de la columna en orden según el número decreciente de grupos hidroxilos (Robards y col., 1994; Sjovall y col., 2010).

La elección de la fase móvil dependerá no sólo del analito de interés sino también del método de detección que se utilice. Casi todos los métodos para este tipo de compuestos utilizan un gradiente de elución con un sistema de solventes binario o ternario, que se combinan de acuerdo a su polaridad según los objetivos del trabajo; de esta manera se consigue una buena separación de las diferentes clases de sustancias (Peterson y Cummings, 2006).

Detectores

En cuanto a los detectores utilizados en HPLC, existen varias clases. Sin embargo, en la actualidad, no hay disponible un método simple, sensible y directo para la identificación y la cuantificación de forma simultánea de todos los ácidos biliares individuales, presentes en diversos tejidos y fluidos (Huang y col., 2011).

Específicamente, los análisis por HPLC acoplados a un detector UV-Visible han sido ampliamente utilizados para la determinación de los ácidos biliares en distintas muestras biológicas (Mamianetti y col., 1999; Yeh y col., 2003; Natalini y col., 2006; Kakiyama y col., 2014), ya que permiten el análisis directo de ciertas clases de ácidos biliares, sin la necesidad de derivatizar las muestras. De esta forma, se favorece la disminución de los tiempos de análisis. Sin embargo, una desventaja que presenta el uso

de detectores UV, es su baja sensibilidad para la detección de ácidos biliares libres, especialmente en matrices biológicas complejas como las heces. Esto se debe, principalmente, a la falta de un cromóforo en la molécula de los ácidos biliares (Burkard y col., 2005; Alnouti y col., 2008; Griffiths y Sjoval, 2010).

En las diferentes matrices biológicas, los ácidos biliares se encuentran presentes en forma de una mezcla compleja con una amplia variedad de polaridades, debido a la presencia de formas conjugadas y libres. Es por ello que la elección del sistema de detección dependerá de la estructura de los compuestos de interés (Kakiyama y col., 2006; Alnouti y col., 2008).

El análisis simultáneo de los ácidos biliares individuales de una mezcla, presenta algunas dificultades técnicas, debido a sus estructuras químicas tan similares y complejas, a su baja absorbancia al UV, a la presencia de formas isoméricas y a una muy baja concentración en algunas matrices biológicas (Kakiyama y col., 2006; Huang y col., 2011), particularmente en las heces (Perwaiz y col., 2001; Burkard y col., 2005; Griffiths y Sjoval, 2010; Kakiyama y col., 2014).

Los ácidos biliares tienen diferentes capacidades de absorción de la luz UV, dependiendo de su estructura. Por un lado, los ácidos biliares conjugados con glicina o taurina, pueden ser analizados directamente, sin un paso previo de derivatización, utilizando los detectores UV-visible convencionales (Roda y col., 1992; Sakakura y col., 1998; Kakiyama y col., 2006). Sin embargo, para los ácidos biliares no conjugados, la detección se encuentra limitada debido a la pobre absorbancia de dichos compuestos en estas longitudes de onda, siendo de 20 a 30 veces menor que para los ácidos biliares amidados (Torchia y col., 2001; Kakiyama y col., 2006). Es por ello que, en muchos casos, se hace necesario el pretratamiento de las muestras, que involucra la extracción, purificación y derivatización, para aumentar la sensibilidad y especificidad.

En varios trabajos se ha utilizado otro tipo de detectores para el análisis de los ácidos biliares en muestras biológicas, como, por ejemplo, detectores de fluorescencia o de índice de refracción. Sin embargo, estos métodos también han mostrado ciertas limitaciones y la necesidad de un laborioso pretratamiento de las muestras. Por un lado, la necesidad de realizar complejas derivatizaciones, por ejemplo, con químicos fluorescentes (Kamada y col., 1983; Sakakura y col., 1998; Vertzoni y col., 2008). Por otro lado, en algunos trabajos se han reportado metodologías para mejorar la sensibilidad del método recurriendo a concentraciones previas de la muestra o derivatizaciones para aumentar la absorbancia al UV. Sin embargo, las derivatizaciones pueden introducir interferencias producidas por reacciones secundarias e incompletas, además de añadir complejidad al análisis y requerir largos tiempos de procesamiento (Burkard y col., 2005; Peterson y Cummings, 2006).

A pesar de que se han utilizado diversas derivatizaciones pre-columna para aumentar la detección de estos compuestos al UV, no se asegura la completa conversión de los analitos y, en general, requieren de varios y largos pasos que, finalmente, llevan a la pérdida de muestra. Es por ello que los métodos de derivatización no son los elegidos para un análisis de rutina de los perfiles de ácidos biliares en las heces (Alnouti y col., 2008; Griffiths y Sjovall, 2010).

El análisis bajo condiciones de elución en gradiente, eficiente para la separación de una mezcla compleja de analitos en tiempos cortos, se ve limitado debido a la inestabilidad de la línea de base (Kakiyama y col., 2006; Alnouti y col., 2008).

HPLC de ácidos biliares fecales

Son escasos los trabajos que reportan el análisis de ácidos biliares en heces, debido a la gran complejidad que presenta este tipo de matriz. En efecto, los patrones de

ácidos biliares fecales son complejos, debido al metabolismo bacteriano de los ácidos biliares primarios a nivel del intestino, dando lugar a compuestos mono-, di- y/o trioxi, y también formando ácidos biliares iso-(3 β -hidroxi), urso-(7 β -hidroxi) y lago-(12 β -hidroxi) (Eneroth y col., 1966a,b; Batta y col., 1999; Sjovall, 2004).

A pesar de que se ha demostrado la utilidad de esta técnica para la identificación de los ácidos biliares en distintas muestras biológicas, hasta donde se tiene conocimiento, no se ha reportado ningún trabajo en el cual se utilice la técnica de HPLC para la identificación de especies de mamíferos a través del perfil de ácidos biliares fecales.

OBJETIVOS

1. Poner a punto la técnica de HPLC para determinar el patrón de ácidos biliares fecales en las especies del Superorden Xenarthra estudiadas.
2. Determinar los parámetros de funcionamiento del sistema cromatográfico utilizado para la separación de ácidos biliares estándares.
3. Identificar, mediante HPLC, los compuestos incógnita hallados por TLC.
4. Separar, mediante HPLC, los ácidos biliares no resueltos por TLC, y corroborar su presencia en las distintas especies.
5. Cuantificar los compuestos encontrados en todas las especies estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y extracción de las muestras

Para los análisis por HPLC, además de las especies estudiadas por TLC, se sumaron muestras de dos especies de la Familia Megalonychidae, conocidos como perezosos de dos dedos, *Choloepus didactylus* y *C. hoffmanni*. Para ambas especies sólo se contaba con una hez de cada una, por ello la cantidad no fue suficiente para realizar también los análisis por TLC.

Las heces colectadas se secaron en estufa a 30°C y fueron molidas y tamizadas, para eliminar los restos de mayor tamaño y obtener el polvo de la hez.

La extracción se realizó a partir de 1 ó 2 gramos de hez en 20 mL de benceno: metanol (1:1 v/v) durante tres horas, en agitador magnético. Además, se testeó la utilización de un segundo solvente de extracción que consistió en una solución de diclorometano: metanol (1:1 v/v). Algunas de las muestras analizadas fueron extraídas con ambos sistemas de solventes para comparar su eficiencia en la recuperación de los ácidos biliares fecales. Las heces que no alcanzaron 1 gramo, fueron excluidas del análisis.

Los extractos fecales obtenidos fueron filtrados con papel de filtro, evaporados a sequedad y resuspendidos en 0,5 mL de metanol de grado HPLC (Sintorgan). Cada extracto fue agitado con la ayuda de un vortex para asegurar su completa disolución. Luego, cada extracto fue filtrado con filtros Iso-Disc™ (Supelco) descartables con membrana de PTFE (Politetrafluoroetileno) de 0,45 µm de tamaño de poro y un diámetro de 4 mm; en el caso que el extracto mostrara partículas en suspensión, se filtraba por segunda vez.

El colesterol y los ácidos biliares estándares utilizados como patrones fueron preparados en metanol de grado HPLC (Sintorgan) en una concentración de 0,1%. En los casos en que no se lograba una buena visualización de los mismos en el cromatograma, se aumentó la concentración de 0.2% a 0.4%.

Los estándares utilizados fueron los ácidos taurocólico (TCA), glicoenodeoxicólico (GCDCA), glicocólico (GCA), glicocólico sódico (GCANa), ursodeoxicólico (UDCA), cólico (CA), quenodeoxicólico (CDCA), deoxicólico (DCA), dehidrocólico (DHCA), litocólico (LCA), taurodeoxicólico (TDCA), taurolitocólico (TLCA), glicodeoxicólico (GDCA), tauroquenodeoxicólico (TCDCA) y cólico-metil-éster (CME), además del colesterol (CHOL), todos ellos de Sigma Aldrich Argentina.

Además de realizarse la corrida individual de cada compuesto estándar, se preparó una mezcla con todos los estándares utilizados, que fue inyectada con cada tanda de muestras en cada día de análisis, con el objetivo de compensar posibles desviaciones en los tiempos de retención que surgieran, tanto debido a la pérdida de eficiencia de la columna, como a las variaciones entre diferentes días.

Se realizaron tres mezclas según el tipo de compuesto, de ácidos biliares tauroconjugados, de glicoconjugados y de libres; además de combinaciones de los estándares que fueron más difíciles de resolver.

Con el objetivo de identificar cualquier pico que pudiese interferir con las muestras analizadas y que no correspondiera a las mismas, se realizaron corridas blanco con los dos sistemas de extracción, benceno: metanol (1:1 v/v) y diclorometano: metanol (1:1 v/v), y de metanol, solvente utilizado para la extracción y disolución de las muestras y estándares. En el caso de los blancos de ambos sistemas de extracción, se realizó el mismo procedimiento que con las muestras, desde la extracción por 3 horas hasta la resuspensión final en metanol.

Asimismo, se probó la utilización de otros solventes para la disolución de las muestras y estándares, tales como fase móvil (0,3% carbonato de amonio: acetonitrilo) y 100% acetonitrilo.

Equipo utilizado

El equipo utilizado fue un HPLC Thermo Finnigan (Fig. 1) perteneciente al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS. Este equipo está compuesto por un módulo degasificador de solventes on-line, una bomba de gradiente cuaternario, un módulo termostático para controlar la temperatura de la columna, un inyector manual con loop de 20 μL y un detector UV-visible con doble longitud de onda. Si bien las longitudes de onda utilizadas en este trabajo fueron de 200 y 210 nm de forma simultánea, para el análisis de las muestras se tomaron en cuenta los cromatogramas obtenidos a 210 nm, debido a que presentaron una mejor línea de base que a 200 nm.

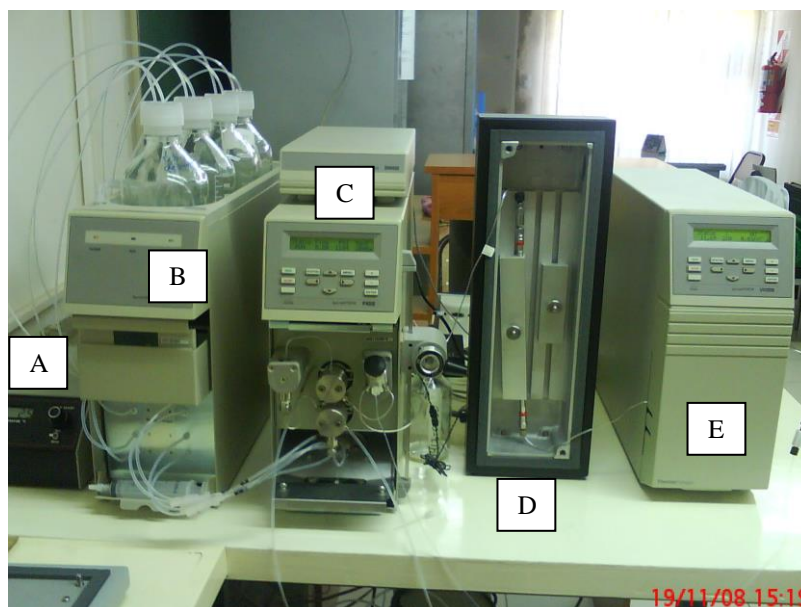


Figura 1: Equipo de HPLC: regulador de la temperatura (A), reservorio de solventes/degasificador *on-line* (B), bomba e inyector (C), columna (D) y detector (E).

El software utilizado para el análisis de los datos y el control de los parámetros físicos de los módulos del HPLC fue el *ChromQuest 4.1*.

Condiciones del análisis

Se utilizó una columna Hypersil ODS C-18 de fase reversa, de 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 μm . Asimismo, se utilizó una pre-columna Hypersil ODS C-18 de 10 mm de largo y 4 mm de diámetro interno, con las mismas características que la columna (Fig. 2). La temperatura de corrida fue de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el volumen de inyección fue de 20 μl .



Figura 2: Columna C-18 instalada en el compartimento termostatzado del HPLC.

Los solventes orgánicos utilizados fueron de grado HPLC, y se filtraron previamente con membrana de 0.45 μm .

La fase móvil consistió en una solución de carbonato de amonio (Fluka) al 0.3% en agua (Sintorgan) y acetonitrilo (Sintorgan), en una proporción de 73:27 v/v respectivamente, se utilizó el siguiente gradiente lineal, 73:27 v/v en el tiempo 0, 68:32 v/v a los 10 minutos, esta proporción se mantuvo constante hasta los 20 minutos y se llevó a 50:50 v/v a los 30 minutos). El flujo fue constante de 0.8 ml/min.

En base a los resultados preliminares, se fueron modificando las condiciones y tiempo de corrida. Para los compuestos más retenidos y difíciles de eluir de la columna,

se modificó la fuerza de la fase móvil, que fue aumentando gradualmente desde el minuto 30 hasta los 60 minutos, esto se logró aumentando la proporción del acetonitrilo desde un 50% a un 100%.

Análisis de los datos

En cada cromatograma obtenido se utilizaron los siguientes parámetros para el análisis de los picos: el tiempo de retención (T_r), expresado en minutos, que se define como el tiempo que tarda un determinado compuesto en eluir de la columna; el área (A) bajo los picos, expresada en unidades de absorbancia (mAU), que es proporcional a la cantidad de compuesto presente en la muestra; y el ancho de los picos (Fig. 3), medido a la línea de base (W). Posteriormente se calcularon los parámetros de eficiencia del sistema cromatográfico.

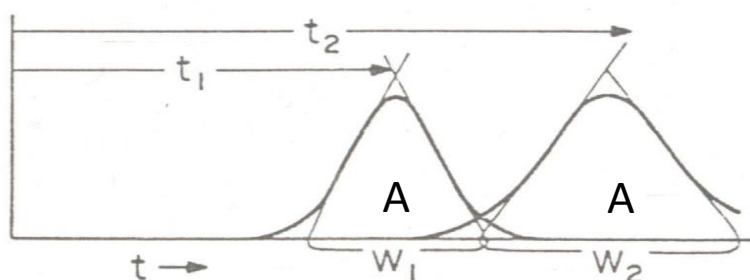


Figura 3: Esquema que muestra el cálculo de los anchos de dos picos consecutivos, medidos a la base (W_1 y W_2), donde t_1 y t_2 son los tiempos de retención.

Se determinó el T_r para cada compuesto estándar en las mismas condiciones de corrida que las muestras incógnitas. Los picos presentes en las muestras de las diferentes especies fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los correspondientes a los estándares presentes en la mezcla (considerando una ventana de tiempo igual al $T_r \pm 5\%$), inyectada en las mismas condiciones el mismo día.

Se construyeron las curvas estándares que se utilizaron para cuantificar.

Parámetros de funcionamiento del método

Un método analítico debe contar con ciertas características en su rendimiento para ajustarse al objetivo de trabajo. En este trabajo, los parámetros más importantes que caracterizan el funcionamiento y la validez del método son: resolución, eficiencia de la columna, precisión y rango de linealidad.

Resolución

Para establecer la validez del sistema utilizado para la separación de los ácidos biliarios se calculó la resolución, R_s , entre pares de picos adyacentes, o los llamados “pares críticos”. El R_s se calculó según la siguiente fórmula (Ardrey, 2003):

$$R_s = 2*d/(W_1+W_2)$$

Donde $d = T_{r2}-T_{r1}$, es decir, la diferencia entre el tiempo de retención del segundo pico y el tiempo de retención del pico anterior; W_1 y W_2 son los anchos de ambos picos, medidos en la línea de base de los mismos.

Dos picos están resueltos en un 98% si $R_s = 1$, y en un 99.7% si $R_s = 1.5$, y en este último caso se obtiene la separación a la línea de base. Cualquier valor por encima de $R_s = 1.5$ indicará una separación del 100% (Quattrocci y col., 1992; Ardrey, 2003).

Eficiencia

La eficiencia de la columna es la capacidad de un sistema cromatográfico para producir picos agudos. Los picos resultan más agudos cuando la dispersión de los componentes de la muestra es mínima a medida que pasan a través de la columna (el

ensanchamiento de banda es mínimo). Viceversa, un sistema que produce picos anchos, tiene baja eficiencia.

La eficiencia de la columna se mide como el Número de Platos Teóricos (N) del sistema (Quattrocci y col., 1992). Un sistema que produce picos agudos (buena eficiencia) tiene un alto número de platos teóricos. Un sistema que produce picos anchos (pobre eficiencia) tiene un pequeño número de platos teóricos. Por lo tanto, N es la medida de la capacidad de la columna para formar picos agudos.

La eficiencia a menudo se expresa como platos teóricos por metro. Esto es, el valor de N dividido por la longitud de la columna en metros (0.25 m en el caso de la columna utilizada en este trabajo).

Se calculó el Número de Platos Teóricos (N) para cada estándar de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = 16*(T_r/W)^2$$

Donde T_r es el tiempo de retención expresado en minutos y W es el ancho del pico, expresado en minutos, medido a la línea de base, para un compuesto determinado.

Otro parámetro que se utiliza frecuentemente para expresar la eficiencia de la columna es la Altura Equivalente del Plato Teórico (HEPT), que expresa la altura de cada estado de equilibrio o plato teórico dentro de la columna; cuanto mayor es el número de platos teóricos que hay en una columna, menor es HEPT y, por lo tanto, mayor la eficiencia.

La HEPT se calculó, para cada estándar utilizado, según la siguiente fórmula:

$$HEPT = L/N$$

Donde L es la longitud de la columna en metros (0.25 m) y N es el número de platos teóricos para un determinado compuesto y en determinadas condiciones de corrida. Por razones prácticas, la HEPT se expresó en milímetros (mm).

Precisión

La precisión de un método expresa lo mucho que coinciden (grado de diseminación) una serie de mediciones obtenidas del análisis múltiple de la misma muestra homogénea, bajo condiciones preestablecidas.

La precisión se describe en términos de su repetibilidad a corto plazo (r), y representa la precisión que puede alcanzar un mismo analista en un único laboratorio en días diferentes, pero dentro de un periodo de tiempo relativamente corto. Se expresa como el porcentaje del desvío estándar relativo (%RSD) al promedio de un número representativo de corridas de estándares, llevadas a cabo con una misma columna en un período corto de tiempo.

Se calculó el %RSD como el desvío estándar relativo al promedio de las áreas absolutas obtenidas en tres corridas de estándares de ácidos biliares en tres días consecutivos.

Rango de linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Asimismo, se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación de una curva estándar (Quattrocci y col., 1992).

Para ello, se construyeron las curvas de calibrado para los estándares utilizados. Las soluciones de cada estándar fueron preparadas en metanol de grado HPLC. Las curvas fueron construidas en el rango de concentraciones de 5-320 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ($n=4$) para los ácidos biliares libres, y en un rango de 0.5-20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ($n=4$) para los ácidos biliares conjugados, graficándose el área del pico de cada compuesto de manera individual como una función de su concentración. Para construir dichas curvas, se prepararon mezclas de estándares para cada una de las concentraciones indicadas. Las mezclas fueron las siguientes: 1) GCA, GDCA y GCDCA, 2) TCA, TDCA y TLCA, 3) DHCA, CA, UDCA, CDCA y LCA.

Se obtuvieron las ecuaciones de regresión para todos los estándares a través de un análisis de regresión lineal, aplicado al área del pico como una función de la concentración de cada compuesto. Los coeficientes de correlación lineal deben ser iguales o mayores a 0.95. Se calculó el factor de respuesta para cada estándar como la relación *área/concentración* (Fig. 4).

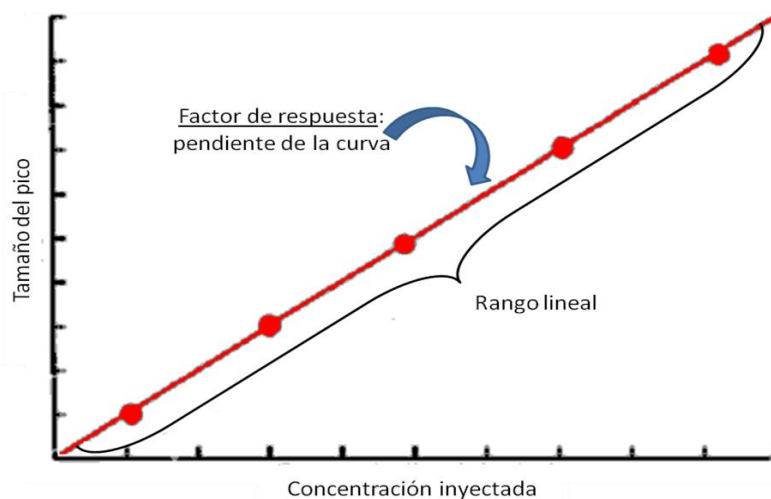


Figura 4: Esquema de una curva de calibrado donde se muestra el factor de respuesta y el rango lineal.

Cuantificación

Cada uno de los compuestos presentes en las muestras, cuyos Tr coincidieron con los estándares utilizados, se cuantificaron reemplazando sus áreas absolutas en las ecuaciones de las curvas de calibrado de los correspondientes estándares.

Se calculó la media \pm DE de la cantidad de cada compuesto, expresada en mg/g hez, para todos los individuos de una misma especie.

RESULTADOS

Resolución y determinación de los Tr de los estándares de ácidos biliares

Se obtuvieron los tiempos de retención de los 16 compuestos utilizados como estándares, 15 ácidos biliares y colesterol, de forma individual.

En la Tabla 1 se muestra el intervalo calculado al 5% para los tiempos de retención de los estándares, obtenidos a 210 nm, expresado en minutos.

Compuesto	Intervalos 5% Tr
DHCA	4.353-4.811
UDCA	7.565-8.361
CA	8.496-9.390
GCA/GCANA	10.385-11.479
TCA	12.638-13.968
CDCA	18.411-20.349
DCA	20.050-22.160
GCDCA	21.349-23.597
GDCA	23.378-25.838
TCDCA	24.157-26.699
TDCA	25.030-27.664
LCA	28.251-31.225
CHOL/CME	29.431-32.529
TLCA	30.115-33.285

Tabla 1: Intervalos del 5% de los tiempos de retención (Tr) de los estándares, expresados en minutos.

La separación de los ácidos biliares estándares, tanto conjugados como libres, y del colesterol, ocurrió en un tiempo menor a los 32 minutos (Fig. 1).

Todos los estándares utilizados mostraron absorbancia a las dos longitudes de onda del ultravioleta utilizadas, 200 y 210 nm, siendo entre 2 y 3 veces mayor a 200 nm (Tabla 2). Los cromatogramas obtenidos a partir de la mezcla de estándares a 200 y 210 nm, mostraron que las áreas de los picos son mayores a 200 nm para todos los estándares (Fig. 1). La absorbancia para los ácidos biliares tauroconjugados fue mayor que para sus correspondientes glicoconjugados (Tabla 2); así, el área absoluta del GCA obtenida a 200 nm supera a la correspondiente del TCA en 2.8 veces; el área absoluta

del GDCA resultó ser 1.5 veces mayor que la del TDCA y el área del GCDCA fue 3.3 veces mayor que la del TCDCA (Tabla 2).

Compuesto	Absorbancia (mUA)	
	200 nm	210 nm
DHCA	2325079	2487489
UDCA	8845535	3246478
CA	46325542	27154452
GCA/GCANA	35145293	16104870
TCA	12462493	3734913
CDCA	6051333	1841546
DCA	6938530	2281022
GCDCA	30162089	11554352
GDCA	24725120	9539747
TCDCA	8973682	2699411
TDCA	16525554	4711551
LCA	8670754	2986192
CHOL/CME	1972146	576921
TLCA	11079821	4960487

Tabla 2: Absorbancia de los estándares utilizados a 200 y 210 nm expresadas como las áreas absolutas obtenidas (mUA).

De los 16 estándares utilizados en la mezcla, dos pares no pudieron ser totalmente resueltos. En primer lugar, el CME no pudo ser resuelto del colesterol, ya que ambos presentaron el mismo tiempo de retención (30.88 minutos) a ambas longitudes de onda (Fig. 1). Lo mismo sucedió en el caso de los ácidos biliares GCA y GCANA, que co-eluyeron en todas las corridas realizadas con un tiempo de retención conjunto de 10.13 minutos a 200 y 210 nm (Fig. 1). Por este motivo, de aquí en adelante se hará referencia únicamente al GCA, sin tomar en cuenta la sal sódica correspondiente.

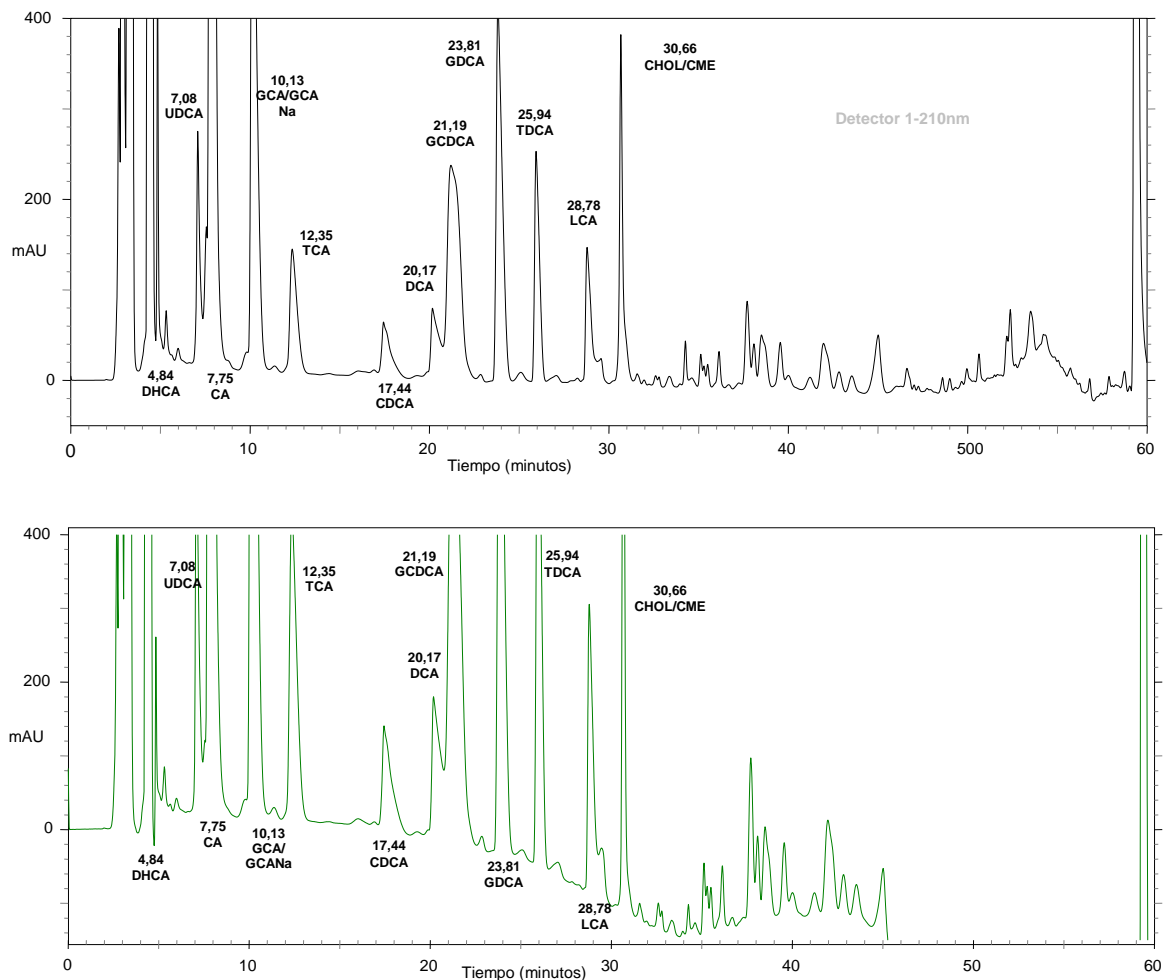


Figura 1: Cromatogramas obtenidos a partir de la mezcla de estándares a 210 nm (cuadro superior) y a 200 nm (cuadro inferior).

Efecto de los grupos conjugados y del patrón de hidroxilación sobre el orden de elución de los estándares

Las formas no conjugadas de cada ácido biliar eluyeron antes que las conjugadas con glicina y, a su vez, estas eluyeron antes que las conjugadas con taurina. Así, por ejemplo, el DCA tuvo un tiempo de retención de 20.17 minutos, el GDCA 23.81 minutos y el TDCA de 25.94 minutos (Fig. 1).

El tiempo de elución de los compuestos disminuyó en función al aumento del número de grupos OH presentes en el núcleo esteroide (Fig. 1). En la Tabla 3 se

muestra el número de grupos OH para cada compuesto y la posición de los mismos en la molécula. Los primeros compuestos en eluir fueron los ácidos biliares con tres grupos hidroxilos como el TCA, luego los ácidos dihidroxilados y finalmente, los monohidroxilados (Fig. 1 y 3). Los compuestos más retenidos en la columna, es decir con mayores tiempos de elución, fueron los ácidos biliares menos polares como el LCA y TLCA, además del colesterol (Fig. 2).

Compuesto	Posición y orientación de los grupos OH	Nº grupos OH
CA	3 α ,7 α , 12 α	3
GCA	3 α ,7 α , 12 α	3
GCANa	3 α ,7 α , 12 α	3
TCA	3 α ,7 α , 12 α	3
CME	3 α ,7 α , 12 α	3
DHCA	3 α ,7 α , 12 α	3
DCA	3 α , 12 α	2
CDCA	3 α ,7 α	2
GDCA	3 α , 12 α	2
GCDCA	3 α ,7 α	2
UDCA	3 α ,7 β	2
TDCA	3 α , 12 α	2
TCDCA	3 α ,7 α	2
LCA	3 α	1
TLCA	3 α	1
CHOL	3 β	1

Tabla 3: Nombre, número, orientación y posición de los grupos hidroxilos (OH) en el núcleo esteroide para cada compuesto estándar utilizado.

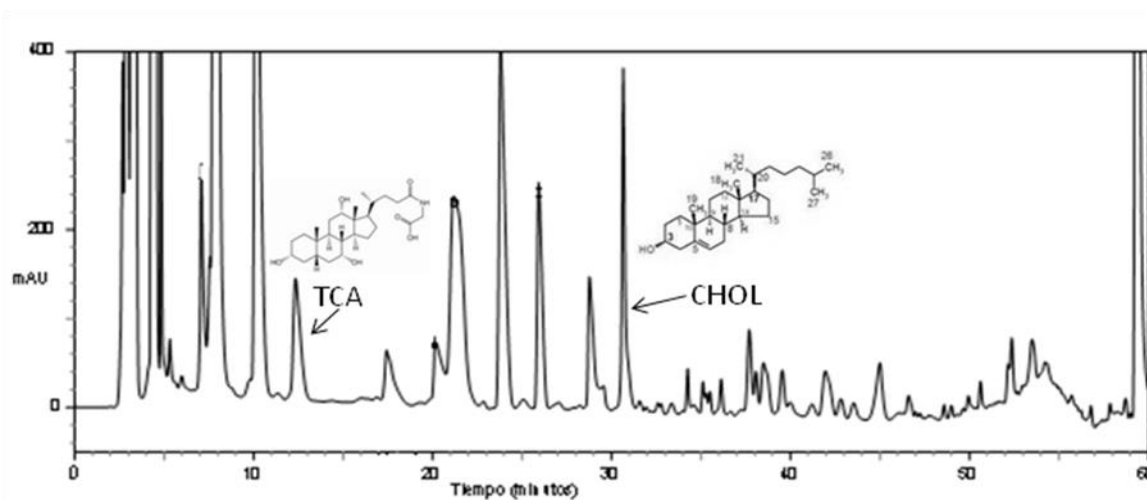


Figura 2: Cromatograma obtenido a partir de la mezcla de estándares donde se muestran dos ejemplos de compuestos con diferente patrón de hidroxilación: TCA con 3 grupos OH (menor Tr) y CHOL con 1 grupo OH (mayor Tr).

Los ácidos biliares no conjugados, tales como el DCA, CDCA y CA, fueron los más difíciles de detectar y, por lo tanto, los picos obtenidos, tanto a 200 como a 210 nm, resultaron más pequeños que para los ácidos biliares conjugados.

Análisis de los cromatogramas de los solventes usados como blancos

El solvente que resultó más eficiente para la disolución y resuspensión de las muestras y estándares fue el metanol, obteniéndose una mayor recuperación de los compuestos. También, se probó con acetonitrilo y fase móvil, sin obtener buenos resultados, no lográndose la completa disolución de los compuestos presentes en las muestras. Bajo estas condiciones de operación, la repetibilidad del análisis en términos de tiempos de retención y áreas entre diferentes corridas, resultó satisfactoria, permitiendo una correcta identificación y cuantificación de los ácidos biliares. En los cromatogramas obtenidos se observaron picos agudos y simétricos, indicando una alta eficiencia del sistema cromatográfico utilizado (Fig. 1, 2).

Para descartar la presencia de interferencias provenientes de los solventes utilizados en la preparación de la muestra y la fase móvil, se inyectaron blancos de solventes (Fig. 3). En el cromatograma correspondiente al blanco de metanol, se puede observar un pico característico de este compuesto, a los 4.318 minutos y hacia el final de la corrida pueden observarse varios picos entre los 45 y 60 minutos (Fig. 3, a), que no se superponen con ninguno de los estándares utilizados.

Por otro lado, en el cromatograma correspondiente a la mezcla de benceno: metanol (1:1 v/v) no se observa ningún pico que pudiera interferir con la correcta identificación de los compuestos en estudio, apareciendo los picos característicos del metanol (Fig. 4, b).

Finalmente, en el cromatograma obtenido a partir de la mezcla de diclorometano: metanol (1:1 v/v) se puede observar, si bien no hay picos mayoritarios en los tiempos correspondientes a los estándares, un pico pequeño cercano al minuto 12 (Fig. 3, c).

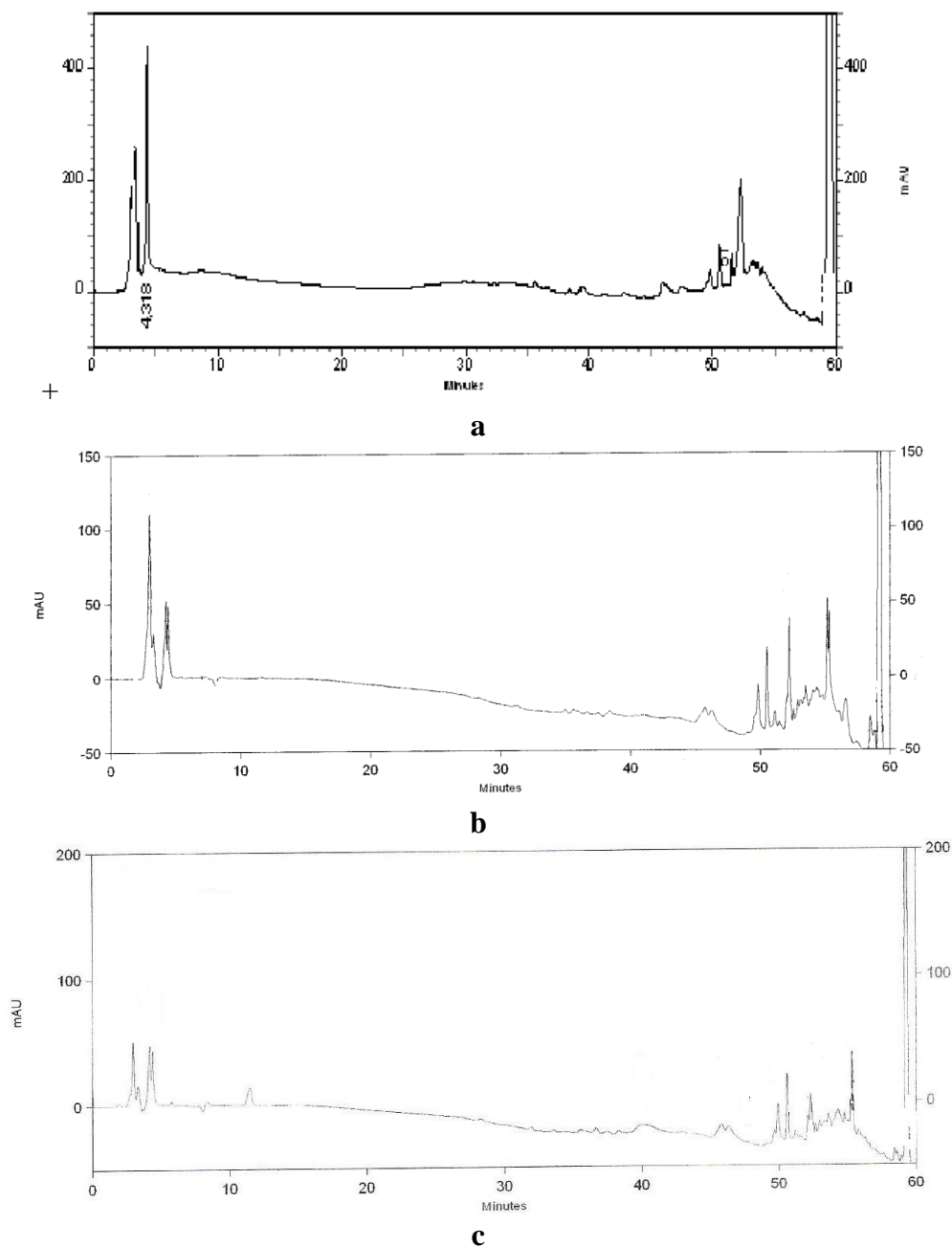


Figura 3: Cromatogramas obtenidos a partir del blanco de metanol (a), benceno: metanol (1:1 v/v) (b) y diclorometano: metanol (1:1 v/v) (c).

Performance del método cromatográfico

Resolución

Los valores de resolución (R_s) calculados para los pares de estándares críticos se muestran en la Tabla 4. Para los pares de estándares CA/GCA, TCA/GCA, GDCA/GCDCA, GDCA/TDCA y CDCA/DCA la resolución fue del 99.7% ($R_s > 1.5$), que representa una óptima separación a la línea de base. Los valores más bajos se obtuvieron para los pares CA/UDCA y CHOL-CME/TLCA, ambos menores a 1, indicando una resolución menor al 98%.

Pares	R_s
CA/GCA	1.72
CA/UDCA	0.87
TCA/GCA	1.57
GCDCA/DCA	1.47
GDCA/GCDCA	1.86
GDCA/TDCA	1.62
LCA/CHOL-CME	1.05
CDCA/DCA	3.88
CHOL-CME/TLCA	0.63

Tabla 4: Valores de resolución (R_s) para los pares críticos de compuestos estándares.

Eficiencia

El número de platos teóricos (N) para cada compuesto estándar varió entre 881.41 y 44946.97, para el CA y LCA, respectivamente (Tabla 5). Valores de N elevados también se observaron para los compuestos: CHOL/CME y TLCA, y valores bajos para los compuestos GCA y TCA (Tabla 5).

Asimismo, se calculó la Altura Equivalente del Plato Teórico (HEPT) para cada estándar utilizado expresada en milímetros (mm) (Tabla 5). Los valores más bajos de HEPT se obtuvieron para los compuestos CHOL/CME y LCA, con una altura de 1 mm; y los más altos para los estándares CA (34 mm), GCA y TCA (ambos con 28 mm) (Tabla 5).

Compuestos	N	HEPT (mm)
DHCA	1206.94	21
UDCA	1497.02	25
CA	881.41	34
GCA	974.99	28
TCA	1111.54	28
CDCA	3449.21	8
DCA	14845.35	7
GCDCA	5720.62	6
GDCA	9086.09	4
TDCA	15112.34	2
LCA	44946.97	1
CHOL/CME	36914.85	1
TLCA	26437.55	2

Tabla 5: Número de platos teóricos (N) y altura equivalente de los platos teóricos (HEPT) para los estándares utilizados.

Precisión

La desviación estándar relativa de las áreas absolutas (%RSD) de todos los estándares fue menor al 10% (3 repeticiones de cada estándar), excepto para algunos ácidos biliares no conjugados como el DHCA, UDCA, CDCA y LCA que presentaron valores de entre el 10% y el 20% (Tabla 6). Debido a la baja absorbancia de dichos ácidos biliares al UV, y a que las áreas obtenidas son pequeñas, existe un mayor error al cuantificar las mismas.

Compuesto	%RSD
DHCA	10.8
UDCA	18.4
CA	7.9
GCA	5.9
TCA	7.0
CDCA	12.1
GCDCA	4.2
GDCA	5.2
TDCA	4.4
LCA	9.9
CHOL/CME	5.0

Tabla 6: Valores de la desviación estándar relativa de las áreas absolutas, expresada en porcentaje (%RSD) para los estándares utilizados (n=3).

Linealidad, curvas de calibrado

Para los estándares utilizados se realizaron las curvas de calibrado con cuatro niveles de concentraciones (Tabla 7, Figs. 4, 5 y 6). Tanto el CHOL/CME como el DCA fueron excluidos de este análisis, en el primer caso debido a que ambos no pudieron resolverse y, en el segundo, debido a la baja absorbancia del DCA al UV.

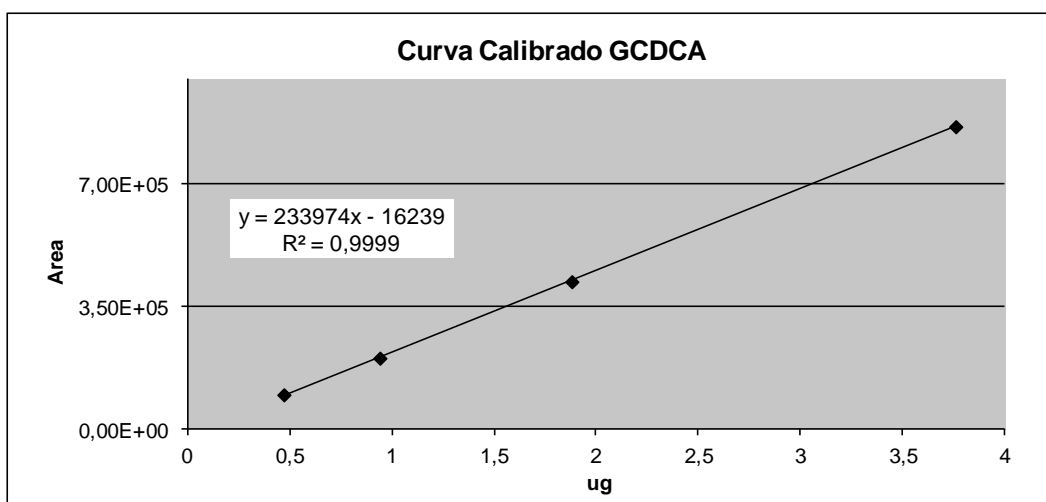
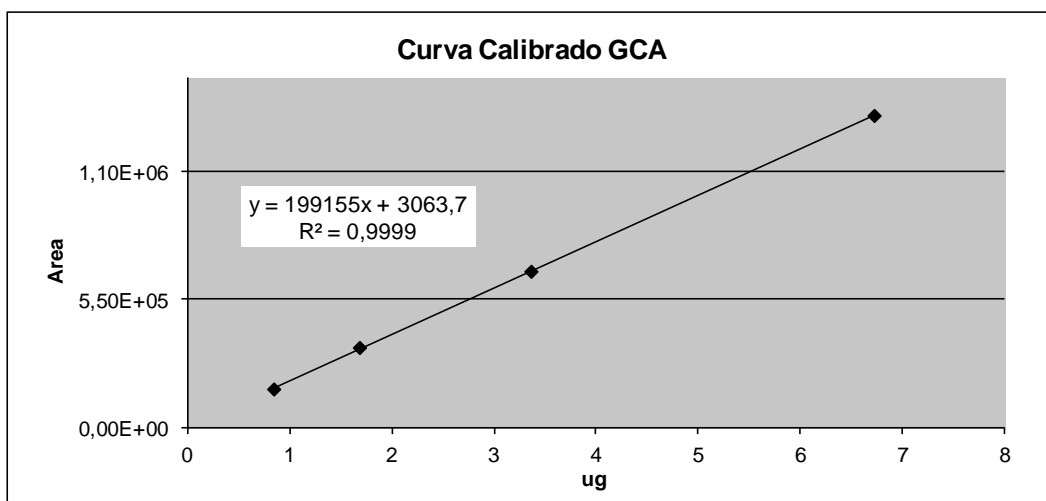
En todos los casos, las curvas de calibrado obtenidas tuvieron coeficientes de correlación lineal (R^2) mayores a 0.95 (Tabla 8).

Compuesto	Tr (minutos)	C ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)	A (mUA)	A/C
TCA	14.443	2	219583	109791.5
	14.292	4	438161	109540.3
	14.052	8	787191	98398.9
	13.932	16	1570121	98132.6
TDCA	27.032	2.075	296372	142829.9
	26.907	4.15	628812	151521.0
	26.892	8.3	1168381	140768.8
	26.845	16.6	2231488	134427.0
TLCA	31.180	2.5	378330	151332.0
	31.060	5	788773	157754.6
	31.103	10	1404409	140440.9
	31.100	20	2640670	132033.5
GCA	12.018	0.84	165592	197133.3
	11.623	1.68	343841	204667.3
	11.392	3.36	671262	199780.4
	11.370	6.72	1340912	199540.5
GCDCA	23.352	0.47	96905	206180.9
	23.017	0.94	201829	214711.7
	22.923	1.88	420873	223868.6
	22.843	3.76	864951	23004.2
GDCA	25.567	0.8	184041	230051.3
	25.295	1.6	378825	236765.6
	25.233	3.2	760729	237727.8
	25.148	6.4	1531918	239362.2
DHCA	4.752	15	1601277	106751.8
	4.705	30	3114994	103833.1
	4.698	60	6622709	110378.5
	4.708	120	14170416	118086.8
UDCA	8.352	40	649995	16249.9
	8.042	80	1304275	16303.4
	7.912	160	2965158	18532.2
	7.822	320	6026484	18832.8
CA	9.492	10	181847	18184.7
	9.177	20	397504	19875.2
	9.077	40	1025284	25632.1
	9.012	80	2425634	30320.4
CDCA	20.447	5	95770	19154.0
	19.987	10	191658	19165.8
	19.757	20	405071	20253.6
	19.705	40	823993	20599.8
LCA	30.078	40	808001	20200.0
	29.843	80	1559223	19490.3
	29.698	160	3341670	20885.4
	29.765	320	6504468	20326.5

Tabla 7: Datos de las curvas de calibrado de los estándares utilizados. Se muestra el tiempo de retención (Tr) expresado en minutos, la concentración (C) en $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$, el área (A) en mUA y el factor de respuesta expresado como área/concentración (A/C).

Compuesto	Ecuación	R ²
TCA	$y = 95638x + 36480$	0.999
TDCA	$y = 13176x + 55984$	0.999
TLCA	$y = 12734x + 10915$	0.998
GCA	$y = 19915x + 3063,7$	0.999
GCDCA	$y = 23397x - 16239$	0.999
GDCA	$y = 24051x - 7657,9$	1
DHCA	$y = 12063x - 40854$	0.998
UDCA	$y = 19377x - 17011$	0.999
CA	$y = 32590x - 21454$	0.996
CDCA	$y = 20901x - 12764$	0.999
LCA	$y = 20460x - 15629$	0.999

Tabla 8: Ecuaciones de las curvas de calibrado y coeficientes de regresión lineal (R²) calculados para los estándares utilizados.



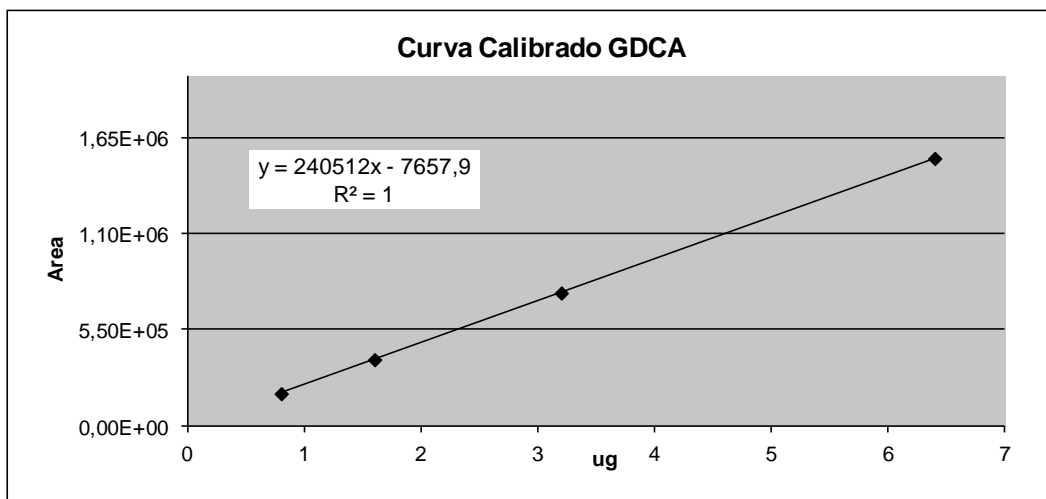
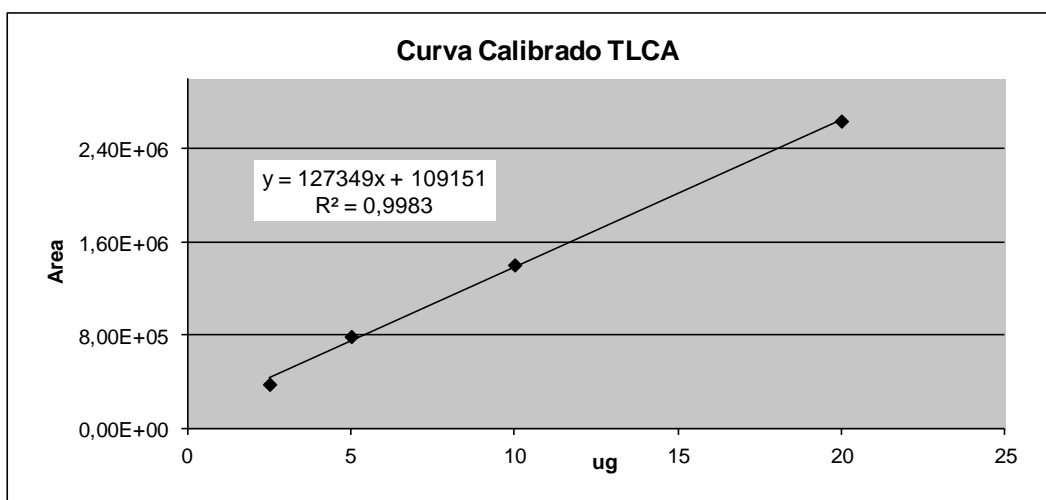
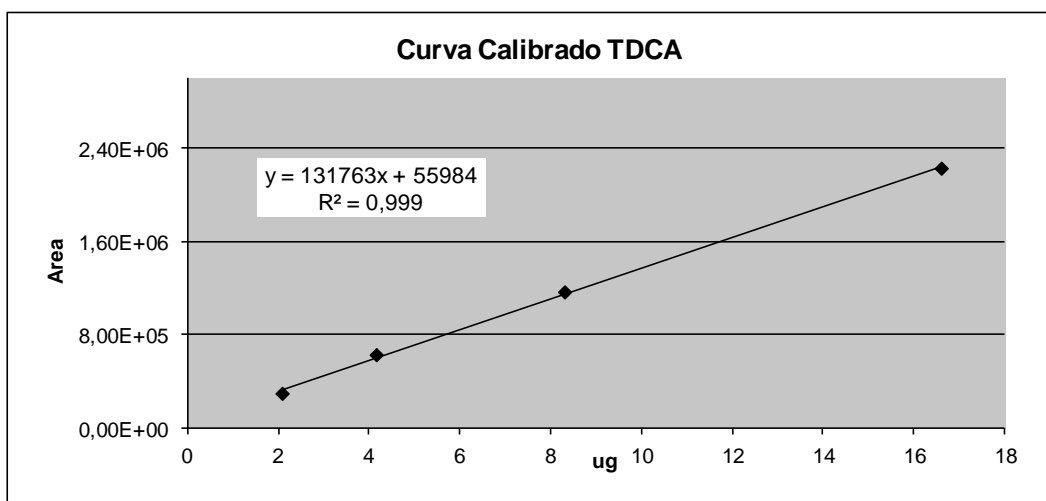


Figura 4: Curvas de calibrado para los estándares glicoconjugados GCA, GCDCA y GDCA.



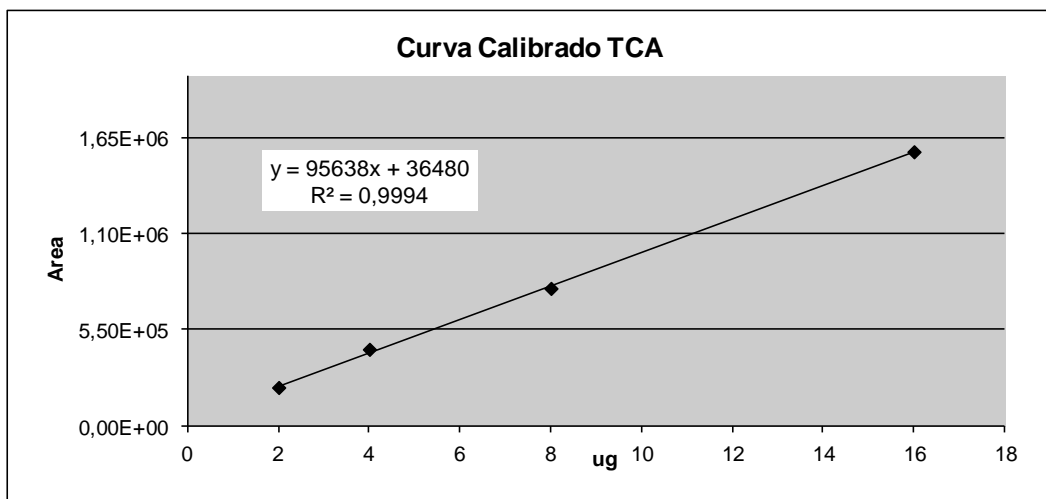
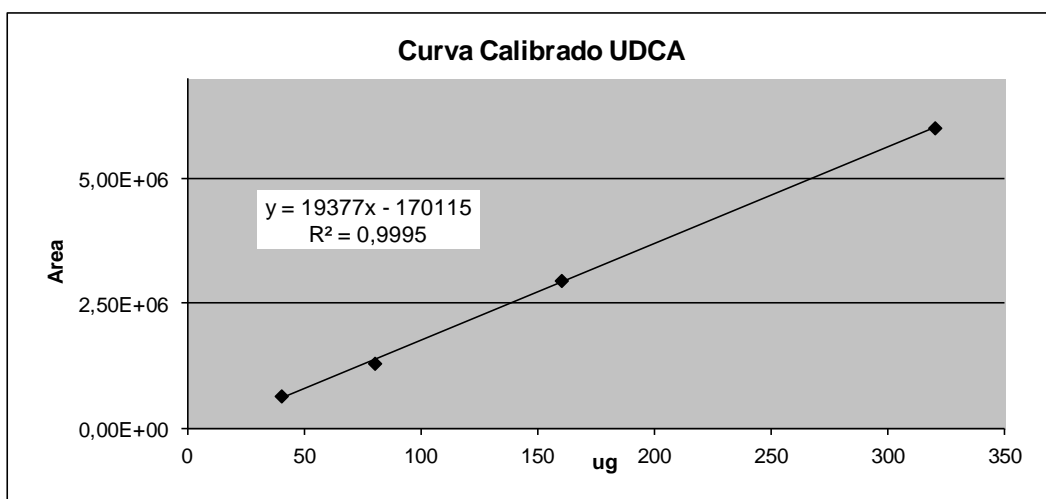
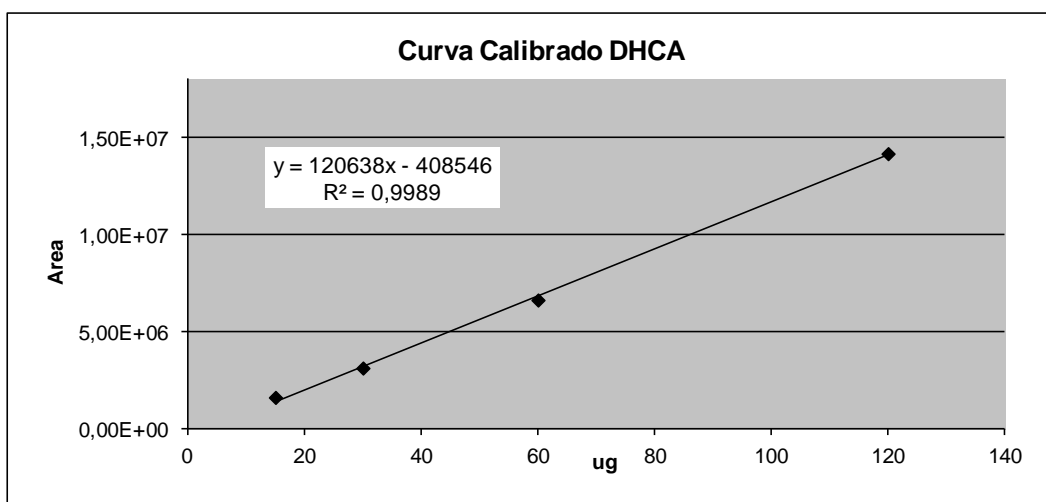


Figura 5: Curvas de calibrado para los estándares tauroconjugados TDCA, TLCA y TCA, donde se muestran las ecuaciones y los coeficientes de regresión lineal.



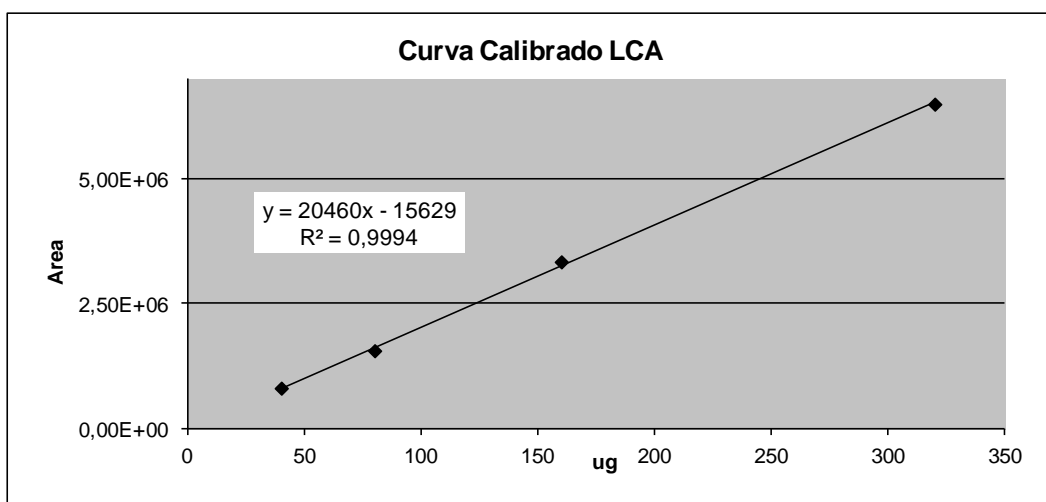
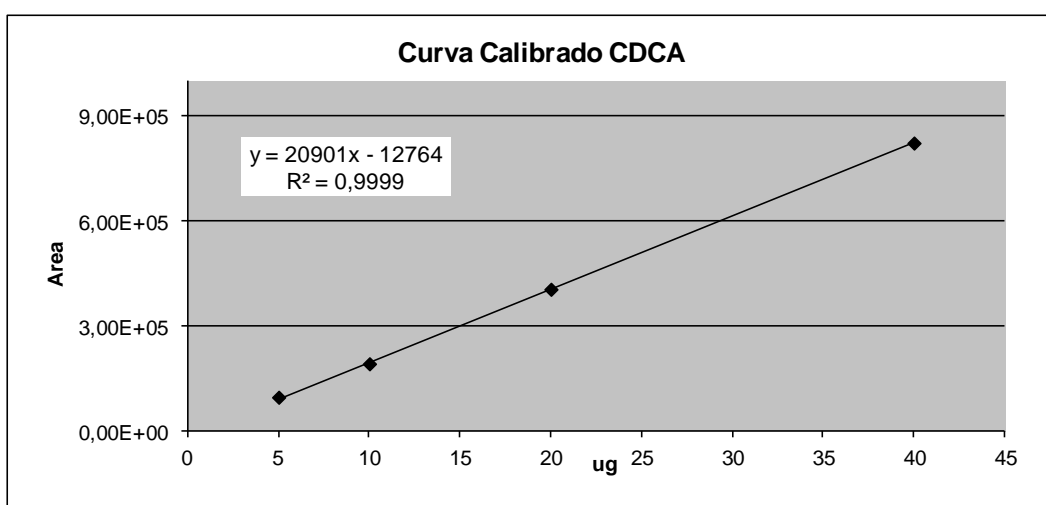
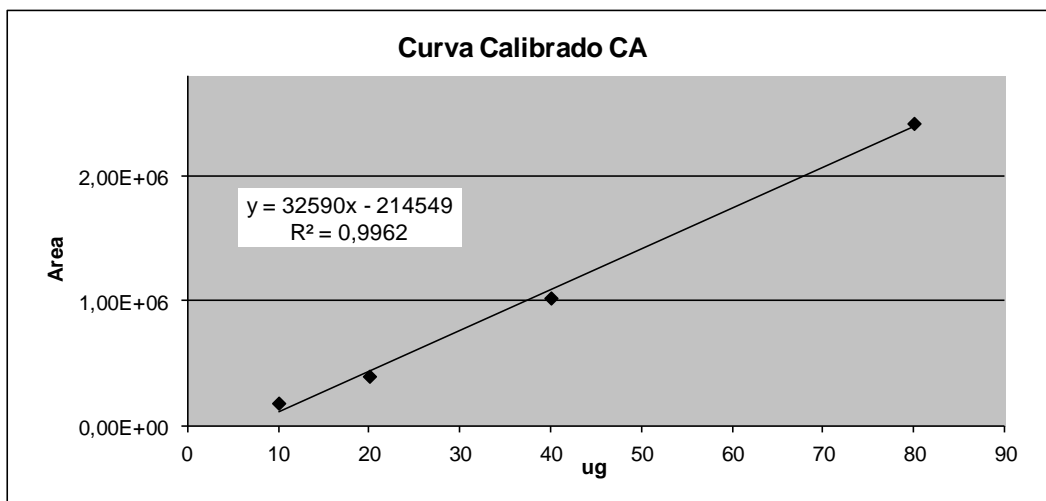


Figura 6: Curvas de calibrado para los estándares no conjugados, DHCA, UDCA, CA, CDCA y LCA donde se muestran las ecuaciones y los coeficientes de regresión lineal.

Los tiempos de retención de cada una de las diluciones sucesivas inyectadas fueron muy similares entre sí, y dentro de los rangos establecidos para cada estándar, evidenciando una muy buena repetibilidad del método (Fig. 7).

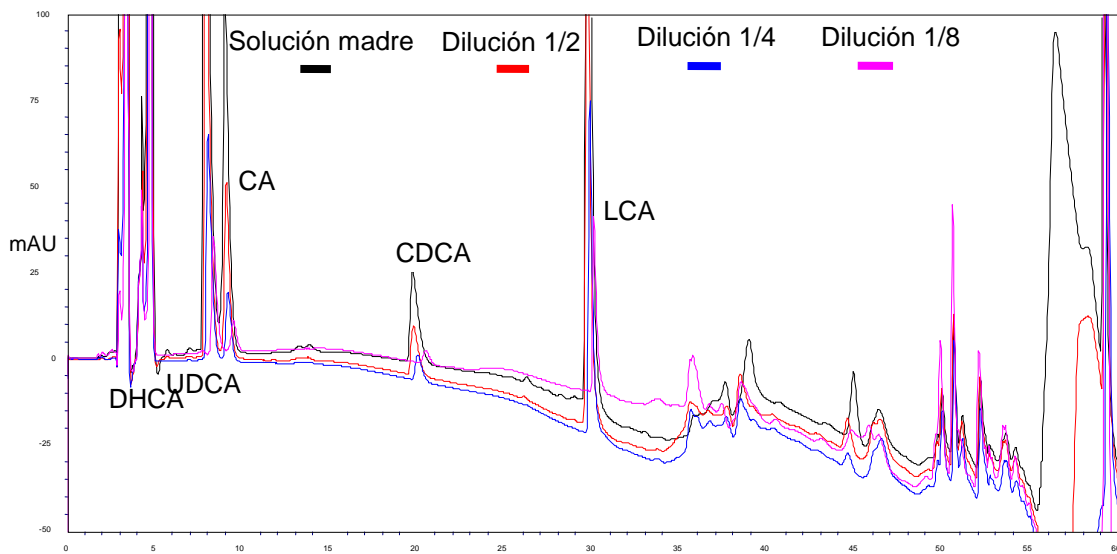
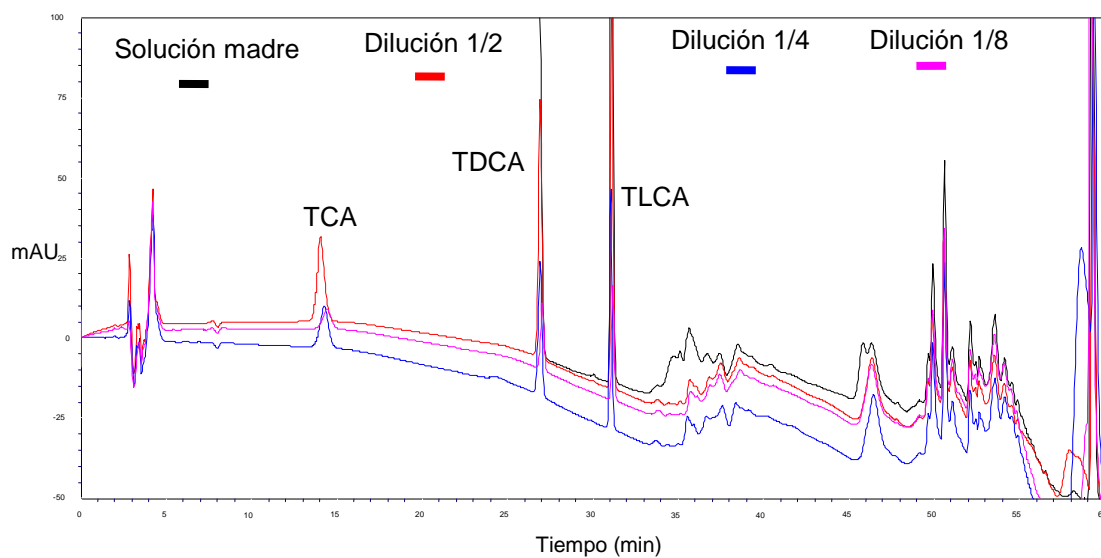
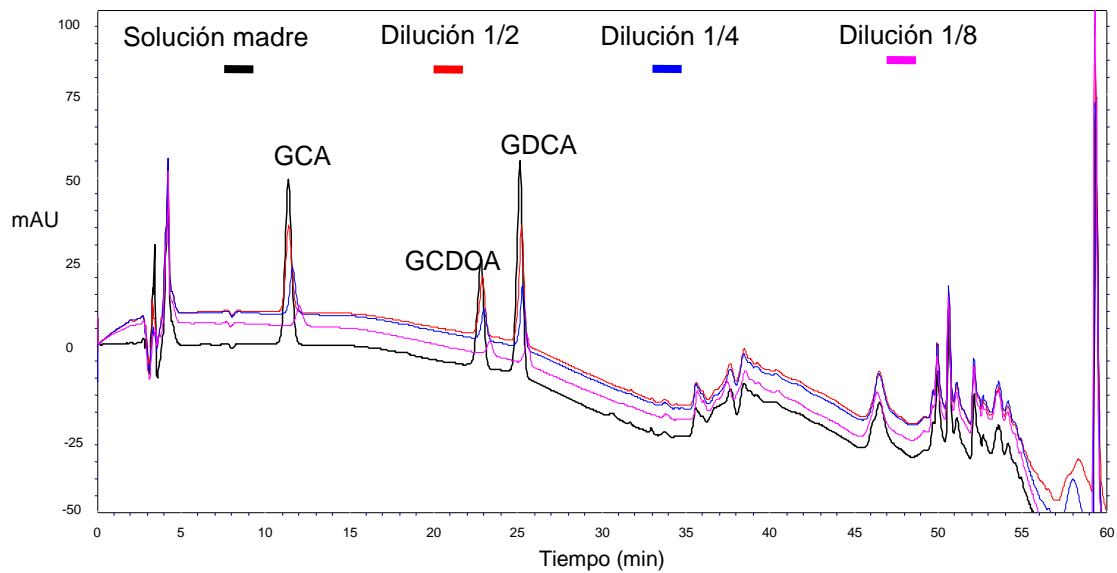


Figura 7: Cromatogramas correspondientes a las mezclas de estándares para las curvas de calibrado. Glicoconjugados (arriba), tauroconjugados (medio) y libres (abajo). Los colores muestran las cuatro diluciones utilizadas para la construcción de las curvas.

Patrón de ácidos biliares fecales

Se establecieron los patrones de ácidos biliares fecales de todas las especies estudiadas (Tabla 9), los que resultaron coincidentes para distintas muestras de la misma especie y diferentes entre todas las especies.

Asimismo, no se hallaron diferencias entre machos y hembras (Fig. 8), ni entre individuos de cautiverio y silvestres de una misma especie (Fig. 9), excepto en la concentración relativa de algunos compuestos, sin verse alterado el patrón de presencia de ácidos biliares.

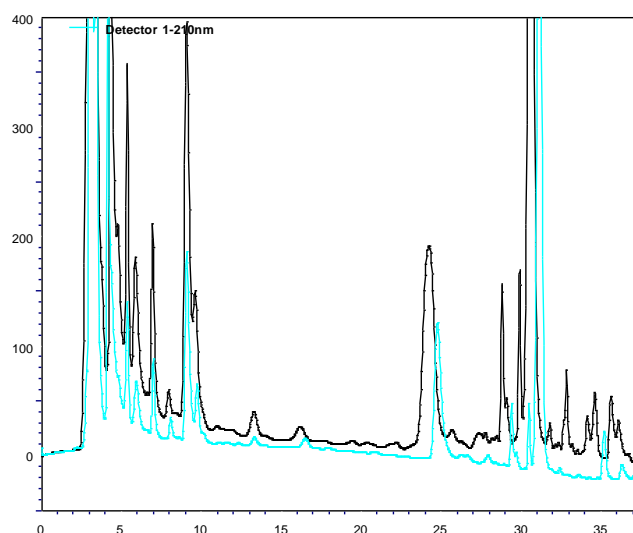


Figura 8: Cromatogramas pertenecientes a dos individuos de *T. tetradactyla*, una hembra (negro) y un macho (verde).

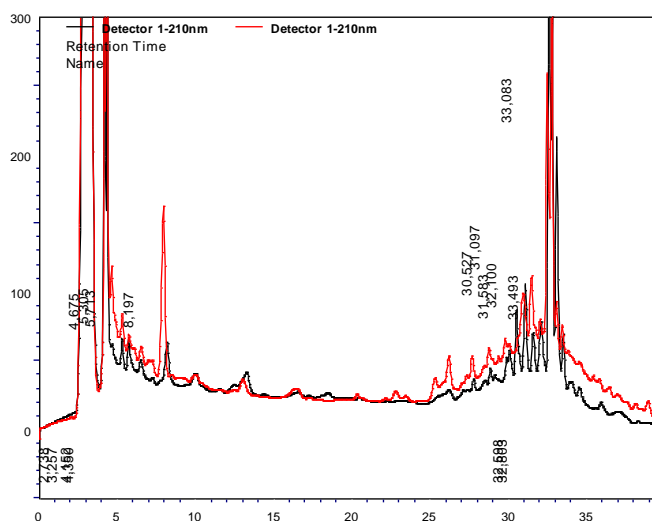


Figura 9: Cromatogramas pertenecientes a dos individuos de *D. hybridus*, de cautiverio (rojo) y silvestre (negro).

Se encontró un total de 20 compuestos, de los cuales 13 correspondieron a los ácidos biliares DHCA, UDCA, CA, GCA, TCA, CDCA, DCA, GCDCA, GDCA, TCDCA, TDCA, LCA y TLCA, seis no pudieron ser identificados, es decir, sus Tr no coincidieron con ningún estándar utilizado, por lo que se denominaron Ni1-Ni6 (no identificado 1 a no identificado 6), y el restante correspondió al colesterol (Tabla 9). Un 90% o más de ácidos biliares presentes en los perfiles son del tipo VI, es decir con estructura C24.

Todas las especies presentaron en sus perfiles los ácidos biliares DHCA, UDCA, CA, GCA, TCA, TDCA Y LCA, además del colesterol y los compuestos no identificados Ni1, Ni2, Ni4 y Ni6 (Tabla 9, Fig. 10). Los compuestos que aparecieron con la menor frecuencia fueron el TCDCA y TLCA, ambos presentes en 5 de las 11 especies estudiadas, seguidos por el DCA y el segundo pico del ácido dehidrocólico (DHCA2), presentes en 6 y en 7 especies, respectivamente (Tabla 9, Fig. 10).

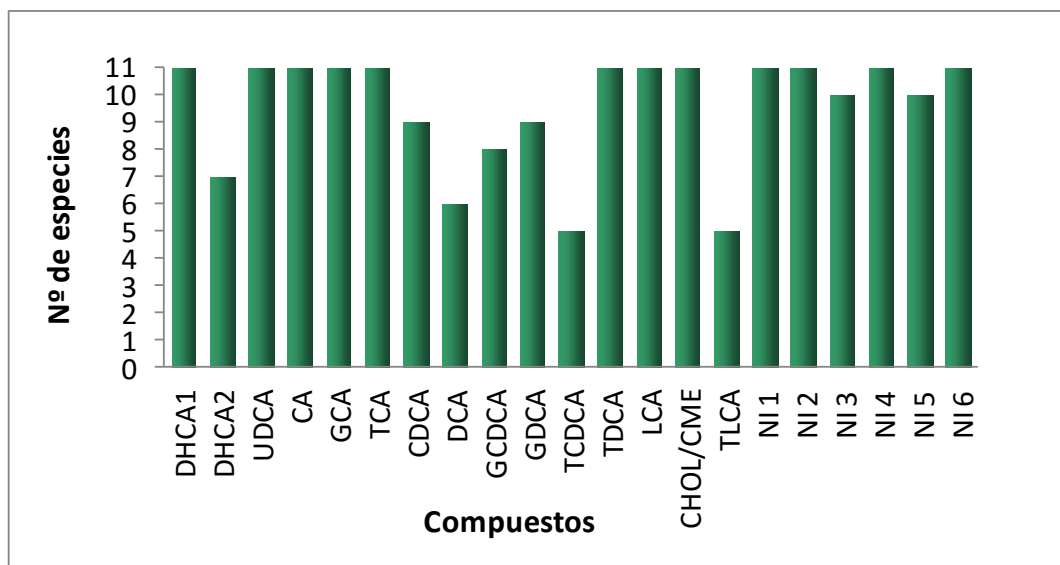


Figura 10: Frecuencia de presencia de los compuestos encontrados en relación al número de especies. Ni1-Ni6: compuestos no identificados.

Con respecto al número de compuestos por especie, *C. villosus* presentó todos los compuestos encontrados (20), seguida por *C. vellerosus* con 19 (Fig. 11). Las especies que presentaron el menor número de compuestos fueron *M. tridactyla* y *C. didactylus*, ambas con 16 (Fig. 11).

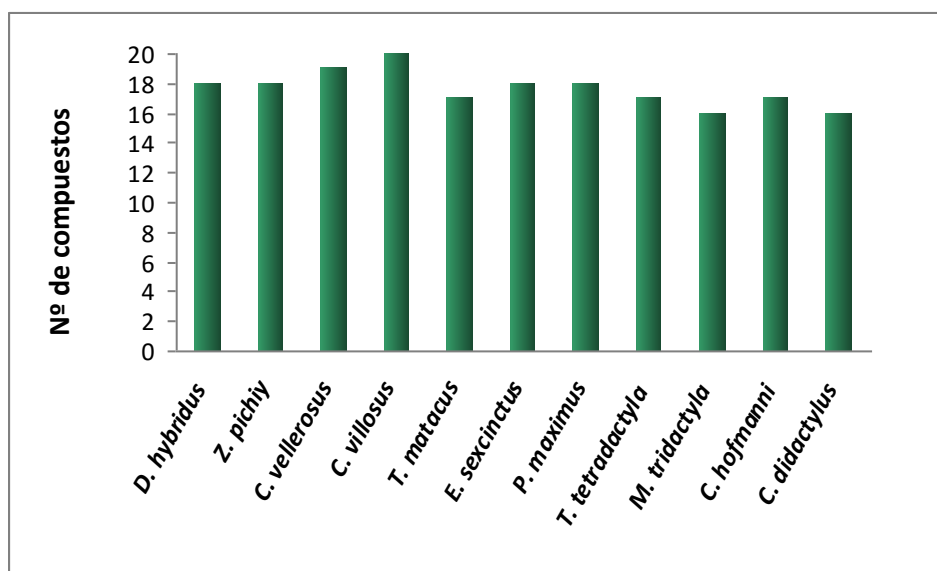


Figura 11: Número de compuestos presente en las especies estudiadas.

Compuesto	<i>D. hybridus</i>	<i>Z. pichiy</i>	<i>C. vellerosus</i>	<i>C. villosus</i>	<i>T. matacus</i>	<i>E. sexcinctus</i>	<i>P. maximus</i>	<i>T. tetradactyla</i>	<i>M. tridactyla</i>	<i>C. hoffmanni</i>	<i>C. didactylus</i>
DHCA1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DHCA2	x	x	x	x				x		x	x
UDCA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
GCA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TCA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CDCA	x	x	x	x	x	x	x			x	x
DCA			x	x	x	x				x	x
GCDCA	x	x	x	x	x	x	x			x	
GDCA	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
TCDCA		x	x	x				x	x		
TDCA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
LCA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CHOL/CME	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TLCA	x		x	x			x	x			
NI 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NI 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NI 3	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
NI 4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NI 5	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
NI 6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabla 9: Presencia y/o ausencia de cada compuesto en las distintas especies. Las cruces indican presencia y los casilleros grises ausencia del compuesto en esa especie.

a) *D. hybridus*.

Esta especie mostró en su patrón de ácidos biliares fecales los compuestos DHCA, UDCA, CA, GCA, TCA, CDCA, GCDCA, GDCA, TDCA, LCA, CHOL/CME y TLCA, así como los seis compuestos no identificados (Ni1-Ni6) (Fig. 12). Se diferenció de *C. villosus* por no presentar DCA y TCDCA; de *Z. pichiy* por presentar TLCA y no presentar TCDCA y de *C. vellerosus* por presentar el compuesto no identificado Ni3 y no presentar DCA y TCDCA (Tabla 9).

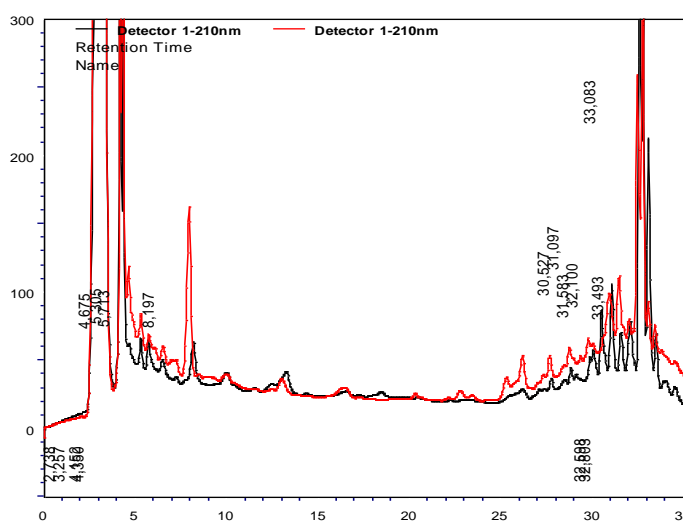


Figura 12: Patrón de ácidos biliares fecales de *D. hybridus* obtenido a 210 nm.

b) *Z. pichiy*.

Esta especie mostró todos los compuestos encontrados, excepto los ácidos biliares DCA y TLCA (Fig. 13). Se diferenció de *C. vellerosus* por la ausencia de DCA y TLCA y por la presencia de Ni3; y de *C. villosus* por la ausencia de DCA y TLCA (Tabla 9).

c) *C. vellerosus*.

Esta especie se caracterizó por la presencia de todos los compuestos encontrados, excepto el Ni3 (Fig. 14), diferenciándose por este rasgo de todas las otras especies estudiadas, que sí lo presentaron (Tabla 9).

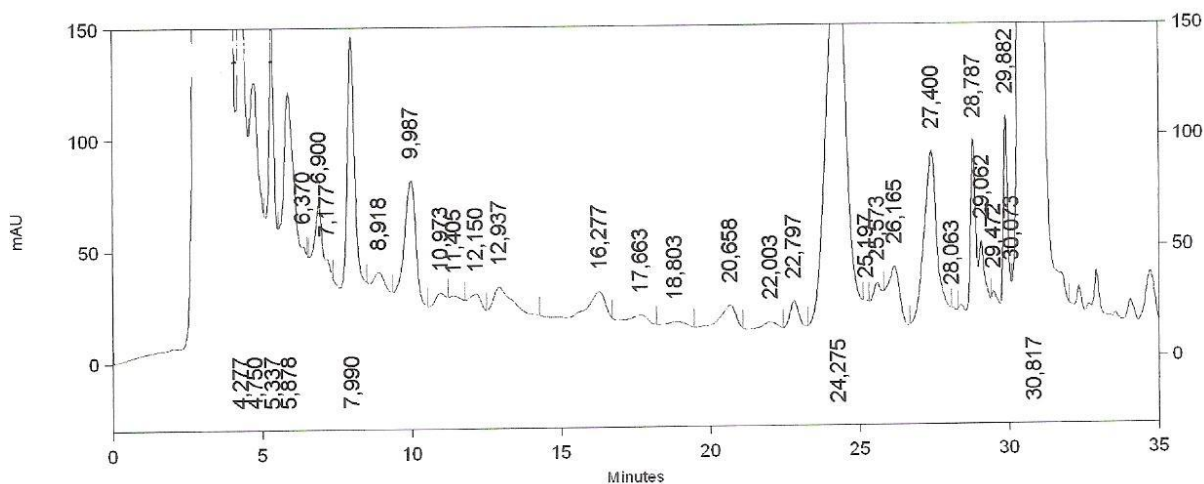


Figura 13: Patrón de ácidos biliares fecales de *Z. pichiy* obtenido a 210 nm.

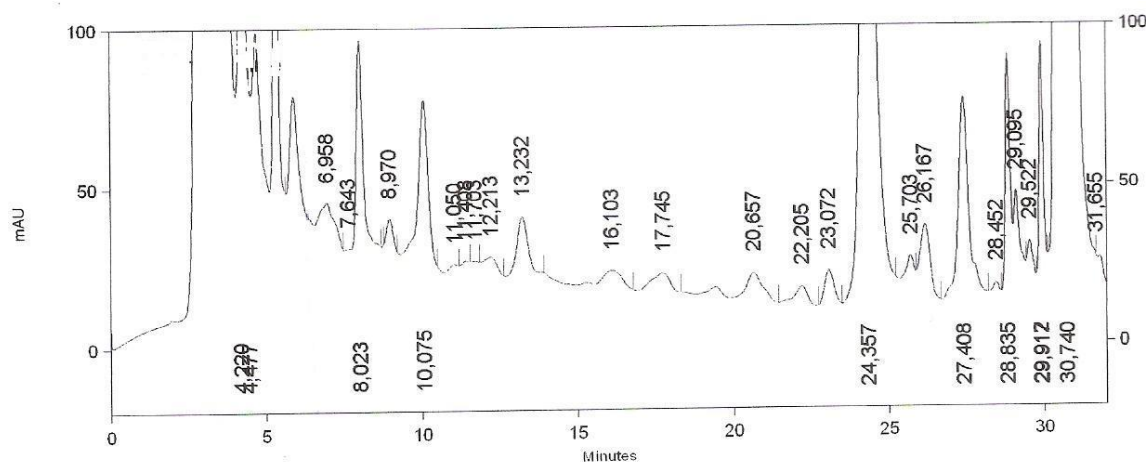


Figura 14: Patrón de ácidos biliares fecales de *C. vellerosus* obtenido a 210 nm.

d) *C. villosus*.

Fue la única especie, diferenciándose así del resto de las especies estudiadas, que mostró todos los compuestos encontrados en su perfil (Fig. 15, Tabla 9).

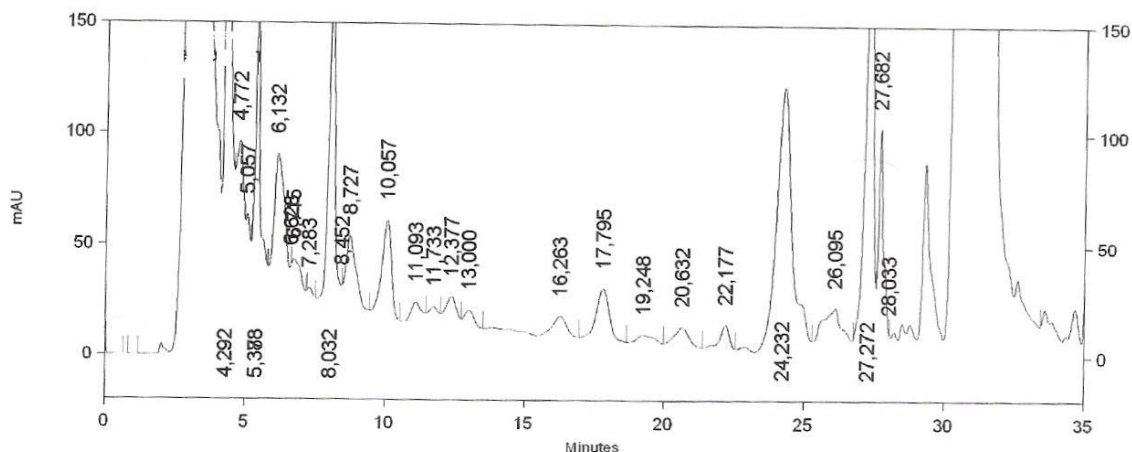


Figura 15: Patrón de ácidos biliares fecales de *C. villosus* obtenido a 210 nm.

e) *P. maximus*.

Esta especie mostró todos los compuestos, excepto DCA y TCDCA, además de una sola banda del DHCA (Fig. 16), diferenciándose por esta última característica de *D. hybridus*, *Z. pichiy*, *C. vellerosus* y *C. villosus*; y de *T. matacus* y *E. sexcinctus* por la ausencia de DCA y la presencia de TLCA (Tabla 9).

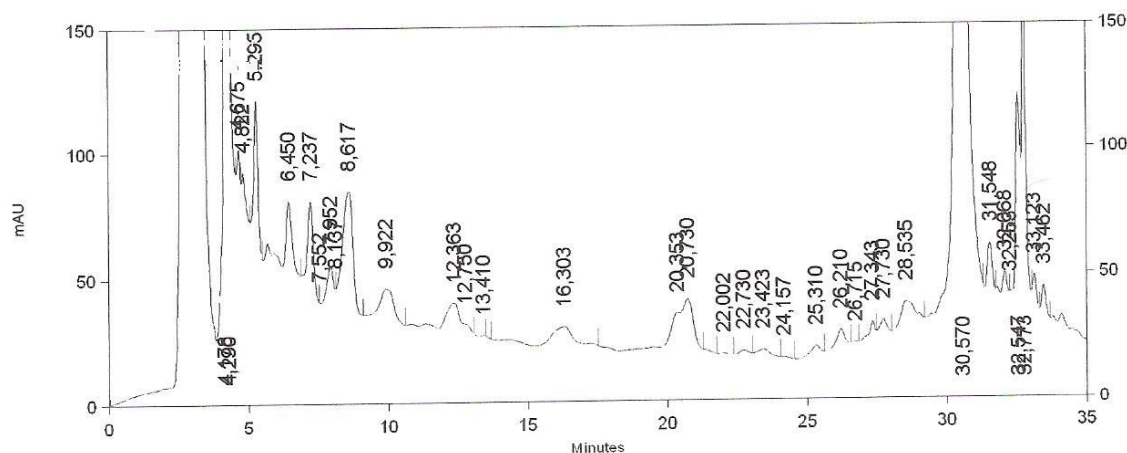


Figura 16: Patrón de ácidos biliares fecales de *P. maximus* obtenido a 210 nm.

f) *T. tetradactyla*.

Esta especie presentó todos los compuestos encontrados excepto CDCA, DCA y GCDCA (Fig. 17). Asimismo, presentó dos picos correspondientes al DHCA, diferenciándose por eso y por la presencia de TLCA, de *M. tridactyla* (Tabla 9).

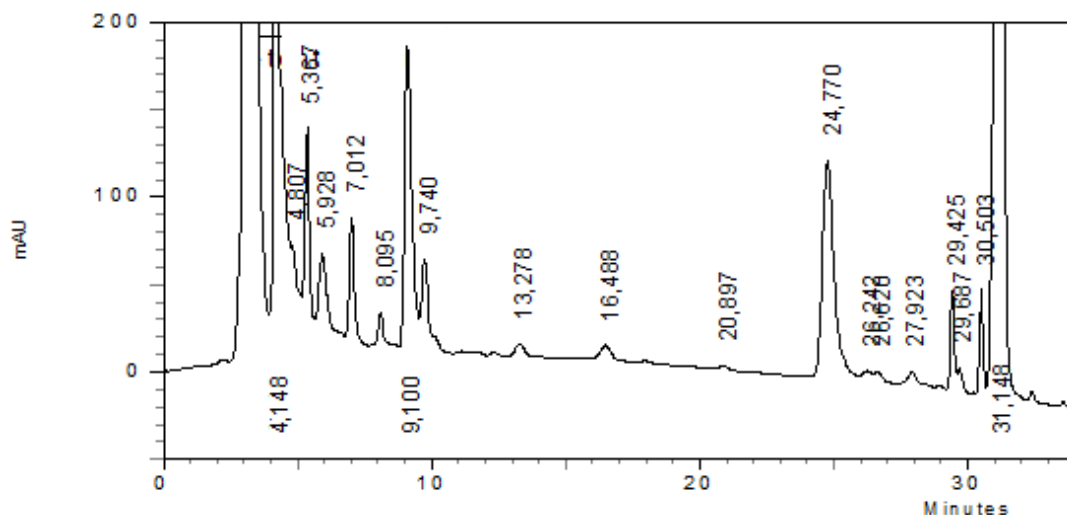


Figura 17: Patrón de ácidos biliares fecales de *T. tetradactyla* obtenido a 210 nm.

g) *M. tridactyla*.

M. tridactyla no presentó los ácidos biliares DCA, CDCA, GCDCA y TLCA. Asimismo, presentó un único pico para el DHCA, característica compartida con *T. matacus*, *E. sexcinctus* y *P. maximus* (Fig. 18). Se diferenció de *T. tetradactyla* por la ausencia de TLCA y presencia de dos picos correspondientes al DHCA (Tabla 9).

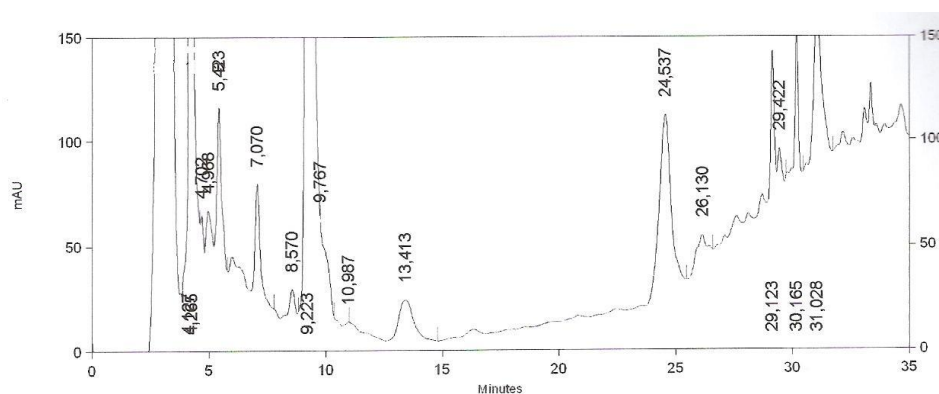


Figura 18: Patrón de ácidos biliares fecales de *M. tridactyla* obtenido a 210 nm.

h) *T. matacus*.

Esta especie presentó en su patrón la mayoría de los ácidos biliares hallados, excepto TCDCA y TLCA, además de un solo pico para el DHCA (Fig. 19). Su carácter distintivo fue la ausencia del compuesto no identificado Ni5 (Tabla 9).

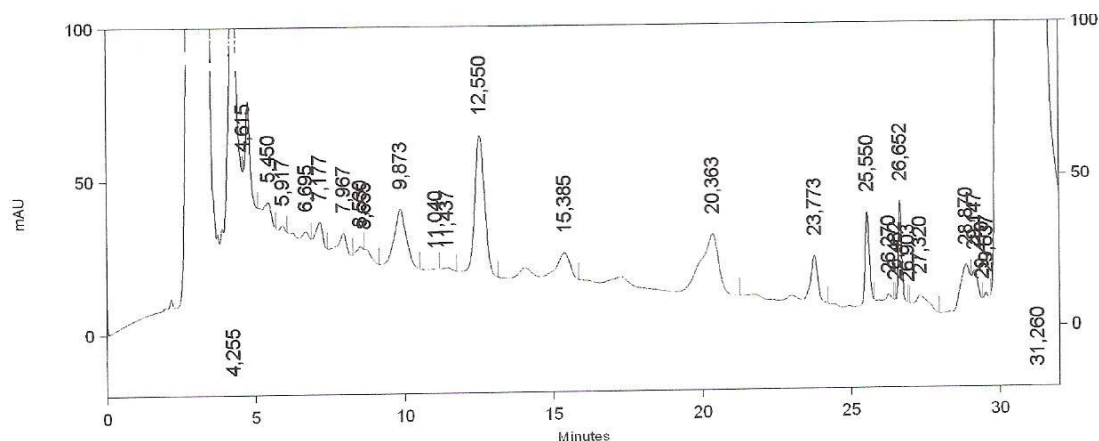


Figura 19: Patrón de ácidos biliares fecales de *T. matacus* obtenido a 210 nm.

i) *E. sexcinctus*.

En el patrón de esta especie no se observó la presencia de los ácidos biliares tauroconjugados TCDCA y TLCA. Presentó un único pico para el DHCA (Fig. 20); diferenciándose de *T. matacus* por la presencia del compuesto no identificado Ni5. Se diferencia de *D. hybridus* y *Z. pichiy* por presentar el ácido biliar no conjugado DCA y por la presencia de un solo pico de DHCA; de *C. vellerosus* y *C. villosus* por la ausencia de TCDCA y TLCA y la presencia de un solo pico de DHCA (Tabla 9).

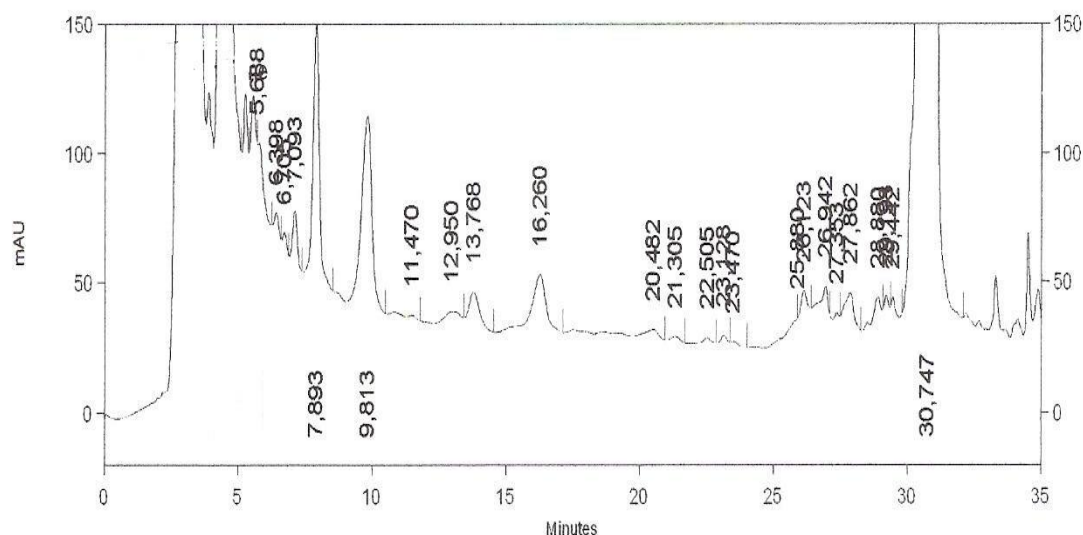


Figura 20: Patrón de ácidos biliares fecales de *E. sexcinctus* obtenido a 210 nm.

j) *C. didactylus*.

Esta especie mostró en su perfil todos los compuestos, excepto los ácidos biliares glicoconjugados GCDCA y GDCA y los tauroconjugados TCDCA y TLCA (Fig. 21, Tabla 9).

k) *C. hoffmanni*.

Esta especie presentó el mismo perfil que *C. didactylus* excepto por la presencia de GCDCA, única diferencia entre ambas especies (Fig. 22). Tanto *C. didactylus* como *C. hoffmanni* se diferenciaron de *T. tetradactyla* y *M. tridactyla* por la ausencia de GDCA y TCDCA y la presencia de CDCA y DCA (Tabla 9).

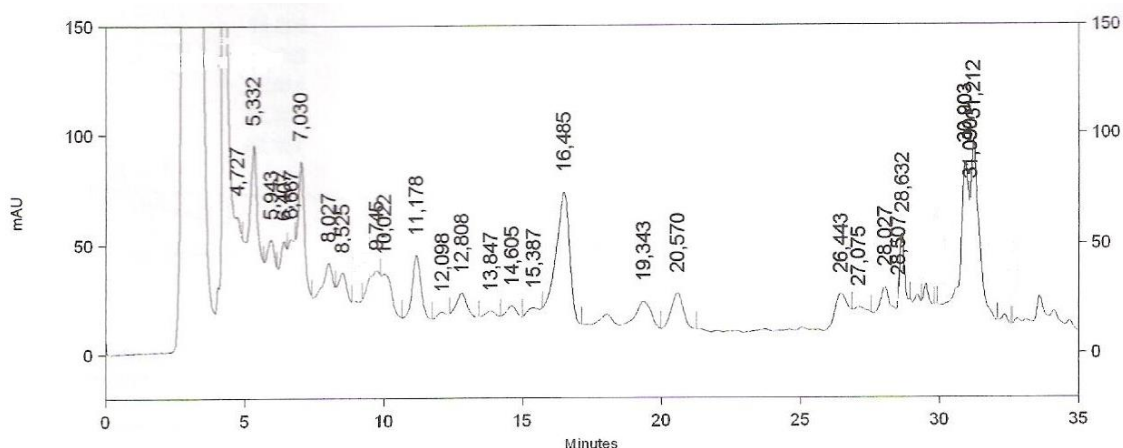


Figura 21: Patrón de ácidos biliares fecales de *C. didactylus* obtenido a 210 nm.

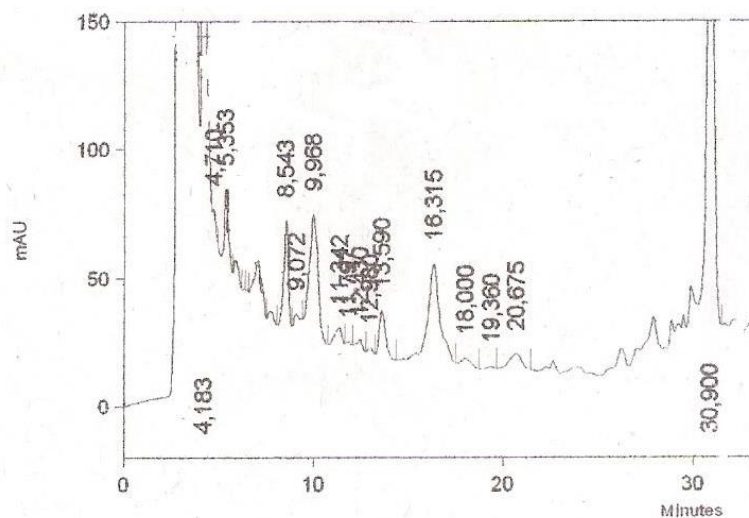


Figura 22: Patrón de ácidos biliares fecales de *C. hoffmanni* obtenido a 210 nm.

Cuantificación de los ácidos biliares por especie

Para todas las especies estudiadas se cuantificaron los principales ácidos biliares presentes en las muestras a través de las curvas de calibrado (Tabla 10).

La especie que presentó la mayor cantidad de los ácidos biliares DHCA, UDCA, GDCA y TLCA fue *T. tetradactyla*, en tanto que *M. tridactyla* presentó la mayor cantidad de los compuestos CA y TCA, con valores de GDCA cercanos a los de *T. tetradactyla*. *Chaetophractus villosus* fue la especie que mostró la mayor cantidad de GCA, CDCA, GCDCA y TDCA en sus muestras; *C. vellerosus* mostró la mayor cantidad de LCA (Tabla 10).

En general, *P. maximus*, *C. didactylus*, *C. hoffmanni* y *D. hybridus* presentaron pequeñas cantidades de todos los ácidos biliares (Tabla 10). Sin embargo, para el análisis de las tres primeras especies mencionadas hay que tener en cuenta el bajo número (1 en cada caso) de muestras.

Especie	n	DHCA	UDCA	CA	GCA	TCA	CDCA	GCDCA	GDCA	TDCA	LCA	TLCA
<i>P. maximus</i>	1	1.00	0.35	0.96	0.51	0.08	0.75	0.67	0.08	0.12	0.39	0.38
<i>D. hybridus</i>	3	1.40±0.79	1.17±1.19	0.35±0.00	1.09±1.41	0.36±0.29	0.18±0.07	0.55±0.39	1.28±1.23	0.73±0.59	0.35±0.32	0.60±0.47
<i>C. vellerosus</i>	2	2.74±0.57	0.89±0.04	0.23±0.00	2.11±0.81	0.38±0.29	0.57	1.01±0.98	2.18±1.07	3.44±2.77	15.79±19.62	3.3
<i>Z. pichiy</i>	3	1.74±0.96	1.79±2.48	0.16±0.08	0.28±0.20	0.55±0.77	0.44±0.46	0.55±0.33	6.08±9.81	3.10±1.90	1.16±1.51	
<i>C. villosus</i>	4	4.64±2.02	1.95±2.30	1.28±0.94	4.94±4.75	0.44±0.52	1.15±0.84	1.25±1.36	14.23±6.34	4.90±4.44	4.09±2.87	2.84±2.01
<i>T. tetradactyla</i>	4	14.81±20.35	2.40±2.42	13.92±12.26	2.72±2.59	0.51±0.40			24.76±15.00	0.69±0.41	4.98±3.36	13.42±24.52
<i>M. tridactyla</i>	2	10.50±9.08	1.65±1.27	16.61±3.39	0.67±0.76	1.17±0.23			22.37±25.07	0.42	3.95±3.75	
<i>T. matacus</i>	3	1.57±1.00	0.58±0.31	0.50±0.38	1.59±1.43	0.08±0.05		0.42±0.27	0.62±0.09	0.40±0.45	0.36±0.22	1.08±0.84
<i>E. sexcinctus</i>	1	9.46	8.32	6.16	1.24	0.40	0.59	0.30	1.83	4.01	0.88	
<i>C. hofmanni</i>	1	0.03	0.89	0.06	0.26	0.08	0.13	0.09		0.12	0.54	
<i>C. didactylus</i>	1	0.15	0.54	0.44	0.72	0.01	0.52			0.94	3.35	

Tabla 10: Cantidad (mg de compuesto/g hez) de cada ácido biliar presente en las especies estudiadas, expresada como X±DE.

DISCUSIÓN

La HPLC es el método de elección para el análisis de los ácidos biliares fecales. Sin embargo, debido a la complejidad de la mezcla, resulta difícil el desarrollo de un único método para su análisis (Burkard y col., 2005; Alnouti y col., 2008; Sjoval y col., 2010). En este trabajo se identificaron los patrones de ácidos biliares fecales por HPLC, para todas las especies del Superorden Xenarthra estudiadas.

Con la metodología utilizada, los ácidos biliares eluyeron en relación a su hidrofiliidad y las formas no conjugadas de cada ácido biliar eluyeron antes que los correspondientes conjugados con glicina y, a su vez, éstos eluyeron antes que los conjugados con taurina, en concordancia con lo observado por otros autores, en heces y bilis (Sakakura y col., 1998; Yeh y Hwang, 2001; Hong y col., 2007; Hagio y col., 2009; Kakiyama y col., 2014).

Entre los parámetros que se tienen en cuenta para lograr una eficiente separación de los ácidos biliares por HPLC, se encuentran el tipo de fase estacionaria y la composición y fuerza de la fase móvil (Zarzycki y col., 2005). La columna de fase reversa C-18 y la fase móvil utilizadas en este trabajo, resultaron ser las más apropiadas para la resolución de la mayoría de los estándares y de los compuestos presentes en las muestras. Con estas condiciones, se logró separar e identificar a los ácidos biliares en un tiempo menor a los 35 minutos.

Uno de los aportes más significativos de este estudio es que se alcanzó la completa resolución de los ácidos deoxicólico y glicodeoxicólico, que no habían podido ser separados en trabajos previos, tanto para los estándares como para muestras de heces y bilis en aves, peces, reptiles y mamíferos (Torchia y col., 2001; Yeh y Hwang 2001; Yeh y col., 2003; Hagio y col., 2009). Algunos pares críticos, como el ácido cólico-metil-éster y el colesterol,

no pudieron resolverse totalmente debido, probablemente, a la similitud de sus estructuras y propiedades fisicoquímicas. El incremento de la fuerza de la fase móvil, mediante una mayor proporción de acetonitrilo, posibilitó la elución en un tiempo razonable, de los compuestos más retenidos en la columna, es decir los más apolares, como colesterol, litocólico y cólico-metil-éster.

Las longitudes de onda UV-visible más comunes para la detección de ácidos biliares son 200 y 210 nm, ambas utilizadas en este trabajo. Al igual que lo establecido en trabajos anteriores para los estándares (Rossi y col., 1987; Kakiyama y col., 2006; Kakiyama y col., 2014), los ácidos biliares amidados con taurina y glicina exhibieron una mayor absorbancia a ambas longitudes de onda que los no conjugados. Esto mismo ha sido observado utilizando algún tipo de derivatización, en heces de humanos (Kakiyama y col., 2014).

En esta parte del trabajo, queda demostrado el poder de resolución del HPLC, expresado como la separación de la mayoría de los compuestos identificados, en un tiempo relativamente corto. Bajo las condiciones de operación, la repetibilidad del análisis en términos de tiempos de retención y áreas entre diferentes corridas resultó satisfactoria, permitiendo una correcta identificación y cuantificación de los ácidos biliares. En los cromatogramas obtenidos se observaron picos agudos y simétricos, indicando una alta eficiencia del sistema cromatográfico utilizado.

En el caso de los picos no identificados, es decir que no coincidieron con ninguno de los estándares utilizados, éstos podrían corresponder a productos de fenómenos de isomerización, desdoblamiento o interacciones químicas entre los distintos ácidos biliares fecales, como ha sido citado en otros trabajos, donde han recibido el nombre de ketoderivados y/o estereoisómeros (Chavez y Krone, 1976; Hong y col., 2007).

Al igual que lo observado en este trabajo, otros autores (Sakaguchi y col., 1986; Hong y col., 2007; Hagio y col., 2009; Agnihotri y Khan, 2015) no reportaron variaciones en la

presencia de los ácidos biliares fecales del perfil entre individuos de una misma especie de mamíferos, sino sólo en la cantidad de algunos de ellos.

Por otro lado, y tal como se esperaba, los perfiles de ácidos biliares obtenidos a partir de extractos más concentrados mostraron la presencia de los mismos compuestos en mayor cantidad, facilitando su identificación sobre los cromatogramas.

Se pudieron diferenciar todas las especies de *Xenarthra* estudiadas, a través de su perfil de ácidos biliares fecales por HPLC. Resulta, por lo tanto, como consecuencia de este estudio, posible considerar a la HPLC como una herramienta para estudios ecológicos, de aplicación para la diferenciación de heces de xenartros colectadas a campo. Más aún, ha probado ser un método relativamente sencillo, sin necesidad de realizar largos pasos de derivatización, lográndose la separación e identificación de la mayoría de los compuestos encontrados en un corto tiempo.

Este es el primer reporte de la aplicación de HPLC para la identificación de heces de especies de mamíferos en general, y específicamente del Superorden *Xenarthra*, colaborando en el conocimiento de su biología, ecología y fisiología, aspectos poco estudiados en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

- AGNIHOTRI MA & A KHAN (2015) Effect of water-soluble gummy fiber, water-insoluble neutral detergent fiber isolated from *Syzygium cumini* seeds on biliary and fecal bile acids and sterols in rats fed a high cholesterol diet. *International Journal of Medical Science and Public Health* 4(1): 23-26.
- ALNOUTI Y, IL CSANAKY & CD KLAASSEN (2008) Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 873: 209-217.
- ARDREY RE (2003) *Liquid Chromatography*. En: J Wiley & Sons, Ltd. (eds). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An introduction*. The Atrium, Southern Gate, Chichester, west Sussex, England. Pp. 7-31.
- BATTA AK, G SALEN, KR RAPOLE, M BATTA, P BATTA, D ALBERTS & D EARNEST (1999) Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. *Journal of Lipid research* 40: 1148-1154.
- BATTA AK, SK AGGARWAL & G SALEN (1992) High-Performance Liquid Chromatography of Bile Acids Effect of Hydroxyl Groups at C-3, 6 7 and 12 on Bile Acid Mobility. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 15(3): 467-478.
- BURKARD I, A VON ECKARDSTEIN & KM RENTSCH (2005) Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 826: 147-159.
- COCA E, B RIBAS, G TRIGUEROS, JM SARMIENTO, M BORQUE, D ORTEGA, A SOBRINO, A MALLÉN, I DE PABLOS & J ALVAREZ FDEZ-REPRESA (1994) A

- method for quick determination of bile acids in bile of patients with biliary lithiasis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 17(6): 1349-1363.
- CHAVEZ MN & CL KRONE (1976) Silicic acid Thin-Layer Chromatography of conjugated and free bile acids. *Journal of Lipid Research* 17: 545-547.
- ENEROTH PB, R GORDON & J SJOVALL (1966b) Characterization of trisubstituted cholanoic acids in human feces. *Journal of Lipid Research* 7: 524-530.
- ENEROTH PB, R GORDON, R RYHAGE & J SJOVALL (1966a) Identification of mono- and dihydroxy bile acids in human feces by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 7: 511-523.
- GARCÍA-SEGURA JM, JG GAVILANES, A MARTINEZ DEL POZO, F MONTERO, M OÑADERRA & F VIVANCO (1996) Cromatografía. En: García-Segura y col. (eds). *Técnicas Instrumentales de Análisis en bioquímica*. Editorial Síntesis, Madrid, España. Pp. 398.
- GRIFFITHS WJ & J SJOVALL (2010) Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *Journal of Lipid Research* 51: 23-41.
- HAGEY LR, DL CROMBIE., E ESPINOSA, MC CAREY, H IGIMI & AF HOFMANN (1993) Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *Journal of Lipid Research* 34: 1911-1917.
- HAGIO M, M MATSUMOTO, M FUKUSHIMA, H HARA & S ISHIZUKA (2009) Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents using LC/ESI-MS. Marked concentration differences in two strains of rats. *Journal of Lipid research* 50(1): 173-180.
- HONG YJ, M TUROWSKI., JT LIN & WH YOKOYAMA (2007) Simultaneous characterization of bile acid, sterols, and determination of acylglycerides in feces from

- soluble cellulose-fed hamsters using HPLC with Evaporative Light-Scattering Detection and APCI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(24): 9750-9757.
- HUANG J, SPR BATHENA, IL CSANAKY & Y ALNOUTI (2011) Simultaneous characterization of bile acids and their sulfate metabolites in mouse liver, plasma, bile, and urine using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55(5): 1111-1119.
- JONES ML, H CHEN, W OUYANG, T METZ & S PRAKASH (2003) Method for bile acid determination by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Medical Sciences* 23(5): 277-280.
- KAKIYAMA G, A HOSODA, T IIDA, Y FUJIMOTO, T GOTO, N MANO, J GOTO & T NAMBARA (2006) A direct method for the separation and quantification of bile acid acyl glycosides by High-Performance Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector. *Journal of Chromatography A*, 1125: 112-116.
- KAKIYAMA G, A MUTO, H TAKEI, H NITTONO, T MURAI, T KUROSAWA, AF HOFMANN, WM PANDAK & JS BAJAJ (2014) A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: validation by GC-MS and LC-MS. *Journal of Lipid Research* 55(5): 978-990.
- KAMADA SM, M MAEDA & A TSUJI (1983) Fluorescence high-performance liquid chromatographic determination of free and conjugated bile acids in serum and bile using 1-bromoacetylpyrene as a pre-labeling reagent. *Journal of Chromatography* 272: 29-41.
- KATZ E, R EKSTEEN & P SCHOENMAKERS (1998) Handbook of HPLC. En: Katz E, R Eksteen, P Schoenmakers & N Miller (eds). CRC Press, New York. Pp. 989.
- LIMA ES & DSP ABDALLA (2002) High-Performance Liquid Chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta* 465(1-2): 81-91.

- LIN D-L, H-C CHANG & C-Y CHEN (2000) Identification and quantitation of bile acids in bear bile by HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis* 8(4): 283-288.
- MAMIANETTI A, D GARRIDO, CN CARDUCCI & MC VESCINA (1999) Fecal bile acid excretion profile in gallstone patients. *Medicina* 59(3): 269-273.
- NATALINI B, R SARDELLA, E CAMAIONI, S NATALINI & R PELLICCIARI (2006) Dominant factors affecting the chromatographic behaviour of bile acids. *Chromatographia* 64(5): 343-349.
- PERSSON E, L LOFGREN, G HANSSON, B ABRAHAMSSON, H LENNERNAS & R NILSSON (2007) Simultaneous assessment of lipid classes and bile acids in human intestinal fluid by solid-phase extraction and HPLC methods. *Journal of Lipid Research* 48: 242-251.
- PERWAIZ S, B TUCHWEBER, D MIGNAULT, T GILAT & IM YOUSEF (2001) Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 42: 114-119.
- PETERSON BL & BS CUMMINGS (2006) A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography* 20: 227-243.
- QUATTROCCI OA, S ABELAIRA DE ANDRIZZI & RF LABA (1992) Análisis cuantitativo. En: Quattrocchi AO, S Abelaira de Andrizzi & RF Laba (eds). *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Buenos Aires, Argentina. Pp. 405
- ROBARDS K, PR HADDAD & PE JACKSON (1994) *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press, London, San Diego. Pp. 495.
- RODA A, C CERRE, P SIMONI, C POLIMENI, C VACCARI & A PISTILLO (1992) Determination of free and amidated bile acids by high performance liquid

- chromatography with evaporative light scattering mass detection. *Journal of Lipid Research* 33: 1393-1402.
- ROSSI SS, JL CONVERSE & AF HOFMANN (1987) High pressure liquid chromatography analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile acids. *Journal of Lipid Research* 28: 589-595.
- SAKAGUCHI M, T MINOURA, Y HIRAMATSU, H TAKADA, M YAMAMURA, K HIOKI & M YAMAMOTO (1986) Effects of dietary saturated and unsaturated fatty acids on fecal bile acids and colon carcinogenesis induced by Azoxymethane in Rats. *Cancer Research* 46: 61-65.
- SAKAKURA H, N KIMURA, H TAKEDA, H KOMATSU, K ISHIZAKI & S NAGATA (1998) Simultaneous determination of bile acids in rat liver tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 178: 33-40.
- SARDELLA R, A GIOIELLO, F IANNI, F VENTURONI & B NATALINI (2012) HPLC/ELSD analysis of amidated bile acids: An effective and rapid way to assist continuous flow chemistry processes. *Talanta* 100: 364-371.
- SHAW R & WH ELLIOTT (1978) Bile acids. LVII. Analysis of bile acids by high-pressure liquid chromatography and mass spectrometry. *Lipids* 13: 971-975.
- SHAW R, M RIVETNA & WH ELLIOT (1980) Bile acids. LXIII. Relationship between the mobility on reversed-phase high-performance liquid chromatography and the structure of bile acids. *Journal of Chromatography* 202: 347-361.
- SJOVALL J (2004) Fifty years with bile acids and steroids in health and disease. *Lipids* 39(8): 703-722.

- SJOVALL J, WJ GRIFFITHS, KDR SETCHELL, N MANO & J GOTO (2010) Analysis of bile acids. En: HLJ Makin & DB Gower (eds). *Steroid Analysis*, Springer Dordrecht Heidelberg, London, UK. Pp. 837-966.
- STREET JM, DJH TRAFFORD & HLJ MAKIN (1983) The quantitative estimation of bile acids and their conjugates in human biological fluids. *Journal of Lipid Research* 24: 491-511.
- TORCHIA EC, ED LABONTÉ & LB ANGELLON (2001) Separation and quantitation of bile acids using an isocratic solvent system for High Performance Liquid Chromatography coupled to an Evaporative Light Scattering Detector. *Analytical Biochemistry* 298: 293-298.
- VERTZONI M, H ARCHONTAKI & C REPPAS (2008) Determination of intraluminal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. *Journal of Lipid Research* 49: 2690-2695.
- WANG N, Y FENG, TN XIE, W SU, M ZHU, O CHOW, Y ZHANG, K NG, C LEUNG & Y TONG (2011) Chemical and biological analysis of active free and conjugated bile acids in animal bile using HPLC-ELSD and MTT methods. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2(1): 125-130.
- YEH YH & DF HWANG (2001) High-Performance Liquid Chromatographic determination for bile components in fish, chicken and duck. *Journal of Chromatography B* 751: 1-8.
- YEH Y-H, D-Y WANG, M-Y LIAU, M-L WU, J-F Deng, T NOGUCHI & D-F HWANG (2003) Bile acid composition in snake bile juice and toxicity of snake bile acids to rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 136: 277-284.
- ZARZYCKI PK, KM KULHANEK, R SMITH, MA BARTOSZUK & H LAMPARCZYK (2005) Planar Chromatography versus Column Chromatography: A Performance Comparison. *LCGC North America* 23(3): 286-300.

ZHANG C, SB BROWN & TJ HARA (2001) Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycush*) function as chemical signals. *Journal of Comparative Physiology B* 171: 161-171.

CAPÍTULO V



LOS ÁCIDOS BILIARES COMO MARCADORES FILOGENÉTICOS

INTRODUCCIÓN

El estudio de las relaciones filogenéticas de los Xenarthra ha acaparado el interés de los científicos durante largo tiempo, principalmente en los intentos por entender la filogenia de los mamíferos.

Justamente, la elucidación de sus relaciones filogenéticas es de crucial importancia para la comprensión de la evolución de los mamíferos, debido a que se encuentran entre los grupos más antiguos con representantes vivientes; sobre la base de estudios moleculares se ha propuesto que representan el único constituyente de uno de los cuatro clados principales de mamíferos placentarios (Madsen y col., 2001; Murphy y col., 2001a,b; Delsuc y col., 2002, 2003; Gaudin y Wible, 2006; O'Leary et al. 2013; Superina y col., 2014). Asimismo, varios estudios basados en características morfológicas y fisiológicas han apoyado la hipótesis de que representan la rama más temprana de los placentados (McKenna, 1975; Novacek, 1992; Shoshani y McKenna, 1998).

A pesar de sus morfologías altamente especializadas y distintivas, la monofilia del grupo está reconocida (McKenna y Bell, 1997; O'Leary y col., 2013) y fuertemente apoyada por sinapomorfías moleculares (de Jong y col., 1985; van Dijk y col., 1999; Delsuc y col., 2001, 2002) y morfológicas, como los caracteres que reflejan los hábitos fosoriales y la mirmecofagia de varias especies (Patterson y col., 1992; Rose y Emry, 1993; Gaudin, 1999; Delsuc y Douzery, 2008, 2009).

La sistemática molecular de los Xenarthra se ha realizado utilizando una gran variedad de marcadores moleculares (Delsuc y Douzery, 2008, 2009). Los estudios morfológicos (Engelmann, 1985; Patterson y col., 1992) y moleculares (Delsuc y col., 2001; Madsen y col., 2001; Murphy y col., 2001a) apoyan la división de los Xenarthra en dos órdenes: **Cingulata**, representado por los armadillos, Familia Dasypodidae, dividida en tres subfamilias: Dasypodinae, Euphractinae y Tolypeutinae; y **Pilosa**, representado por los osos

hormigueros y meleros, Suborden Vermilingua, que se divide en dos familias o clados, Cyclopedidae (Gn. *Cyclopes*) y Myrmecophagidae (Gns. *Myrmecophaga* y *Tamandua*), y los perezosos, Suborden Folivora, donde se reconocen dos familias Megalonychidae (Gn. *Choloepus*) y Bradypodidae (Gn. *Bradypus*) (Gardner, 2005, 2007; Barquez y col., 2006; Delsuc y Douzery, 2008, 2009).

El nombre del orden Pilosa hace referencia a su cubierta de pelos, que constituye un carácter derivado en los Xenarthra, interpretado como una reversión a la condición ancestral de los mamíferos (Delsuc y Douzery, 2008, 2009). Las relaciones filogenéticas dentro de los Pilosa vivientes están bien resueltas (Gaudin y Branham, 1998; Greenwood y col., 2001; Delsuc y col., 2002) y poseen apoyo sólido de datos morfológicos (Engelmann, 1985; Patterson y col., 1992) y moleculares (Delsuc y col., 2001; 2002).

Con respecto a los Folivora, las dos familias de perezosos arbóreos que abarca el suborden son morfológicamente distintivas, Megalonychidae (*Choloepus*, perezosos de dos dedos) y Bradypodidae (*Bradypus*, perezosos de tres dedos) reflejando un origen posiblemente difilético, a partir de dos grupos fósiles separados (Webb, 1985; Höss y col., 1996; Greenwood y col., 2001).

Varios autores confirmaron, a través de técnicas moleculares, el clásico agrupamiento de *Myrmecophaga* y *Tamandua* dentro de los Vermilingua, en la subfamilia Myrmecophagidae (Delsuc y col., 2001, 2002, 2012; Maren y col., 2007; Möller-Krull y col., 2007). Asimismo, esta relación se encuentra apoyada por numerosos caracteres morfológicos (Reiss, 1997; Gaudin y Branham, 1998).

Por otro lado, dentro de los Vermilingua, los estudios morfológicos (Gaudin y Branham, 1998) apoyan la hipótesis de una emergencia temprana del oso pigmeo (*Cyclopes didactylus*), confirmada por datos moleculares (Delsuc y col., 2001; 2002). A su vez, *C. didactylus* se considera divergente de *M. tridactyla* y *Tamandua* sp., agrupando a ambas

especies de forma conjunta (Delsuc y col., 2001; 2002; 2003; Möller-Krull y col., 2007). Según esta divergencia morfológica, *C. didactylus* se clasifica dentro de su propia familia, Cyclopedidae (McKenna y Bell, 1997; Delsuc y Douzery, 2009).

Los armadillos (Cingulata) componen un grupo ecológica y morfológicamente diverso, el linaje más diversificado y antiguo de los Xenarthra (Wetzel, 1985; Vizcaíno, 1995). Poseen adaptaciones únicas dentro de los mamíferos como, por ejemplo, *T. matacus*, que, como estrategia antipredatoria, es capaz de enrollarse totalmente sobre sí mismo; o los integrantes del género *Dasypus*, que se reproducen por poliembrionía monocigótica obligada (Loughry y col., 1998).

Su filogenia ha sido difícil de reconstruir, tanto a partir de datos morfológicos como anatómicos, arrojando resultados incongruentes entre las distintas investigaciones (Engelmann, 1985; Patterson y col., 1989; Abrantes y Bergqvist, 2006; Gaudin y Wible, 2006). Los estudios moleculares a partir de genes mitocondriales y nucleares (Delsuc y col., 2002; 2003), han contribuido a definir tres linajes principales, compatibles con las subfamilias de la clasificación de McKenna y Bell (1997): Dasypodinae, con un único género, *Dasypus*; Tolypeutinae, géneros *Tolypeutes*, *Cabassous* y *Priodontes*; y Euphractinae, géneros *Euphractus*, *Chaetophractus* y *Zaedyus* (Delsuc y col., 2012).

La estrecha relación existente entre las subfamilias Tolypeutinae y Euphractinae fue apoyada por estudios moleculares que indican que los Dasypodinae emergieron de forma temprana dentro de los Cingulata (Delsuc y col., 2001; 2002; 2003). Estas relaciones son congruentes con el estudio de los espermatozoides de las especies pertenecientes a ambas subfamilias (Cetica y col., 1998), pero contradicen los estudios morfológicos (Engelmann, 1985; Gaudin y Wible, 2006; Möller-Krull y col., 2007). Sin embargo, los estudios moleculares no han podido resolver las relaciones existentes dentro de ambas subfamilias, obteniéndose resultados contradictorios a partir del estudio de genes mitocondriales y

nucleares sugiriendo, asimismo, que los eventos de especiación ocurrieron rápidamente dentro de ambos linajes, por factores ambientales (Delsuc y col., 2003; 2004).

Dichos estudios moleculares indican que *Dasypus* es el taxón hermano de todos los otros armadillos vivos, reconociéndose dos subclados entre las formas remanentes: Tolypeutinae, con *Tolypeutes* como el taxón hermano de *Cabassous*+*Priodontes*, y Euphractinae, con *Zaedyus* como el taxón hermano de *Chaetophractus*+*Euphractus*. Sin embargo, el apoyo estadístico para estas relaciones, tanto dentro de los Tolypeutinae como de los Euphractinae, es débil (Delsuc y col., 2001; 2002; 2003).

Asimismo, dentro de la Subfamilia Tolypeutinae, la estrecha relación entre *Cabassous* y *Priodontes* es consistente con su clasificación en la tribu Priodontini, basada en sus similitudes morfológicas (McKenna y Bell, 1997; Abrantes y Bergqvist, 2006; Gaudin y Wible, 2006) y en las características de sus espermatozoides (Cetica y col., 1998).

Por otro lado, los armadillos pertenecientes a la tribu Euphractini, que incluyen géneros vivos y fósiles estrechamente relacionados (Scillato-Yané, 1980; McKenna y Bell, 1997), se reconocieron como una subfamilia separada (Patterson y Pascual, 1968; 1972; Scillato-Yané, 1980; Carlini y Scillato-Yané, 1996) o como una tribu separada dentro de la subfamilia Dasypodinae (Simpson, 1945; Wetzel, 1985). Sin embargo, este grupo ha sido considerado, por varios autores, como una rama primitiva de otros armadillos (Simpson, 1945) ampliamente unidos por caracteres plesiomórficos (Gaudin y Wible, 2006).

El estudio de las relaciones evolutivas entre especies puede abordarse a través de la investigación detallada de caracteres individuales. Sin embargo, para establecer evidencias decisivas, se deben utilizar caracteres comparativamente simples.

Particularmente, las sales biliares exhiben un alto grado de diversidad estructural en las distintas especies de vertebrados (Hagey y col., 2010a; Hofmann y col., 2010; Hofmann y Hagey, 2014). Estos compuestos muestran un número sorprendentemente alto de formas

moleculares (Hagey y col., 2010a). Sin embargo, son lo suficientemente estables como para ser identificadas, por ejemplo, en coprolitos humanos de casi 2000 años de antigüedad (Lin y col., 1978) o en el perezoso de Shasta (*Nothrotherium shastense*), uno de los 33 géneros de animales norteamericanos que desaparecieron al final del Pleistoceno, hace 11000 años (Hagey y col., 2010a; McDonald y col., 2013).

El desarrollo de nuevas formas de sales biliares entre especies con un ancestro en común que se ha dispersado y aislado en el tiempo, provee evidencia de un componente geográfico/genético para el desarrollo de los ácidos biliares; esto permite una comparación directa entre la evolución de las especies y de las sales biliares (Hagey, 1992; Hofmann y Hagey, 2014).

Se han realizado diversos estudios para describir la estructura y composición de las sales biliares, en diversas matrices biológicas en vertebrados, tal como fue mencionado en el Capítulo 1 de esta tesis (Hagey y col., 1994, 2002; Picton y Kendall, 1994; Capurro y col., 1997; Cazón y Sühring, 1999; Guerrero y col., 2006). Sin embargo, son pocos los que han utilizado el perfil de ácidos biliares para comparar las relaciones evolutivas entre especies (Hagey y col., 1993; 1994, 2010a, b, c; Reyes, 1994; Krasowski y col., 2005; Moschetta y col., 2005; Kakiyama y col., 2006; Hofmann y col., 2010), y no hay antecedentes para Xenarthra.

Por todo lo anterior, el estudio de los ácidos biliares es un modelo para analizar las relaciones evolutivas de los vertebrados, desde un nivel de información único, diferente a los análisis tradicionales de mutaciones en genes individuales, o al estudio de los cambios y variaciones producidos en un rasgo determinado. La evolución paralela entre las especies de vertebrados y las estructuras moleculares de los ácidos biliares, y las diferencias interespecíficas en los perfiles, sugieren que el estudio de dichos compuestos podría proveer información filogenética valiosa (Hagey y col., 2002; Sjövall y col., 2010).

El objetivo de esta parte de la tesis es utilizar los patrones de ácidos biliares fecales, obtenidos por TLC y HPLC, para el análisis de las relaciones filogenéticas del Superorden Xenarthra.

HIPÓTESIS

Los perfiles de ácidos biliares fecales de las especies de *Xenarthra* estudiadas en esta tesis, reflejan la filogenia actualmente establecida para el Superorden.

OBJETIVOS

1. Establecer el grado de similitud en el patrón de ácidos biliares fecales entre las especies estudiadas, tanto por TLC como por HPLC.
2. Contrastar los valores de similitud obtenidos para los perfiles de ácidos biliares fecales de cada especie, con la filogenia establecida para el Superorden *Xenarthra*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron los grados de similitud de los patrones de ácidos biliares fecales entre las especies del Superorden Xenarthra estudiadas.

Para los perfiles encontrados por TLC, se compararon los patrones entre las nueve especies analizadas: *D. hybridus*, *C. vellerosus*, *C. villosus*, *Z. pichiy*, *T. tetradactyla*, *M. tridactyla*, *P. maximus*, *E. sexcinctus* y *T. matacus*.

Para los resultados obtenidos a través de HPLC, se realizaron las mismas comparaciones y se incorporaron las dos especies de perezosos estudiadas: *C. hofmanni* y *C. didactylus*, es decir, un total de 11 especies.

El nivel de similitud en la composición de ácidos biliares fecales entre las especies estudiadas se calculó a través del Índice de Jaccard (Krebs, 1989), expresado como:

$$J = \frac{a}{a+b+c}$$

Donde:

a: presencia del compuesto en la especie A y en la B (doble presencia).

b: presencia del compuesto en la especie A y ausencia en la B.

c: ausencia del compuesto en la especie A y presencia en la B.

El índice de Jaccard muestra valores entre 0 y 1 para las comparaciones entre las diferentes especies, siendo 1 el valor para la similitud total y 0 para la ausencia de similitud. Consideraremos una similitud adecuada cuando el valor del índice sea igual o mayor a 0.80.

Finalmente, se analizaron los valores de similitud obtenidos para todos los pares de especies comparadas, a la luz de las relaciones filogenéticas establecidas para el Superorden Xenarthra.

RESULTADOS

Índice de Jaccard para las comparaciones por TLC

El índice de Jaccard para las comparaciones de los patrones de ácidos biliares entre todas las especies varió entre 0.44 y 0.94 (Tabla 1).

El perfil de *Z. pichiy* fue más comparable al de *C. villosus* (0.94) y *C. vellerosus* (0.87) (Tabla 1).

Los pares de especies *T. tetradactyla*-*M. tridactyla* también mostraron valores altos (0,77) del índice de Jaccard (Tabla 1).

El patrón de ácidos biliares de *P. maximus* resultó ser más comparable al de *Z. pichiy* (0.87) y al de *C. villosus* (0.81) que al del resto de las especies (Tabla 1).

El patrón de *T. matacus* mostró una similitud de 0.72 con el de *C. villosus*; seguido de un valor de 0.67 respecto a *Z. pichiy* y de 0.65 con *C. vellerosus* (Tabla 1).

El patrón de *E. sexcinctus* mostró una similitud de 0.63 con *T. matacus* y de 0.60 respecto a *P. maximus* (Tabla 1).

El menor grado de similitud se encontró entre los pares de especies: *D. hybridus*-*T. matacus* (0.38) y *D. hybridus*-*E. sexcinctus* (0.38) (Tabla 1).

Los valores del índice de Jaccard también fueron bajos (<0,50) para los pares de especies: *T. tetradactyla*-*D. hybridus*, *Z. pichiy*-*D. hybridus*, *E. sexcinctus*-*M. tridactyla*, *E. sexcinctus*-*C. vellerosus*, *D. hybridus*-*C. villosus* (Tabla 1).

Tabla 2: Índice de Jaccard para la comparación de los patrones de ácidos biliares fecales entre todas las especies estudiadas, por HPLC.

DISCUSIÓN

En esta parte de la tesis se establecieron los grados de similitud entre las especies de *Xenarthra* estudiadas, a través del cálculo del Índice de Jaccard, tomándose como carácter, el patrón de ácidos biliares fecales determinado por TLC y HPLC.

A través de este análisis, comparando ambas técnicas y teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas establecidas para el Superorden, la mayoría de los valores de similitud reflejaron dichas relaciones.

En primer lugar, *M. tridactyla* mostró un perfil de ácidos biliares fecales más comparable al de *T. tetradactyla* que al del resto de las especies, tanto por TLC como por HPLC. Si bien el valor por TLC no alcanzó el límite indicado de 0.80, fue igualmente alto. Este resultado coincide con la filogenia del grupo ya que ambas especies se encuentran comprendidas dentro de los Vermilingua, subfamilia Myrmecophagidae (Gardner, 2005, 2007), confirmado por técnicas moleculares y morfológicas (Reiss, 1997; Gaudin y Branham, 1998; Delsuc y col., 2001, 2002, 2012; Maren y col., 2007; Möller-Krull y col., 2007).

Los altos valores de similitud entre los patrones de ácidos biliares fecales de *C. villosus*-*C. vellerosus*, *Z. pichiy*-*C. vellerosus* y *Z. pichiy*-*C. villosus*, coinciden con la filogenia establecida para dichas especies. Un estudio reciente en el que se realizó un análisis filogenético de los armadillos eufractinos, basado en una combinación de seis marcadores nucleares no codificantes y dos exones nucleares, sugiere la parafilia del género *Chaetophractus*, estando *C. vellerosus* más estrechamente relacionado con *Zaedyus pichiy* que con *C. villosus* (Abba y col., 2015). Si bien esta propuesta no se ve apoyada por nuestros resultados, se obtuvieron valores elevados del índice de Jaccard para la comparación *C. vellerosus*-*Z. pichiy*.

A pesar de ser los géneros *Chaetophractus*, *Euphractus* y *Zaedyus* morfológicamente muy cercanos, sus interrelaciones siguen siendo enigmáticas. Por un lado, el subagrupamiento de *Euphractus* y *Chaetophractus* y la exclusión de *Zaedyus*, es congruente con un estudio cladístico de caracteres craneodentales (Gaudin y Wible, 2006); sin embargo, otro estudio cladístico que también incluyó caracteres postcraneales, apoya una relación estrecha entre *Chaetophractus* y *Zaedyus* (Abrantes y Bergqvist, 2006).

Delsuc y col. (2002) agruparon a *Euphractus* junto a *Zaedyus*, excluyendo a *Chaetophractus*, dentro de los Euphractinae. Este subagrupamiento no presentó una completa resolución, aún cuando se trata de géneros tan similares morfológicamente. Más aun, en otro estudio (Delsuc y col., 2003), se demostró que 20 de un total de 23 apomorfías relevantes para un determinado gen, apoyaron la relación *Chaetophractus* + *Zaedyus*, mientras que 14 apomorfías de otro gen apoyaron el subagrupamiento *Chaetophractus* + *Euphractus*, proponiendo tres alternativas posibles de subagrupamiento de *Zaedyus*, *Chaetophractus* y *Euphractus*, apoyadas en el estudio de varios genes individuales: *Euphractus* + *Zaedyus*, *Euphractus* + *Chaetophractus* y *Chaetophractus* + *Zaedyus*. En esta tesis, si bien *E. sexcinctus* mostró bajos valores de similitud con *Z. pichiy*, *C. villosus* y *C. vellerosus*, tomando en cuenta el análisis por TLC, al considerar los perfiles obtenidos por HPLC, donde se identificó un mayor número de compuestos, los perfiles de todos los Euphractinos fueron muy comparables.

Delsuc y Douzery (2008, 2009) enfatizan las incongruencias en el agrupamiento de los tres géneros, dependiendo si se utilizan genes mitocondriales o nucleares para el análisis. Las dificultades para resolver las relaciones entre los géneros *Zaedyus*, *Chaetophractus* y *Euphractus*, se interpretaron a la luz de las evidencias de dos eventos de radiación disparados por cambios ambientales (Delsuc y col., 2004; Möller-Krull y col., 2007).

Al realizar los análisis con los perfiles obtenidos por HPLC, se encontró que los valores del índice de Jaccard fueron, más altos para la comparación de *D. hybridus* con el resto de las especies que los obtenidos por TLC. Debido a que los análisis por HPLC posibilitaron identificar un mayor número de compuestos en las heces interpretamos que, para eventuales análisis filogenéticos, los perfiles obtenidos por TLC no serían suficientes.

Si bien los estudios moleculares y de espermatozoides (Cetica y col., 1998; Delsuc y col., 2002) sugieren la emergencia temprana de la subfamilia Dasypodinae, diferenciándose de Tolypeutinae y Euphractinae, teniendo en cuenta los análisis por HPLC se observó que el patrón de ácidos biliares fecales de *D. hybridus* comparte similitudes con especies pertenecientes a las subfamilias Tolypeutinae y Euphractinae.

Gaudin y Wible (2006) observaron un patrón consistente de relaciones filogenéticas entre los cuatro géneros vivientes de armadillos “*euphractinos*”: *Chaetophractus*, *Chlamyphorus*, *Euphractus* y *Zaedyus* debido a que forman un clado monofilético, aún en aquellos análisis que incluyeron taxones fósiles. Asimismo, en todos menos en uno de los análisis, los armadillos “*dasipódidos*” vivientes *Cabassous*, *Dasypus*, *Priodontes* y *Tolypeutes* forman un grupo parafilético, siendo el género *Tolypeutes* el más derivado. Sin embargo, no fueron capaces de resolver las relaciones entre estos cuatro géneros (Gaudin y Wible, 2006).

En este trabajo, el patrón de ácidos biliares fecales de *T. matacus* resultó ser más comparable al de *P. maximus* por HPLC que al del resto de las especies; esto coincide con la filogenia establecida ya que, si bien *P. maximus* y *T. matacus* se encuentran en tribus diferentes, ambas pertenecen a una misma subfamilia, Tolypeutinae (Fig. 1) (Gardner, 2005, 2007; Barquez y col., 2006). Asimismo, por HPLC, *T. matacus* no sólo mostró altos valores de similitud con *D. hybridus* y *P. maximus*, sino también con los euphractinos, *Z. pichiy*, *C. villosus* y *C. vellerosus*.

Respecto al perfil de ácidos biliares fecales de *E. sexcinctus*, éste fue más similar al de *T. matacus* que al del resto de las especies, tanto por TLC como por HPLC. Esta comparación no refleja las relaciones filogenéticas establecidas para ambos géneros, que se encuentran en subfamilias separadas, Euphractinae y Tolypeutinae (Gardner, 2007).

La posición filogenética de *P. maximus* es la menos resuelta de todos los taxones. En el estudio de Gaudin y Wible (2006) *Priodontes* surge como el taxón hermano de un clado que incluye a *Dasybus*, y los análisis que involucraron sólo a taxones vivientes indicaron que *Priodontes* es el pariente más cercano de *Dasybus*. Esta estrecha relación entre *Dasybus* y *Priodontes* se vio reflejada en los resultados de la presente tesis, donde *P. maximus* mostró el mayor grado de similitud con *D. hybridus*, por HPLC.

En esta parte del trabajo, *C. didactylus* mostró el mayor grado de similitud, con un valor cercano al máximo del Índice de Jaccard, con *C. hofmanni*. Este resultado coincidió con lo esperado, respondiendo a la filogenia establecida para ambas especies, que se encuentran dentro de la Familia Megalonychidae, y pertenecen al mismo género.

A continuación, y a modo de resumen, se muestra un esquema de la filogenia actual del Superorden Xenarthra (Fig. 1) y una tabla que resume los principales resultados encontrados en esta parte de la tesis, y la correspondencia con las relaciones filogenéticas actuales del grupo (Tabla 3).

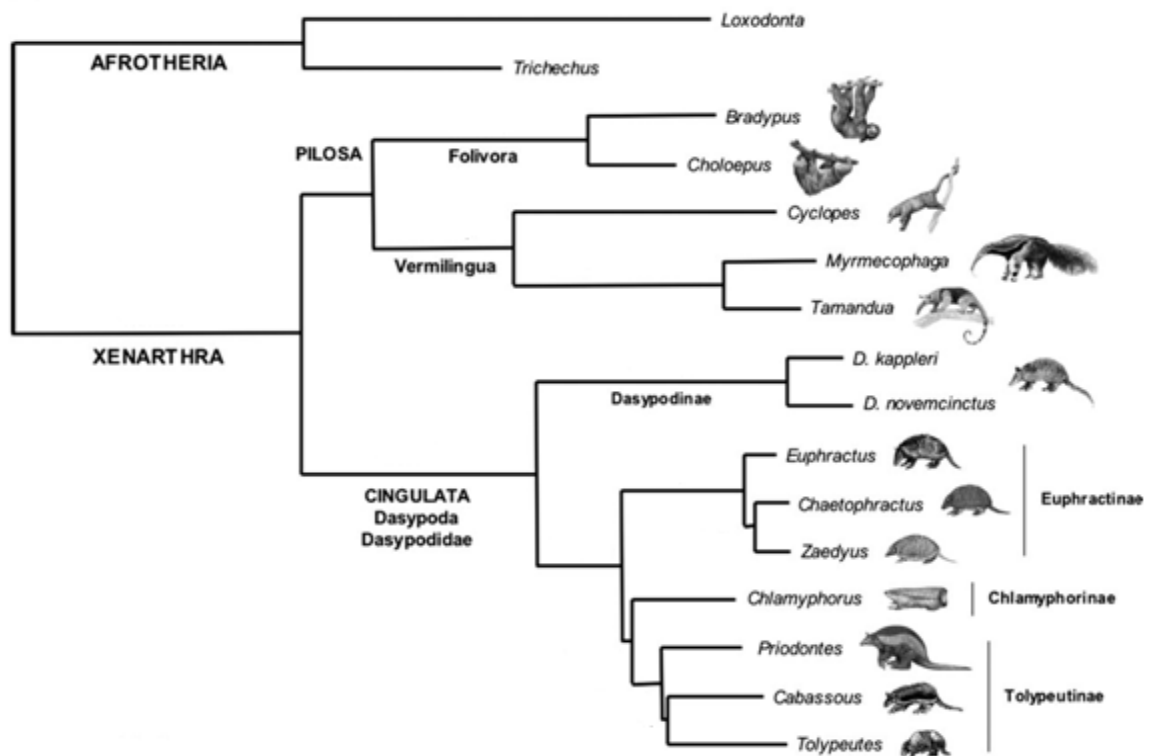


Figura 1: Esquema de las relaciones filogenéticas establecidas para el Superorden Xenarthra, reconstruidas a partir de datos moleculares (tomado de Möller-Krull y col., 2007).

Pares de especies comparadas (alto valor similitud)	Filogenia actual (coincidencia: SI; no coincidencia: NO)
MT – TT	SI
CHVI – CHVELL	SI
ZP – CHVELL	SI
ZP – CHVI	SI
ES – ZP, CHVI, CHVELL	SI (hay incongruencias en la actualidad)
TM – PM	SI
CD – CH	SI
DH – TODOS	SI
PM – DH	SI (Apoyado por Gaudin y Wible, 2006. Subfamilias diferentes según Barquez y col., 2006; Gardner, 2005, 2007)
DH – ZP, CHVI, PM	NO
ES – TM	NO
TM – ZP, CHVI, CHVELL	SI (Gaudin y Wible, 2006)

Tabla 3: Comparación entre los principales resultados obtenidos y la filogenia establecida para Xenarthra (DH: *D. hybridus*, CHVELL: *C. vellerosus*, CHVI: *C. villosus*, ZP: *Z. pichiy*, TT: *T. tetradactyla*, MT: *M. tridactyla*, PM: *P. maximus*, ES: *E. sexcinctus*, TM: *T. matacus*, CH: *C. hofmanni* y CD: *C. didactylus*).

Surge de esta tesis que en Xenarthra, tal como se demostró en estudios previos para otros vertebrados (Haslewood, 1967; Une y Hoshita, 1994; Moschetta y col., 2005; Hagey y col., 2010a), los perfiles de ácidos biliares tienden a conservarse dentro del Superorden, y también dentro de una misma familia o subfamilia. Sin embargo, al igual que en el resto de los mamíferos placentarios estudiados hasta la actualidad (Hagey y col., 2010a), posiblemente la repetida aparición de los ácidos biliares con estructura C24, como el ácido cólico y el quenodeoxicólico, presentes en todas las especies aquí estudiadas, limita la información filogenética respecto a la variación de los patrones de ácidos biliares, en las especies de Xenarthra. A futuro, sería necesario ampliar este análisis a otras especies del Superorden, a efectos de concluir el estudio de las relaciones filogenéticas, en el marco de los perfiles de ácidos biliares.

Estos resultados, los primeros de este tipo para el Superorden Xenarthra, constituyen un aporte para mejorar el conocimiento de la evolución de la síntesis de los ácidos biliares y de las relaciones filogenéticas de las especies estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- ABBA AM, GH CASSINI, G VALVERDE, M-K TILAK, SF VIZCAINO, M SUPERINA & F DELSUC (2015) Systematics of hairy armadillos and the taxonomic status of the Andean hairy armadillo (*Chaetophractus nationi*). *Journal of Mammalogy*:94: 673-689.
- ABRANTES EAL & LP BERGQVIST (2006) Proposta filogenética para os Dasypodidae (Mammalia: Cingulata). En: Gallo V, PM Brito, HMA Silva, FJ Figueiredo (eds). *Paleontología de Vertebrados: Grandes Temas e Contribuições Científicas*. Río De Janeiro, Interciencia Ltda. Pp. 261-274.
- BARQUEZ MR, MM DIAZ & RA OJEDA (2006) Mamíferos de Argentina. Sistemática y Distribución. SAREM. ISBN 987-98497-1-X. Pp. 358.
- CAPURRO AF, AJ NOVARO, A TRAVAINI & M ROMERO (1997) Improved bile acid thin layer chromatography to identify feces of Neotropical carnivores. *Journal of Wildlife Management* 61: 1424-1427.
- CARLINI AA & GJ SCILLATO-YANÉ (1996) *Chorobates recens* (Xenarthra, Dasypodidae) y un análisis de la filogenia de los Euphractini. *Revista del Museo de La Plata (N.S.)*, *Paleontología IX* 59: 225-238.
- CAZÓN AV & SS SÜHRING (1999) A technique for extraction and thin layer chromatography visualization of fecal bile acids applied to Neotropical felid scats. *Revista de Biología Tropical* 47: 245-249.
- CETICA PD, AJ SOLARI, MS MERANI, JC DE ROSAS & MH BURGOS (1998) Evolutionary sperm morphology and morphometry in armadillos. *Journal of Submicroscopic and Cytology and Pathology* 30: 309-314.
- DE JONG WW, A ZWEERS, KA JOYSEY, JT GLEAVES & D BOULTER (1985) Protein sequence analysis applied to Xenarthran and Pholidote phylogeny. En: Montgomery GG

- (ed). The evolution and ecology of armadillos, sloths and Vermilinguas. Smithsonian Institution, Washington DC. Pp. 65-76.
- DELSUC F & EJP DOUZERY (2008) Recent advances and future prospects in xenarthran molecular phylogenetics. En: Vizcaíno SF & WJ Loughry (eds). The Biology of the Xenarthra. University Press of Florida. Pp. 11-23.
- DELSUC F & EJP DOUZERY (2009) Armadillos, anteaters and sloths (Xenarthra). En: SB Hedges & S Kumar (eds). The timetree of life. Oxford University Press. Pp. 475-478.
- DELSUC F, FM CATZEFLIS, MJ STANHOPE & EJP DOUZERY (2001) The evolution of armadillos, anteaters and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: implications for the status of the enigmatic fossil *Eurotamandua*. Proceedings of the Royal Society of London B: 1605-1615.
- DELSUC F, M SCALLY, O MADSEN, MJ STANHOPE, WW DE JONG, FM CATZEFLIS, MS SPRINGER & EJP DOUZERY (2002) Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of character and taxon sampling on the placental tree rooting. Molecular Biology and Evolution 19: 1656-1671.
- DELSUC F, M SUPERINA, M-K TILAK, EJP DOUZERY & A HASSANIN (2012) Molecular phylogenetics unveils the ancient evolutionary origins of the enigmatic fairy armadillos. Molecular Phylogenetics and Evolution 62: 673-680.
- DELSUC F, MJ STANHOPE & EJP DOUZERY (2003) Molecular systematics of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): contribution of Maximum Likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 28: 261-75.
- DELSUC F, SF VIZCAINO & EJP DOUZERY (2004) Influence of Tertiary paleoenvironmental changes on the diversification of South American mammals: a relaxed molecular clock study within xenarthrans. BMC Evolutionary Biology 4: 11. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/4/11>.

- ENGELMANN GF (1985) The phylogeny of the Xenarthra. En: GG Montgomery (ed). The evolution and ecology of armadillos, sloths and Vermilinguas, Washington, DC, Smithsonian Institution. Pp. 51-63.
- GARDNER AL (2005) Order Cingulata, Order Pilosa. En: Wilson DE & DM Reeder (eds). Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. Third Edition, Volume 1. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. Pp. 94-102.
- GARDNER AL (2007) Magnorder Xenarthra. En: AL Gardner (ed). Mammals of South America. The University of Chicago Press, Chicago. Pp. 127-176.
- GAUDIN TJ & DG BRANHAM (1998) The phylogeny of the Myrmecophagidae (Mammalia, Xenarthra, Vermilingua) and the relationship of Eurotamandua to the Vermilingua. *Journal of Mammalian Evolution* 5: 237-265.
- GAUDIN TJ & JR WIBLE (2006) The phylogeny of living and extinct armadillos (Mammalia, Xenarthra, Cingulata): a craniodental analysis. En: Carrano MT, TJ Gaudin, RW Blob & JR Wible (eds). *Amniote paleobiology: perspectives on the evolution of mammals, birds and reptiles*. Chicago (IL): University of Chicago Press. Pp. 153-198.
- GAUDIN TJ (1999) The morphology of xenarthrous vertebrae (Mammalia, Xenarthra). *Fieldiana (Geology)* n.s. 41: 1-38.
- GREENWOOD AD, J CASTRESANA, G FELDMAIER-FUCHS & S PAABO (2001) A molecular phylogeny of two extinct sloths. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 94-103.
- GUERRERO C, L ESPINOZA, HM NIEMEYER & JA SIMONETTI (2006) Empleo del perfil de ácidos biliarios fecales para evaluar uso del hábitat por carnívoros amenazados en el bosque maulino de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 89-95.
- HAGEY LR (1992) Bile acid biodiversity in vertebrates: chemistry and evolutionary implication. Ph. D. thesis, University of California, San Diego, CA. Pp. 205.

- HAGEY LR, CD SCHTEINGART, H-T TON-NU & AF HOFMANN (1994) Biliary bile acids of fruit pigeons and doves (Columbiformes): presence of 10-hydroxychenodeoxycholic acid and conjugation with glycine as well as taurine. *Journal of Lipid Research* 35: 2041-2048.
- HAGEY LR, CD SCHTEINGART, HT TON-NU & AF HOFMANN (2002) A novel primary bile acid in the Shoebill stork and herons and its phylogenetic significance. *Journal of Lipid Research* 43: 685-690.
- HAGEY LR, DL CROMBIE, E ESPINOSA, MC CAREY, H IGIMI & AF HOFMANN (1993) Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *Journal of Lipid Research* 34: 1911-1917.
- HAGEY LR, N VIDAL, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2010a) Evolutionary diversity of bile salts in reptiles and mammals, including analysis of ancient human and extinct giant ground sloth coprolites. *BMC Evolutionary Biology* 10:133. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/133>.
- HAGEY LR, N VIDAL, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2010b) Complex evolution of bile salts in birds. *The Auk* 127(4): 820-831. doi:10.1525/auk.2010.09155.
- HAGEY LR, PR MOLLER, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2010c) Diversity of bile salts in fish and amphibians: evolution of a complex biochemical pathway. *Physiological Biochemistry Zoology* 83: 308-321.
- HASLEWOOD GAD (1967) *Bile salts*. Methuen & Co. Ltd., London. Pp. 116.
- HOFMANN AF & LR HAGEY (2014) Bile acid chemistry, biology, and therapeutics during the last 80 years: historical aspects. *Journal of Lipid Research* jlr-R049437.
- HOFMANN AF, LR HAGEY & MD KRASOWSKI (2010) Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *Journal of Lipid Research* 51: 226-246.

- HÖSS M, A DILLING, A CURRANT & S PÄÄBO (1996) Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myiodon darwini*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93: 181-185.
- KAKIYAMA G, A HOSODA, T IIDA, Y FUJIMOTO, T GOTO, N MANO, J GOTO & T NAMBARA (2006) A direct method for the separation and quantification of bile acid acyl glycosides by High-Performance Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector. Journal of Chromatography A 1125: 112-116.
- KRASOWSKI MD, K YASUDA, LR HAGEY & EG SCHUETZ (2005) Evolution of the pregnane X receptor: adaptation to cross-species differences in biliary bile salts. Molecular Endocrinology 19: 1720-1739.
- KREBS CJ (1989) Ecological methodology. Harper & Row, New York, USA. Pp. 654.
- LIN DS, WE CONNOR, LK NAPTON & RF HEIZER (1978) The steroids of 2000-year-old human coprolites. Journal of Lipid Research 19: 215-221.
- LOUGHRY WJ, PA PRODÖHL, CM MCDONOUGH & JC AVISE (1998) Polyembryony in armadillos. American Scientist 86: 274-279.
- MADSEN O, M SCALLY, CJ DOUADY CJ, DJ KAO, RW DEBRY, R ADKINS, HM AMRINE, MJ STANHOPE, WW DE JONG & MS SPRINGER (2001) Parallel adaptative radiations in two major clades of placental mammals. Nature 409: 610-614.
- MAREN M-K, F DELSUC, G CHURAKOV, C MARKER, M SUPERINA, J BROSIUS, EJP DOUZERY & J SCHMITZ (2007) Retroposed Elements and Their Flanking Regions Resolve the evolutionary History of Xenarthran Mammals (Armadillos, Anteaters, and Sloths). Molecular Biology and Evolution 24(11): 2573-2582.
- MC DONALD HG, RG DUNDAS & JC CHATTERS (2013) Taxonomy, paleoecology and taphonomy of ground sloths (Xenarthra) from the Fairmead Landfill locality

- (Pleistocene: Irvingtonian) of Madera County, California. *Quaternary Research* 79: 215-227.
- MC KENNA MC & SK BELL (1997) Classification of mammals above the species level. Columbia University Press, New York. Pp. 631.
- MC KENNA MC (1975) Toward a phylogenetic classification of the Mammalia. En: Lockett WP & FS Szalay (eds). *Phylogeny of the primates*. New York Plenum Press. Pp. 21-46.
- MÖLLER-KRULL M, F DELSUC, G CHURAKOV, C MARKER, M SUPERINA, J BROSIUS, EJP DOUZERY & J SCHMITZ (2007) Retroposed Elements and Their Flanking Regions Resolve the Evolutionary History of Xenarthran Mammals (Armadillos, Anteaters, and Sloths). *Molecular Biology and Evolution* 24(11): 2573-2582.
- MOSCHETTA A, F XU, LR HAGEY, GP VAN BERGE-HENEGOUWEN, KJ VAN ERPECUM, JF BROUWERS, JC COHEN, M BIERMAN, HH HOBBS, JH STEINBACH & AF HOFMANN (2005) A phylogenetic survey of biliary lipids in vertebrates. *Journal of Lipid Research* 46: 2221-2232.
- MURPHY WJ, E EIZIRICK, SJ O'BRIEN, O MADSEN, M SCALLY, CJ DOUADY, EC TEELING, OA RYDER, MJ STANHOPE, WW DE JONG & MS SRINGER (2001b) Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* 294: 2348-2351.
- MURPHY WJ, E EIZIRICK, WE JONHSON, YP ZHANG, OA RYDER & SJ O'BRIEN (2001a) Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* 409: 614-618.
- NOVACEK MJ (1992) Mammalian phylogeny: Shaking the tree. *Nature* 356: 121-125.

- O'LEARY MA, JI BLOCH, JJ FLYNN, TJ GAUDIN, A GIALLOMBARDO, NP GIANNINI y col. (2013) The placental mammal ancestor and the post-K-Pg radiation of placentals. *Science* 339: 662-667.
- PATTERSON B & R PASCUAL (1968) Evolution of mammals on southern continents. *Quarterly Review of Biology* 43: 409-451.
- PATTERSON B & RR PASCUAL (1972) The fossil mammal fauna of South America. En: Keast A, FC Erk, B Glass (eds). *Evolution, Mammals, and Southern Continents*. State University of New York Press, Albany, New York, USA. Pp. 247-309.
- PATTERSON B, W SEGALL & WD TURNBULL (1989) The ear region in xenarthrans (Edentata, Mammalia). Part I. Cingulates. *Fieldiana: Geology New Series* 18: 1-46.
- PATTERSON B, W SEGALL, WD TURNBULL & TJ GAUDIN (1992) The ear region in xenarthrans (Edentata, Mammalia). Part II. Sloths, anteaters, palaeonodons, and a miscellany. *Fieldiana: Geology New Series* 24: 1-79.
- PICTON HD & KC KENDALL (1994) Chromatographic (TLC) differentiation of grizzly bear and black bear scats. *International Conference Bear Research and Management* 9: 497-501.
- REISS KZ (1997) Myology of the feeding apparatus of myrmecophagid anteaters (Xenarthra: Myrmecophagidae). *Journal of Mammalian Evolution* 4: 87-117.
- REYES H (1994) Phylogenetic vision of bile acids. *Revista Médica de Chile* 122 (8): 944-950.
- ROSE KD & RJ EMRY (1993) Relationships of Xenarthra, Pholidota and fossil Edentates: the morphological evidence. En: FS Sazlay, MJ Novacek & MC McKenna (eds). *Mammal phylogeny (placentals)*. New York, Springer. Pp. 81-102.

- SCILLATO-YANÉ (1980) Catalogo de los Dasypodidae fósiles (Mammalia, Edentata) de la República Argentina. Actas del Segundo Congreso Argentino de Paleontología y Biostratigrafía y Primer Congreso Latinoamericano de Paleontología III: 7-36.
- SHOSHANI J & MC MCKENNA (1998) Higher taxonomic relationships among extant mammals based on morphology, with selected comparisons of results from molecular data. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 9: 572-584.
- SIMPSON GG (1945) The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 85: 1-350.
- SJOVALL J, WJ GRIFFITHS, KDR SETCHELL, N MANO & J GOTO (2010) Analysis of bile acids. En: HLJ Makin y DB Gower (eds.). *Steroid Analysis*, Springer Dordrecht Heidelberg, London, UK. Pp. 837-966.
- SUPERINA M, N PAGNUTTI & AM ABBA (2014) What do we know about armadillos? An analysis of four centuries of knowledge about a group of South American mammals, with emphasis on their conservation. *Mammal Review* 44: 69-80.
- UNE M & T HOSHITA (1994) Natural occurrence and chemical synthesis of bile alcohols, higher bile acids, and short side chain bile acids. *Hiroshima Journal of Medical Science* 43: 37-67.
- VAN DIJK M, E PARADIS, F CATZEFLIS & WW DE JONG (1999) The virtues of gaps: Xenarthran (Edentate) monophyly supported by a unique deletion in aA-crystallin. *Systematic Biology* 48: 94-106.
- VIZCAINO SF (1995) Identificación específica de las "mulitas", género *Dasypus* (Mammalia, Dasypodidae), del noroeste argentino. Descripción de una nueva especie. *Mastozoología Neotropical* 2: 5-13.

WEBB SD (1985) The interrelationships of tree sloths and ground sloths. En: GG Montgomery (ed). The evolution and ecology of armadillos, sloths and Vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington DC. Pp. 105-112.

WETZEL RM (1985) Taxonomy and distribution of armadillos, Dasypodidae. En: Montgomery GG (ed). The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington. Pp. 23-46.

CAPÍTULO VI



DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

En esta tesis, se establecieron los patrones de ácidos biliares fecales de todas las especies de *Xenarthra* estudiadas (*Z. pichiy*, *C. vellerosus*, *C. villosus*, *D. hybridus*, *T. tetradactyla*, *M. tridactyla*, *P. maximus*, *T. matacus*, *E. sexcinctus*, *C. didactylus* y *C. hofmanni*), tanto por TLC como por HPLC.

Consistentemente con lo observado en trabajos previos para otros mamíferos no xenartros (Capurro y col., 1997; Fernández y col., 1997; Taber y col., 1997; Cazón y Sühring, 1999; Yeh y Hwang 2001; Zhang y col., 2001; Guerrero y col., 2006; Khorozyan y col., 2007; Saric y col., 2007), dichos patrones resultaron ser especie-específicos y fueron consistentes entre diferentes individuos de la misma especie.

Se estableció así, para *Xenarthra*, que la determinación cromatográfica de los ácidos biliares fecales es un método preciso para la identificación específica de heces, siendo, por tanto, una valiosa herramienta ecológica.

Dicha herramienta resulta útil cuando se trabaja con animales elusivos, o difíciles de observar y capturar. Asimismo, en el caso de las especies de *Xenarthra* estudiadas, es particularmente útil debido a que, muchas veces, sus heces se encuentran mezcladas con el sustrato, parcial o totalmente degradadas, lo que impide una correcta identificación visual de las mismas (por características externas).

Si bien se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de los ácidos biliares en muestras de distintos individuos de una misma especie, no se alteró el patrón de presencia/ausencia de los mismos, ni en machos ni en hembras de una misma especie, tanto por TLC como por HPLC.

Con respecto a la edad, en esta tesis no fue posible analizar ese factor, debido a que todos los individuos muestreados provenientes de cautiverio y de capturas eran adultos y para

las heces colectadas a campo que no provinieron de capturas de animales, no fue posible estimar la edad de los individuos. Otro aspecto interesante es que no se encontraron diferencias en los perfiles de ácidos biliares fecales, determinados por TLC y HPLC, a lo largo del día, ni en días diferentes, para un mismo individuo de una misma especie, al menos para *C. villosus*, única especie que pudo estudiarse de esta forma, en cautiverio.

Respecto al tipo de dieta, en este trabajo no se observó que la misma influyera en el patrón de ácidos biliares fecales de las especies estudiadas, debido a que las heces de individuos silvestres (alimentación natural) y de cautiverio (alimentados con alimento balanceado) de una misma especie, conservaron el perfil. Al respecto, se ha encontrado que una mayor complejidad en el perfil de sales biliares no se relaciona con una mayor variabilidad en la dieta de algunas especies de reptiles y mamíferos, y, en general, los ácidos biliares más comunes tales como el CA y CDCA, se encuentran en especies con dietas muy variadas (Hagey y col., 2010a).

En esta tesis, las dos técnicas utilizadas, TLC y HPLC, resultaron ser complementarias en la determinación de los perfiles de ácidos biliares fecales, con una primera visualización de los compuestos presentes a través de TLC, y la resolución de otros compuestos por HPLC.

Por un lado, la TLC evidenció ventajas tales como su relativa simplicidad, los cortos tiempos de análisis, la practicidad en la operación y el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Más aún, la selectividad de la separación por TLC permitió que, en una única corrida cromatográfica, se pudieran separar y visualizar ácidos biliares libres y conjugados. Sin embargo, no fue posible la resolución de ciertos pares de compuestos con valores de R_f muy cercanos entre sí.

Las ventajas más importantes de la HPLC fueron su precisión, mayor resolución que la TLC, alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, requirió de mayores tiempos de análisis debido a que el sistema utilizado permitió la inyección de una única muestra por vez.

Con la aplicación de la HPLC, no sólo se pudo corroborar la presencia de los compuestos hallados por TLC, sino que se logró la identificación de otros compuestos y la resolución de pares críticos para la TLC, demostrando la alta sensibilidad y especificidad de la técnica. No obstante, una desventaja que presentó el análisis por HPLC fue la limitada sensibilidad de la detección UV para los ácidos biliares libres, al igual que fue reportado en otras investigaciones (Roda y col., 1992; Kakiyama y col., 2014; Hofmann y Hagey, 2014), los cuales se pudieron visualizar y resolver con la aplicación de la TLC.

Finalmente, los resultados presentados en esta tesis representan el primer aporte al estudio de las relaciones filogenéticas en *Xenarthra* mediante la utilización de los patrones de ácidos biliares fecales, la mayoría de los cuales reflejaron las relaciones filogenéticas establecidas para el grupo.

Al respecto, las especies de *Xenarthra* estudiadas mostraron perfiles de ácidos biliares del tipo VI, cuya composición es de un 90% o más de ácidos biliares con estructura C24 (Hagey y col., 2010a; Hofmann y col., 2010). En consecuencia, como ocurre en otros mamíferos, el alto porcentaje de ocurrencia de los ácidos biliares primarios CA y CDCA, limitaría la información filogenética que se podría obtener acerca de la variación entre especies. Es por ello que, para obtener una visión completa de la evolución de los perfiles de ácidos biliares en *Xenarthra*, es necesario ampliar el análisis a otras especies no incluidas en esta tesis. Asimismo, se prevé estudiar, por técnicas analíticas confirmatorias, específicamente HPLC-MS/MS, los compuestos hallados por TLC y HPLC en las distintas especies.

Consideraciones finales

La determinación de los ácidos biliares en distintas muestras biológicas, particularmente las heces, no solo posee interés teórico y biológico, sino también clínico. Particularmente, su cuantificación es una herramienta para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares y desórdenes del metabolismo lipídico y del tracto gastrointestinal (Meance y col., 2003; Shin y col., 2013; Ajouz y col., 2014; Ri Si y col., 2014; Duan y col., 2014). Esta tesis posibilitaría el desarrollo de líneas de investigación que consideren el estudio de los perfiles de ácidos biliares en armadillos, como posibles modelos para el estudio de dichas patologías.

Las técnicas cromatográficas, como la TLC y HPLC, son las elegidas para identificar los ácidos biliares en muestras biológicas.

Esta tesis constituye el estudio primer de los patrones de ácidos biliares fecales en especies del Superorden Xenarthra. Asimismo, se ha establecido la validez de la determinación cromatográfica de los patrones de ácidos biliares fecales para la diferenciación de las especies de este grupo.

Considerando la escasez de información disponible acerca de algunos aspectos ecológicos y biológicos del Superorden Xenarthra, estos resultados podrían ser muy importantes para futuros estudios de conservación, distribución y eco-fisiología del grupo.

Los patrones de ácidos biliares fecales especie-específicos ofrecerían información valiosa acerca de la presencia y distribución de las especies en sus ambientes naturales, en estudios ecológicos y de uso de hábitat y para la elaboración de planes de manejo y estrategias de conservación para las especies estudiadas, muchas de las cuales se encuentran actualmente bajo algún grado de amenaza en Argentina.

CONCLUSIONES

De esta tesis surge que:

- Se establecieron los patrones de ácidos biliares fecales de todas las especies del Superorden Xenarthra estudiadas, por TLC y HPLC: *Z. pichiy*, *C. vellerosus*, *C. villosus*, *D. hybridus*, *T. tetradactyla*, *M. tridactyla*, *P. maximus*, *T. matacus*, *E. sexcinctus*, *C. didactylus* y *C. hofmanni*.
- Los patrones de ácidos biliares fecales resultaron ser especie-específicos para las especies de Xenarthra estudiadas.
- No se encontraron diferencias en los perfiles de ácidos biliares fecales entre individuos de cautiverio y silvestres; ni entre machos y hembras para una misma especie.
- Las técnicas utilizadas, TLC y HPLC, resultaron ser complementarias para la determinación de los perfiles de ácidos biliares fecales de las especies estudiadas; ambas presentaron ventajas y desventajas para este estudio y posibilitaron la obtención de los perfiles identificatorios de cada especie.
- La TLC resultó ser una técnica útil, de costo relativamente bajo y rápida para el análisis de los perfiles de ácidos biliares fecales. Sin embargo, presentó ciertas limitaciones en la resolución de los ácidos biliares tauroconjugados.

- La HPLC demostró ser una técnica más resolutive y sensible que la TLC, permitiendo la separación e identificación de los ácidos biliares tauroconjugados, y de otros compuestos no visualizados por TLC.

- Los valores de similitud entre los patrones de ácidos biliares fecales de todas las especies estudiadas reflejaron, en su mayoría, las relaciones filogenéticas establecidas previamente por otros autores, para el Superorden Xenarthra.

- La mayoría de las heces incógnita colectadas a campo fueron correctamente identificadas a través del perfil de ácidos biliares fecales de cada especie.

- El análisis cromatográfico de los patrones de ácidos biliares fecales resulta una herramienta útil para futuros estudios ecológicos, de distribución y uso de hábitat del Superorden Xenarthra.

BIBLIOGRAFÍA

- AJOUZ H, MUKHERJI D & SHAMSEDDINE A (2014) Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 12: 164.
- CAPURRO AF, AJ NOVARO, A TRAVAINI & M ROMERO (1997) Improved bile acid thin layer chromatography to identify feces of Neotropical carnivores. *Journal of Wildlife Management* 61: 1424-1427.
- CAZÓN AV & SS SÜHRING (1999) A technique for extraction and thin layer chromatography visualization of fecal bile acids applied to Neotropical felid scats. *Revista de Biología Tropical* 47: 245-249.
- DUAN D, A CHEN, S PENG, J YIN, T YANG, R DONG, K TAN, Y CHEN, J LU & X DU (2014) Explanation of colon cancer pathophysiology through analyzing the disrupted homeostasis of bile acids. *African Health Sciences* 14(4): 925-928.
- FERNANDEZ GJ, JC CORLEY & AF CAPURRO (1997) Identification of cougar and jaguar feces through bile acid chromatography. *Journal of Wildlife Management* 61: 506-510.
- GUERRERO C, L ESPINOZA, HM NIEMEYER & JA SIMONETTI (2006) Empleo del perfil de ácidos biliares fecales para evaluar uso del hábitat por carnívoros amenazados en el bosque maulino de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 89-95.
- HAGEY LR, N VIDAL, AF HOFMANN & MD KRASOWSKI (2010a) Evolutionary diversity of bile salts in reptiles and mammals, including analysis of ancient human and extinct giant ground sloth coprolites. *BMC Evolutionary Biology* 10: 133.
- HOFMANN AF & LR HAGEY (2014) Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *Journal of Lipid Research* 55: 1553–1595.

- HOFMANN AF, LR HAGEY & MD KRASOWSKI (2010) Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *Journal of Lipid Research* 51: 226-246.
- KAKIYAMA G, A MUTO, H TAKEI, H NITTONO, T MURAI, T KUROSAWA, AF HOFMANN, WM PANDAK & JS BAJAJ (2014) Development of a simple and accurate method for measurement of fecal bile acids: validation by GC-MS and LC-MS and application in healthy and cirrhotic patients. *Journal of Lipid Research* doi: 10.1194/jlr.D047506
- KHOROZYAN IG, AV CAZON, AG MALKHASYAN & AV ABRAMOV (2007) Using Thin-Layer Chromatography of Fecal Bile Acids to Study the Leopard (*Panthera pardus ciscaucasica*) Population. *Biology Bulletin* 34: 361-366.
- MEANCE S, MC BOUTRON-RUAULT, A MYARA, MF GERHARDT, P MARTEAU, A LAVERGNE, C FRANCHISSEUR, C BOULEY & The Danpolyp Study Group (2003). Fecal primary bile acids and serum cholesterol are associated with colorectal adenomas. *Digestive Diseases and Sciences* 48(9): 1751-1757.
- RI SI GL, P YAO & L SHI (2014) Rapid determination of bile acids in bile from various mammals by Reversed-Phase Ultra-Fast Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* doi: 10.1093/chromsci/bmu167.
- RODA A, C CERRE, P SIMONI, C POLIMENI, C VACCARI & A PISTILLO (1992) Determination of free and amidated bile acids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering mass detection. *Journal of Lipid Research* 33: 1393-1402.
- SARIC J, Y WANG, J LI, M COEN, J UTZINGER, JR MARCHESI, J KEISER, K VESELKOV, JC LINDON, JK NICHOLSON & ELAINE HOLMES (2007) Species

Variation in the Fecal Metabolome Gives Insight into Differential Gastrointestinal Function. *Journal of Proteome Research* 7: 352-360.

SHIN A, M CAMILLERI, P VIJAYVARGIYA, I BUSCIGLIO, D BURTON, M RYKS, D RHOTEN, A LUEKE, A SAENGER, A GIRTMAN & AR ZINSMEISTER (2013) Bowel functions, fecal unconjugated primary and secondary bile acids, and colonic transit in patients with irritable bowel syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 11(10): 1270-1275.

SJÖVALL J, WJ GRIFFITHS, KDR SETCHELL, N MANO&J GOTO (2010) Chapter 10: Analysis of Bile Acids. En: Makin HLJ & Gower DB (eds). *Steroid Analysis*. Springer, 2nd ed. Pp. 837-966.

TABER AB, AJ NOVARO, N NERIS & FH COLMAN (1997) The food habits of sympatric jaguar and puma in the Paraguayan Chaco. *Biotropica* 29: 204-213.

YEH YH & DF HWANG (2001) High-Performance Liquid Chromatographic determination for bile components in fish, chicken and duck. *Journal of Chromatography B* 751: 1-8.

ZHANG C, SB BROWN & TJ HARA (2001) Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycush*) function as chemical signals. *Journal of Comparative Physiology B* 171: 161-171.