

**EVALUACIÓN DE LA TRANSFERENCIA PLACENTAL DE LÍPIDOS
EN EL LAGARTO VIVÍPARO *Mabuya* sp. EN DIFERENTES
ESTADOS EMBRIONARIOS**

ELKIN DARÍO RUEDA PARRA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**EVALUACIÓN DE LA TRANSFERENCIA PLACENTAL DE LÍPIDOS
EN EL LAGARTO VIVÍPARO *Mabuya* sp. EN DIFERENTES
ESTADOS EMBRIONARIOS**

ELKIN DARÍO RUEDA PARRA

**Trabajo de investigación
presentado como requisito
parcial para optar al título de
Magíster en Química**

**Directoras: Elena E. Stashenko,
Química, Ph.D.**

**Martha Patricia Ramírez Pinilla
Bióloga, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

DEDICATORIA

A DIOS, mi fortaleza y refugio espiritual;

A mi hijo Juan Sebastián, inspiración de mi vida;

A mi Esposa Mireya, compañera incondicional, quien me apoya y confía ciegamente;

A mis padres, Ana Dolores y Rodolfo (Q.E.P.D.); que se esmeraron por darme lo mejor y porque creyeron en mí;

A mis Hermanos y sobrinos a quienes quiero.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento sincero a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización del presente trabajo de investigación, especialmente a:

A la Dra Elena Stashenko, por su confianza, por sus excelentes aportes como docente, directora y jefe;

A la Dra Martha Patricia Ramírez, por sus consejos, su apoyo oportuno e incondicional, por sus oportunas, rápidas y valiosísimas correcciones del plan y de la tesis;

A los calificadores de este trabajo de investigación: al profesor Rodrigo Torres y en especial a la doctora Aidé Perea, con quien pude contar en los momentos de incertidumbre y por brindarme su amistad;

Al Dr Jairo Rene por sus aportes académicos;

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Cromatografía, quienes me colaboraron y ayudaron durante estos años de permanencia en el laboratorio;

A los estudiantes del Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la UIS, Francisca, Oscar, Ezequiel y Juan Carlos, quienes con su valiosa colaboración, recolectaron las *Mabuya* sp., requeridas en esta investigación;

A mis profesores, por su excelente labor docente;

A mí maltratado y humillado pueblito colombiano, quien sustentó económicamente parte de mi carrera,

A COLCIENCIAS por su aporte económico para el desarrollo de este proyecto (UIS-COLCIENCIAS, contrato número 1102-05-13556);

Y, a mi *Alma Mater* – Universidad Industrial de Santander-.

ABREVIATURAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Asociación Oficial de Químicos Analíticos)
CE	<i>Cholesterol esthers</i> (Ésteres de colesterol)
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos)
EFA	<i>Essential Fatty Acid</i> [Ácido(s) graso(s) esencial(es)]
FA	<i>Fatty Acid</i> [Ácido(s) graso(s)]
FC	<i>Free Cholesterol</i> (Colesterol libre)
FFA	<i>Free Fatty Acids</i> (Ácidos grasos libres)
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
FLD	<i>Fluorescence Detector</i> (Detector de fluorescencia)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases, cromatógrafo de gases, según el contexto)
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
PUFA	<i>Polyinsaturated Fatty Acids</i> (Ácidos grasos poliinsaturados)
PL	<i>Phospholipids</i> (Fosfolípidos)
SFA	<i>Saturated Fatty Acids</i> (Ácidos grasos saturados)
TAG	<i>Triacylglycerols</i> (Triacilglicéridos)
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa delgada)
TFA	<i>Total Fatty Acids</i> (Ácidos grasos totales)
t _R	<i>Tiempo de retención</i>

GLOSARIO DE TÉRMINOS HERPETOLÓGICOS

Amniótico	Tipo de huevo, presenta al amnios, amnion o segunda membrana extraembrionaria del huevo, contiene el líquido amniótico y proporciona un medio líquido para el desarrollo del embrión.
Embrión	Organismo en vías de desarrollo, a partir del huevo fertilizado hasta la formación de un individuo capaz de vida autónoma y activa.
Herpetología	Ciencia que estudia los anfibios y los reptiles.
Lecitotrofia	La nutrición embrionaria depende en su totalidad de los nutrientes presentes en la yema o vitelo del huevo.
Matrotrofia	La nutrición del embrión depende en gran medida del aporte materno extra-vitelino.
Neonato	Dícese de un ser vivo que acaba de nacer.
Ovíparo	Que se reproduce mediante huevos.
Placentotrofia	Intercambio materno – fetal de nutrientes a través de la placenta.
Vitelo	Yema; materia nutritiva, no viva, contenida en el huevo.
Vivíparo	Animales cuyas crías nacen ya desarrolladas y sin envoltura.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes biológicos de <i>Mabuya</i> sp.	4
1.2. Intercambio de nutrientes, madre-embrión.	5
1.3 Lípidos	10
1.3.1 Clasificación de los lípidos.	10
1.3.2 Extracción de lípidos.	11
1.4 Ácidos grasos.	11
1.4.1 Características estructurales de los ácidos grasos.	11
1.4.2. Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.	13
2 PARTE EXPERIMENTAL	15
2.1 Identificación de las muestras.	15
2.2 Área de estudio.	15
2.3 Recolección de las muestras.	16
2.4 Preparación de las muestras.	18
2.5 Extracción de lípidos totales y obtención de las fracciones lipídicas.	18
2.6 Análisis de ácidos grasos.	19
2.6.1 Conversión de ácidos grasos a sus ésteres metílicos.	19
2.6.2 Identificación de ácidos grasos.	20
2.6.3 Cuantificación de ácidos grasos.	20
2.6.4 Parámetros analíticos de GC-FID.	20
2.7 Análisis de colesterol total.	20
2.7.1 Saponificación de la muestra.	21
2.7.2 Preparación del acetato de colesterol.	21

2.7.3	Cuantificación de colesterol.	22
2.7.4	Parámetros analíticos de GC-MS.	22
2.8	Análisis de vitaminas liposolubles, A y E.	22
2.8.1.	Identificación de vitaminas A y E.	23
2.8.2.	Cuantificación de vitaminas A y E.	23
2.8.3.	Parámetros analíticos de RP-HPLC.	24
2.9	Tratamiento estadístico de los resultados.	25
3	ANÁLISIS DE RESULTADOS	26
3.1	Índice de placentotrofia, pesos húmedo y seco del lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	26
3.2	Lípidos transferidos en el lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	29
3.2.1	Grasa total y porcentaje de grasa.	29
3.2.2	Evaluación de las figuras de mérito para los FA.	31
3.2.2.1	Repetibilidad de tiempos de retención (t_R).	31
3.2.2.2	Niveles mínimos de detección y repetibilidad de áreas cromatográficas.	34
3.2.2.3	Reproducibilidad de la extracción, derivación y cuantificación de FA en muestras reales.	36
3.2.3	FA presentes en las fracciones lipídicas mayoritarias del lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	39
3.2.3.1	Perfiles de FA de TAG de <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	40
3.2.3.2	Perfiles de FA de PL de <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	45
3.2.3.3	Perfiles de FA en la fracción de CE para <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	48

3.2.3.4	Perfiles de FFA presentes en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	51
3.2.3.5	Cantidad absoluta de TFA presentes en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	54
3.2.4	Identificación de FA en las fracciones lipídicas de TAG y PL extraídas de <i>Mabuya</i> sp. mediante MS.	57
3.2.5	Colesterol presente en el lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	60
3.2.6	Vitaminas liposolubles (A y E) presentes en el lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	65
4	CONCLUSIONES	69
5	RECOMENDACIONES	72
	BIBLIOGRAFÍA	73
	Anexo 1. Divulgación de resultados parciales.	82
	Anexo 2. Parámetros analíticos de GC-FID.	83
	Anexo 3. Parámetros analíticos de GC-MS.	84
	Anexo 4. Parámetros analíticos de RP-HPLC-DAD/FLD.	85
	Anexo 5. Cromatograma obtenido por GC-FID de la mezcla certificada de FAME y las curvas de calibración.	86
	Anexo 6. Cantidad relativa promedio (%) de FA en las fracciones lipídicas mayoritarias presentes en la grasa extraída de huevo de tortuga.	100
	Anexo 7. Cantidad absoluta promedio ($\mu\text{g}/\text{muestra}$) de FA en las fracciones lipídicas para los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	101
	Anexo 8. Corriente iónica reconstruida (TIC) del derivado acetilado de colesterol de referencia, junto con su fragmentograma y la curva de calibración.	105

Anexo 9. Cromatogramas de las vitaminas A y E obtenidos por HPLC/DAD/FLD y las curvas de calibración.

107

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Fotografía del lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. 4
Figura 2	Fotografía de embriones tempranos y embriones en el último estado de gestación del lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. 5
Figura 3	Fotografía del neonato y embriones en diferentes estados de desarrollo del lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. 17
Figura 4	Dispositivo utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación. 19
Figura 5	Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies</i> 6890N, equipado con un FID. 21
Figura 6	Cromatógrafo de gases HP 5890A <i>Series</i> II, equipado con un detector selectivo de masas HP 5972. 23
Figura 7	Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent 1100 Series</i> , equipado con un DAD y un FLD. 24
Figura 8	Pesos húmedo y seco del lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios. 27
Figura 9	Cromatograma típico de la mezcla certificada de ésteres metílicos de ácidos grasos de referencia 34
Figura 10	Cromatograma típico de los TFA presentes en grasa extraída de huevos de tortuga. 39
Figura 11	Cromatograma típico de los FA presentes en la fracción de los TAG del neonato de <i>Mabuya</i> sp. 44
Figura 12	Cromatograma típico de los FA presentes en la fracción de PL del neonato de <i>Mabuya</i> sp. 47

Figura 13	Cromatograma típico de los FA presentes en la fracción de CE del neonato de <i>Mabuya</i> sp.	50
Figura 14	Cromatograma típico de FFA presentes en el neonato de <i>Mabuya</i> sp.	51
Figura 15	Espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico, EI (70 eV).	58
Figura 16	Espectro de masas del éster metílico del ácido oleico, EI (70 eV).	59
Figura 17	Cantidad de FC y CE en el lagarto vivíparo <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	61
Figura 18	Corriente iónica total (TIC) del derivado acetilado de colesterol presente en el neonato y el del material de referencia certificado de acetato de colesterilo, junto con su fragmentograma.	62
Figura 19	Cromatogramas del extracto obtenidos del neonato por HPLC/DAD/FLD, así como los de las vitaminas A y E de referencia.	68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Proporción de las principales clases de lípidos en huevos de lagartos ovíparos y vivíparos.	9
Tabla 2 Clasificación de los lípidos según su estructura química.	10
Tabla 3 Ácidos grasos saturados más comunes en fuentes naturales.	12
Tabla 4 Ácidos grasos insaturados de importancia fisiológica y nutricional.	13
Tabla 5 Índice de placentotrofia, pesos húmedo y seco (mg/muestra) de las muestras bajo estudio.	26
Tabla 6 Índice de placentotrofia y masa seca de huevos recientemente ovulados y neonatos en lagartos de la familia Scincidae.	28
Tabla 7 Cantidad y porcentaje de grasa total en neonatos y huevos de <i>Mabuya</i> sp. en diferentes estados embrionarios.	29
Tabla 8 Estudio de la repetibilidad de los tiempos de retención (t_R) de ésteres metílicos de ácidos grasos.	32
Tabla 9 Niveles mínimos de detección del FID y repetibilidad (%CV) de las áreas de la mezcla certificada de los FAME.	35
Tabla 10 Cantidad relativa promedio (%) de TFA presentes en grasa de huevo de tortuga empleada para el estudio de la reproducibilidad de la metodología utilizada.	37
Tabla 11 Cantidad y proporción relativa promedio de FA en las fracciones de TAG en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	41

Tabla 12	Cantidad y proporción relativa promedio de FA en las fracciones de PL en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	45
Tabla 13	Cantidad y proporción relativa promedio de FA en las fracciones de CE en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	49
Tabla 14	Cantidad y proporción relativa promedio de FFA en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	53
Tabla 15	Cantidad absoluta promedio (μg FA/embrión o neonato) de TFA en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp	56
Tabla 16	Cantidad de colesterol libre (FC) y colesterol esterificado (CE) en los diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	60
Tabla 17	Cantidad y proporción de FC y CE en huevos y neonatos de lagartos ovíparos y vivíparos que presentan diferentes modos de paridad.	64
Tabla 18	Cantidad de vitaminas A y E presentes en diferentes estados embrionarios de <i>Mabuya</i> sp.	65

**TITULO* : EVALUACIÓN DE LA TRANSFERENCIA PLACENTAL DE LÍPIDOS EN
EL LAGARTO VIVÍPARO *Mabuya sp* EN DIFERENTES ESTADOS
EMBRIONARIOS**

AUTOR: ELKIN DARÍO RUEDA PARRA **

Palabras Claves: *Mabuya sp.*, placentotrofía, viviparidad, neonato, lípidos, FAME.

Las especies del género *Mabuya* (familia Scincidae), distribuidas en el continente americano, son las especies de escamados que evolutivamente han alcanzado el mayor nivel de complejidad placentaria (tipo IV) entre Reptilia, convergiendo con el que define y es característico de los mamíferos eutherios. Sus huevos microlecitos (1-2 mm) que poseen una mínima cantidad de yema, sugieren que virtualmente todos los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario, son transferidos por la madre a través de la placenta. Para determinar de manera indirecta el paso de lípidos a través de la placenta durante la gestación en una población andina de *Mabuya sp.*, en esta investigación se cuantificó la toma neta de lípidos (vitaminas A y E, colesterol y ácidos grasos) durante la gestación empleando técnicas cromatográficas.

La determinación del contenido de colesterol y ácidos grasos en las fracciones lipídicas mayoritarias presentes en los estados embrionarios de *Mabuya sp.*, se realizó por GC-MS y GC-FID, respectivamente. La extracción de éstos últimos, se realizó en dos etapas a saber: la primera consistió en la extracción de la fracción lipídica con solventes (diclorometano-metanol, 2:1 vol/vol), seguido del fraccionamiento de los lípidos mediante cromatografía en capa delgada (TLC). En la segunda etapa, los acil lípidos fueron convertidos a sus correspondientes ésteres metílicos (FAME`s), utilizando BF₃ metanólico. La extracción del colesterol se realizó por saponificación directa del material lipídico, seguido por la obtención de su derivado acetilado. La determinación de vitaminas liposolubles, se realizó empleando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), directamente sobre la grasa extraída.

Las metodologías utilizadas permitieron estimar el transporte neto de lípidos de la madre al embrión a través de la placenta durante la gestación y el perfil lipídico en todos los estados embionarios analizados. El índice de placentotrofía es el mayor conocido para reptiles escamados y similar a las de otras especies del género estudiadas en Brasil. Los resultados encontrados indican una clara evidencia de que sí hay lípidos lecitotróficos en esta especie, aunque en una mínima cantidad.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Maestría en Química, Directoras: Dras. Elena E. Stashenko, Ph. en Química y Martha Patricia Ramírez, Ph. en Biología.

TITLE*: Placental analysis of lipids in lizard viviparous *mabuya sp* in different states embryonarios

AUTHOR: ELKIN DARÍO RUEDA PARRA **

Palabras Claves: *Mabuya sp.*, placentotrophy, viviparity, neonate, lipids, FAME.

Skinks of *Mabuya* genus (Scincidae) distributed in Neotropical America exhibit the most specialized allantoplacenta among squamates (type IV), and the greatest degree of placentotrophy known in Reptilia, converging to what is know for eutherian mammals. They ovulate microlecithal eggs (1–2 mm) that lack fatty yolk platelets; thus, it is suggested that virtually all of the nutrients for embryonic development are obtained by placental means. To test this inference, the net uptake of lipids during gestation in an Andean population of *Mabuya* was quantified and compared with other oviparous and viviparous lizards, matrotrophic skinks, and eutherian mammals.

Determiration of cholesterol and fatty acid (FA) contets in major lipidic fractions (TAG`s, PL, FC, CE y FFA) present in eggs at different embryonic stages and in neonates was performed by GC-MS y GC-FID respectively. The extraction of the latter was done in two phases: extraction of the lipidic fraction with solvents (dichlorometane-methanol 2:1 vol/vol) followed by its fractioning in the main lipidic classes by means of thin layer chromatography (TLC). In the second phase, those FA of the lipidic fractions were converted to their correspondant methilic esthers (FAME`s), using methanolic BF₃. Cholestherol extraction was done by direct saponification of the lipidic material, followed by the obtention of its acetil derivative. The liposoluble vitamins were determined using reverese-phase high resolution liquid chromatography (RP-HPLC).

This methodology allowed the estimation of the net transfer of lipids from the mother to the embryo through the placenta during gestation, and the lipid profile in all the studied embryonic stages. The placentotrophic index was the highest known for Squamata reptiles and close to those of the other species of *Mabuya* genus in Brazil. These results also indicated that there are lecithotrophic lipids in this species, although they are present in minimal quantities.

* Research study

** Faculty of Science, master of chemistry, Directoras: Dras. Elena E. Stashenko, Ph. Chemistry and Martha Patricia Ramírez, Ph. Biology.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Mabuya* (familia Scincidae), distribuidas en el continente americano, son las especies de escamados que evolutivamente han alcanzado el mayor nivel de complejidad placentaria entre Reptilia, convergiendo con el que define y es característico de los mamíferos eutherios (Vitt y Blackburn, 1991; Blackburn y Vitt, 2002). Las especies de este género han sido poco estudiadas, y los trabajos sobre placentación realizados en estos lagartos vivíparos, se han llevado a cabo sobre dos especies brasileñas y una población colombiana (Blackburn *et al.*, 1984; Blackburn y Vitt, 1992). En esta última se estudiaron aspectos de su actividad reproductiva anual (Ramírez-Pinilla *et al.*, 2002), hábitos alimenticios (Caicedo, 2003), estructura ovárica (Gómez y Ramírez-Pinilla, 2004), estructura y ultraestructura de la placenta madura (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001; Ramírez-Pinilla *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007), la ontogenia de las membranas extraembrionarias y de la placentación (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2003), y el paso de nutrientes durante la gestación (Ramírez-Pinilla, 2006). Estos estudios han mostrado nuevas características ecológicas y morfofisiológicas relacionadas con su patrón nutricional embrionario placentotrófico, que son particulares a esta especie y aparentemente comunes para el linaje americano del género, y que subrayan su particularidad evolutiva dentro de Reptilia.

En las especies de *Mabuya*, como en los mamíferos eutherios, se ha establecido un tipo de matrotrofia estricta, la placentotrofia obligada, que se caracteriza porque todos los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario son suministrados por la madre a través de la placenta de tal forma que el ovocito es entonces de tamaño muy pequeño, porque no acumula vitelo en forma sustancial (Blackburn *et al.*, 1984; Gómez y Ramírez-Pinilla, 2004). Este grado de placentotrofia en las especies americanas excede todos los otros casos conocidos para los reptiles escamados y converge en un patrón usualmente reconocido sólo

en mamíferos eutherios (Blackburn y Vitt, 2002), haciendo de estas especies un taxón modelo para el estudio de la evolución de la viviparidad y la placentotrofia.

Aunque se ha demostrado y cuantificado la transferencia placentar de nutrientes, incluyendo iones y materia orgánica (Ramírez-Pinilla, 2006), no se ha determinado y cuantificado el paso de lípidos desde la madre al feto durante la gestación en este linaje. De esta manera, el objetivo fundamental de este trabajo de investigación, consistió en la determinación cuantitativa de los lípidos transferidos por la madre a través de la placenta (vitaminas A y E, colesterol, ácidos grasos (FA) en sus fracciones lipídicas mayoritarias – triacilglicéridos (TAG), fosfolípidos (PL), colesterol libre (FC), ésteres de colesterol (CE) y ácidos grasos libres (FFA)-), así como de aquellos que se originan durante el desarrollo embrionario de una población andina de *Mabuya* sp. Las determinaciones se realizaron para los diferentes estados embrionarios durante la gestación y hasta el nacimiento, con el propósito de conocer cuándo y en qué cantidad se da el paso de los diferentes lípidos durante el desarrollo embrionario, contribuyendo al conocimiento detallado de su patrón nutricional.

La determinación del contenido de colesterol y FA en las fracciones lipídicas mayoritarias (TAG, PL, FC, CE y FFA) de los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp., se realizó por cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y detector de ionización en llama (FID), respectivamente. La extracción de los lípidos a partir de las muestras bajo estudio, se realizó en dos etapas, a saber: La primera, consistió en la extracción de la fracción lipídica con una mezcla de diclorometano-metanol (2:1), según el método descrito por Thompson *et al.* (1999 a, b, c); El extracto obtenido se fraccionó mediante cromatografía en capa delgada (TLC), en las mayores clases lipídicas. En la segunda etapa, los FA de las fracciones lipídicas se convirtieron a sus correspondientes ésteres metílicos (FAME), utilizando el complejo trifluoruro de

boro en metanol como catalizador. El colesterol se extrajo mediante saponificación directa del material lipídico, seguido de la obtención de su derivado acetilado.

La identificación del colesterol y los FA en las fracciones lipídicas mayoritarias de huevos en diferentes estados embrionarios y neonatos de *Mabuya* sp., se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) del acetato de colesterilo y ésteres metílicos de ácidos grasos, con los de estándares certificados, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas. La confirmación estructural de los analitos se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos con los de las bases de datos o de los materiales de referencia.

Se evaluó también el contenido de vitaminas A y E, directamente sobre la fracción lipídica total extraída de las muestras bajo estudio, encontrándose una ausencia de la primera vitamina para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

Los resultados obtenidos podrían suministrar información útil para el entendimiento del patrón nutricional de *Mabuya* sp., a su vez, servirían de referencia para estudios posteriores de otros reptiles de nuestra herpetofauna colombiana.

Los resultados parciales de esta investigación se presentaron bajo la modalidad de póster y charla principal (co-autor), en el II Congreso Colombiano de Zoología, organizado en Santa Marta del 26 de noviembre al 1 de diciembre de 2006. (Véase **Anexo 1**).

El presente documento contiene 109 páginas, 18 Tablas, 19 Figuras, 101 referencias bibliográficas, 9 Anexos, distribuidos en 6 capítulos, los cuales se exponen a continuación.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes biológicos de *Mabuya* sp.: La especie *Mabuya* sp. (**Figura 1**), es un lagarto conocido comúnmente en Colombia como lisa o juanita. Este reptil escamado vivíparo, presenta un período de gestación prolongado (9-11 meses), y sus ovocitos preovulatorios son bastante pequeños (1.8 mm de diámetro máximo, Ramírez-Pinilla *et al.*, 2002; Gómez y Ramírez-Pinilla, 2004) (**Figura 2**).



Fuente: Fotografía de *Mabuya* sp., tomada por el autor (noviembre 28 de 2006) en el municipio de Curití.

Figura 1. Fotografía del lagarto vivíparo *Mabuya* sp.

El género *Mabuya* se distribuye en América Central y Suramérica, y al parecer, constituye un grupo monofilético (Carranza, 2003). La taxonomía de este género americano es problemática, principalmente, porque no se ha iniciado una revisión general de este grupo desde Dunn (1936), y muchas contribuciones recientes están limitadas a la descripción de nuevos taxa (Miralles, 2005). Adicionalmente, *Mabuya* es aparentemente un género morfológicamente conservativo, y como carece de amplios estudios taxonómicos, hay un pobre entendimiento de la variación en los caracteres morfológicos usados para diagnosticar especies

(Miralles, 2005). En el continente americano habitan 18 especies desde México a través de Sur América y las Antillas, excluyendo Chile (Miralles, 2005). Las especies andinas colombianas no se han estudiado hasta ahora y aunque previamente se consideraron como *Mabuya mabouya*, hoy en día, se estiman que son entidades indescritas (Miralles, 2005).



Fuente: Fotografías suministradas por el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la UIS.

Figura 2. Micrografía de embriones tempranos (izquierda) y embriones en el último estado de gestación (derecha) del lagarto vivíparo *Mabuya* sp.

1.2 Intercambio de nutrientes, madre-embrión: La anatomía de la placenta de escamados ovíparos, vivíparos lecitotróficos y vivíparos matrotroóficos, sugiere que la omfaloplacenta es un sitio principal para la transferencia de nutrientes de la madre al embrión, y no sólo para la toma de agua, como lo describía Weekes en 1935 (Thompson *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha encontrado que para las especies de *Mabuya*, la omfaloplacenta no es un sitio importante de intercambio de nutrientes; éstos son transferidos a través de las especializaciones de la alantoplacenta, de manera que el saco de la yema no cumple el patrón típico conocido para el resto de reptiles escamados (Jerez & Ramírez-Pinilla, 2001, 2003). En lagartos matrotroóficos la transferencia de nutrientes es vía histotrófica, en decir, que se toman las sustancias secretadas dentro el lumen uterino por

vesículas de las células del epitelio columnar uterino (Thompson *et al.*, 2004). La alantoplacenta de las especies de *Mabuya* es la más compleja de las conocidas en reptiles y converge en eficiencia y morfología con aquella de los mamíferos eutherios en los que todos los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario provienen de la transferencia materna de nutrientes a través de la placenta o placentotrofia (Blackburn y Vitt, 1992; Fleming y Blackburn, 2003). Morfológicamente se ha demostrado que esta placenta tiene una plataforma celular altamente especializada para el paso de nutrientes (Ramírez-Pinilla *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007) por lo que se ha sugerido, que de manera complementaria a su complejidad, el nivel placentotrófico en este grupo puede ser máximo y convergente así mismo con el de los mamíferos eutherios.

La transferencia placental de nutrientes se puede determinar mediante diferentes metodologías. Por ejemplo, para lagartos australianos con placentotrofia facultativa o mínima, se ha realizado mediante el análisis de la absorción embrionaria de moléculas marcadas (Swain y Jones, 1997; Speake y Deans, 2004; Jones y Swain, 2006), o indirectamente, a través de comparación de la composición entre los huevos y los neonatos (Thompson *et al.*, 1999 a, b, c, 2000, 2001; Thompson y Speake, 2006). Esta última metodología ha sido útil para determinar el contenido de agua y algunos iones inorgánicos (Ca, Mg, Na y K) (Speake *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado por esta metodología que para la población estudiada de *Mabuya*, todos los nutrientes requeridos por el embrión para su desarrollo son transferidos del útero de la madre a través de la placenta (Ramírez-Pinilla, 2006).

La contribución de moléculas orgánicas a la nutrición del embrión es más difícil de evaluar por cuanto éstas son metabolizadas. Sin embargo, el índice de placentotrofia es la aproximación más simple que se usa para evaluar la contribución de moléculas orgánicas mediante la relación entre la materia seca del neonato y la materia seca del huevo recientemente ovulado (Thompson, 2000),

relación conocida como índice de placentotrofía. Si el valor de esta relación es igual o mayor de 1, entonces, se supone que hay una transferencia de materia orgánica hacia el embrión. En este caso, las especies se reconocen como placentotróficas para moléculas orgánicas (Stewart y Thompson, 2000). Las especies de reptiles que tienen índices más altos de placentotrofía a las moléculas orgánicas son las especies de *Mabuya* brasileñas con placentas tipo IV y evaluadas por Blackburn *et al.* (1984), y Blackburn y Vitt (1992), con índices de placentotrofía de 473.2 y 385, para *M. bistrriata* y *M. heathi*, respectivamente. Estos valores para el caso de otras especies de *Mabuya* no se han evaluado. En un segundo nivel están las especies australianas del género *Pseudemoia* con placentación tipo III con valores que están entre 1 y 2 (Thompson *et al.*, 1999 a, b). Thompson *et al.* (1999 b, 2001 b), encontraron claramente una transferencia de proteínas o aminoácidos a través de la placenta del lagarto vivíparo *Niveoscincus Coventry* (placentas tipo II), sugiriendo que aún las placentas menos complejas pueden permitir el paso de moléculas orgánicas.

Los lípidos y las proteínas del saco de la yema en lagartos vivíparos varían en una proporción de 1:2 (Thompson y Speake, 2004). Sin embargo, los lípidos son mucho más estudiados ya que son la fuente predominante de energía orgánica durante la embriogénesis (Speake y Thompson, 2000, Thompson y Speake, 2003, 2004). Especialmente los TAG y PL, ya que son los mayores constituyentes de la yema de lagartos escamados, y los FA, ya que hacen parte de los lípidos, que desempeñan funciones esenciales durante el desarrollo del embrión, y, en particular, de los fosfolípidos, que forman parte de las membranas celulares (Speake y Thompson, 2000; Thompson y Speake, 2006).

Speake y Thompson (2000) encontraron diferencias entre el contenido lipídico de los huevos y los embriones en relación con el tipo placentario en especies de Squamata, indicando que en las especies placentotróficas, un porcentaje de los lípidos totales del embrión se derivan de la placenta. Aunque las especies con

placentas más complejas y mayores índices de placentotrofia como las de las *Mabuya* no se han estudiado, Jerez y Ramírez-Pinilla (2003) sugirieron la posibilidad de que la madre contribuya con el mayor volumen de lípidos necesarios para el desarrollo embrionario a través de la placenta en *Mabuya* sp.

Los TAG y PL son cuantitativamente las fracciones lipídicas más importantes en términos de cantidad y proporción relativa de lípidos totales en el lagarto *Niveoscincus coventryi* (Thompson *et al.*, 2001). Speake y Thompson (2000) determinaron que los huevos de especies ovíparas y vivíparas con una placenta simple (Tipo I), presentaron una proporción más alta de TAG que los huevos de especies vivíparas con placentas complejas (Tipos II y III), por lo que sugirieron que en la evolución de la placentotrofia de las especies placentotróficas de la familia Scincidae hay una reducción en la contribución de lípidos lecitotróficos al embrión, concomitante con una reducción en el tamaño del huevo. Además, estos lípidos son de menor calidad energética, debido a la reducción en la proporción de TAG. Esas reducciones progresivas en el contenido de TAG se manifiestan simultáneamente con el incremento en las proporciones de PL y CE (Speake y Thompson, 2000). Sin embargo, el significado funcional de esto, no es muy claro todavía (**Tabla 1**). Los valores fluctuantes de FFA en las fracciones lipídicas, reflejan una moderada actividad hidrolítica de las lipasas (Speake *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005).

La cantidad de FC y CE encontrados en neonatos de especies ovíparas y vivíparas con alta lecitotrofia es mucho mayor que la cantidad presente inicialmente en los huevos, indicando que una proporción grande del colesterol requerido es sintetizado *de novo* por el embrión (Speake *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2001 a, b). Los perfiles lipídicos de los huevos de *Mabuya* podrían ser sustancialmente diferentes a los de las otras especies placentotróficas, debido al mayor grado de complejidad placentaria alcanzado en estas especies, sin embargo, estos datos también permanecen sin ser documentados.

Tabla 1. Proporción de las principales clases de lípidos en huevos de lagartos ovíparos y vivíparos.

Especies	Modo de paridad**	% (p/p) de la fracción total lipídica en huevos			
		TAG	PL	CE	FC
<i>Lampropholis guichenoti</i>	O**	81,2	12,2	2,2	0,7
<i>Lampropholis delicata</i>	O	80,4	9,5	2,0	1,3
<i>Bassiana duperreyi</i>	O	85,5	11,2	1,3	1,4
<i>Sceleropus jarrovi</i>	VI	86,9	9,0	nd	nd
<i>Eulaprus tympanum</i>	VI	82,3	12,7	1,3	1,9
<i>Niveoscincus coventryi</i>	VII	66,3	19,6	3,9	2,9
<i>Niveoscincus metallicus</i>	VII	66,7	18,9	4,9	5,6
<i>Niveoscincus ocellatus</i>	VII	73,8	18,8	1,9	4,7
<i>Pseudemoia spenceri</i>	VIII	67,4	23,2	4,7	2,3
<i>Pseudemoia pagenstecheri</i>	VIII	66,2	18,8	7,1	5,0

*Tomado de Speake y Thompson (2000). En: Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A: 453–467.

**Abreviaciones: O, ovíparo; VI, VII, VIII, vivíparo con placenta Tipo I, II ó III; nd, no disponible.

Los FA que componen los TAG y PL de la yema del huevo en diferentes especies de lagartos ovíparos y vivíparos de la familia Scincidae, han mostrado similitud en su composición, a pesar de las diferencias en el modo de paridad y grado de placentotrofia (Speake y Thompson, 2000). Esta semejanza en la composición interespecífica, es el resultado de su filogenia común y de una dieta similar en estos reptiles (insectos y otros artrópodos) (Speake *et al.*, 2004; Speake y Thompson, 2000). Sin embargo, la carencia de información sobre el perfil de FA de varias especies de presas, han evitado alguna valoración de cómo la dieta está relacionada con la composición de la yema (Speake *et al.*, 2004). Speake *et al.* (2004) sugieren que los FA linoléico, α -linolénico, araquidónico y eicosapentanoico requeridos para la formación del huevo, pueden ser suministrados directamente de la dieta materna. Igualmente indican que el ácido docosahexaenoico de los lípidos del huevo no puede ser derivado de la dieta, por ende, se debe formar por

biosíntesis en el hígado materno, usando como precursores los FA α -linolénico y eicosapentanoico.

1.3 Lípidos: La palabra “lípidos” proviene del griego “*lipos*”, que significa “grasa”. Originalmente, se definía como una sustancia insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos, tales como cloroformo, acetona, benceno, éter de petróleo, *n*-hexano y etanol caliente (Bohinski, 1987; Badui, 1996). Sin embargo, algunos autores contemplan como “lípidos” sólo aquellas moléculas que son derivados reales o potenciales de los FA y sustancias relacionadas biosintéticamente (Christie, 1989; Badui, 1996).

1.3.1 Clasificación de los lípidos: Existen diversos métodos para clasificar los lípidos, basados en alguna de las propiedades físicas o químicas que los caracterizan; cada uno con sus propias ventajas y desventajas, pero el más común consiste en dividirlos en tres grandes grupos, en función de su estructura química (Badui, 1996; Murray *et al.*, 2001), tal como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Clasificación de los lípidos según su estructura química.

A. Lípidos simples. Ésteres de ácidos grasos y alcoholes.

1. Grasas y aceites. Ésteres de glicerilo con ácidos monocarboxílicos;
2. Ceras. Ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.

B. Lípidos compuestos. Lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas.

1. Fosfolípidos. Ésteres que contienen ácido fosfórico en lugar de ácido graso combinado con una base de nitrógeno;
2. Glucolípidos. Compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol;
3. Lipoproteínas. Compuestos de lípidos y proteínas.

C. Compuestos asociados.

1. Ácidos grasos (derivados de lípidos simples);
2. Pigmentos;
3. Vitaminas liposolubles;
4. Esteroles;
5. Hidrocarburos.

*Tomado de Badui, S. 1996. En: Química de los Alimentos, 3 ed. México : Legman de México. y de Murray *et al.*, 2001. En: Bioquímica de Harper. 15 ed. México : El Manual Moderno.

1.3.2 Extracción de lípidos: Varios procedimientos de extracción de lípidos son reportados en la literatura con el fin de mejorar y agilizar el proceso de recuperación a partir de tejidos biológicos. El propósito del proceso de extracción, es separar los lípidos de otros constituyentes tales como proteínas, polisacáridos, moléculas pequeñas (aminoácidos, azúcares, etc.), pero también preservar estos lípidos para su posterior análisis (Cyberlipid, 2006). Desde el primer trabajo realizado por Michael Eugène en 1823, la mayoría de los métodos de extracción de lípidos involucran el uso de solventes generalmente tóxicos e inflamables, tales como cloroformo, metanol o mezclas de éstos (Hamilton, 1992; Thompson *et al.*, 1999 a, b, c). Los métodos de extracción de Folch (1957) y Bligh-Dyer (1959), que utilizan esta mezcla de solventes, han sido ampliamente citados en la literatura y usados exhaustivamente por la comunidad científica. Equipos de extracción automáticos en modo semicontinuo, como el descrito por Fran von Soxhlet en 1939 (Manirakiza, 2001; Cyberlipid, 2006), o de extracción continua tal como el extractor Goldfish (Labconco, 2006), son aceptados e incluidos entre los métodos recomendados por la AOAC. Otros métodos de extracción de lípidos involucran uso de fluido supercrítico (Anklam, 1998; Dionisi, 1999; Perretti *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2006), radiación de microondas (García *et al.*, 2002), sonicación (Cyberlipid, 2006), extracción con solvente acelerado (Dionex Corporation, 1999; 2000) y microextracción en fase sólida (SPME) (Liu, 2002).

1.4 Ácidos grasos: Las grasas y los aceites constituyen los lípidos más abundantes (98%) e importantes en el estudio de alimentos de origen animal y/o vegetal. Ambos grupos están constituidos por TAG, los que, a su vez, son ésteres de FA con glicerol. El 2% de lípidos restantes son una mezcla de compuestos que incluyen hidrocarburos, tocoferoles, esteroides esterificados y libres (Choong, 1999).

1.4.1 Características estructurales de los ácidos grasos. Existen dos clases generales de FA, a saber: ácidos grasos saturados (SFA) y ácidos grasos

insaturados (UFA). Los FA se distinguen por las siguientes características estructurales (Hamilton and Hamilton, 1992; Gunstone, 2007):

- ◆ Los FA son compuestos de cadena lineal con número par de átomos de carbono en cada molécula, con longitud de cadena entre 4 y 80 átomos de carbono;
- ◆ Los ácidos monoinsaturados contienen un doble enlace con configuración Z (*cis*-), que usualmente se encuentra en una posición específica de la cadena;
- ◆ Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) contienen dos o más dobles enlaces con configuración Z (*cis*), separados por un grupo metileno;
- ◆ Los FA menos comunes contienen un número impar de átomos de carbono, enlaces acetilénicos, grupos epoxi-, hidroxi-, anillos ciclopropano y ciclopentano.

Los SFA, generalmente se encuentran esterificados haciendo parte de los TAG, y cuando llegan a estar en estado libre es porque probablemente sufrieron hidrólisis del enlace éster (Badui, 1996). En la **Tabla 3**, se muestran algunos de los más comunes, encontrados en fuentes naturales.

Tabla 3. Ácidos grasos saturados más comunes en fuentes naturales.

Nombre común	Nombre científico	Abreviatura
Láurico	Dodecanoico	C12:0
Mirístico	Tetradecanoico	C14:0
Palmítico	Hexadecanoico	C16:0
Esteárico	Octadecanoico	C18:0
Araquídico	Eicosanoico	C20:0

* Tomado de Badui, S. 1996. En: Química de los Alimentos, 3 ed. México : Legman de México.

Los UFA, son abundantes en aceites vegetales y marinos, siendo los ácidos, que se muestran en la **Tabla 4**, los más comunes entre éstos.

Tabla 4. Ácidos grasos insaturados de importancia fisiológica y nutricional*.

Nombre común	Nombre científico	Serie	Abreviatura
Palmitoleico	9-hexadecanoico**	ω 7	C16:1;9
Oléico	9-octadecanoico	ω 9	C18:1;9
Linolénico	9,12-octadecadienoico	ω 6	C18:2;9,12
γ -Linolénico	6,9,12-octadecatrienoico	ω 3	C18:3;6,9,12
Araquidónico	5,8,11,14-eicosotetraenoico	ω 6	C20:4;5,8,11,14
Erúcico	13-docosanoico	ω 6	C22:1;13
Nervónico	15-tetracosanoico	ω 9	C24:1;15

* Tomado de Christie, W. 1989. *En* Gas Chromatography and lipids, 2 ed. Dundee : Oily Press.

** La configuración del doble enlace en cada caso es *cis*-

1.4.2 Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases: La cromatografía de gases ha jugado un papel importante en el análisis de todas las clases de lípidos encontrados en fuentes naturales, tanto de origen vegetal como animal (Evershed, 1992), con la excepción de algunos compuestos isoprenoides de alto peso molecular (por ejemplo, carotenoides). GC es, sin duda, la principal herramienta con que cuenta un analista químico para analizar FA de origen animal. Desde la primera separación realizada por James y Martin en 1952, hasta nuestros días, la GC ha revolucionado el estudio de los lípidos porque ha hecho posible la determinación completa de FA en tiempos de análisis cortos (Christie, 1989). Se han realizado mejoras para optimizar su análisis, debido a la alta polaridad y poca volatilidad de los FA. Los FA son generalmente convertidos a los correspondientes ésteres metílicos (Liu, 1994; Rueda, 2004; Aleryani *et al.*, 2005; Buyer, 2006; Mondello *et al.*, 2006), aunque, se pueden utilizar otros ésteres para propósitos específicos antes del análisis cromatográfico, por ejemplo, para mejorar volatilidad, forma de los picos y lograr, por ende, una mejor separación de los respectivos derivados de FA (Liu, 1994; Thurnhofer y Vetter, 2006).

El análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) puede realizarse en columnas capilares apolares (polidimetilsiloxano), altamente polares (siliconas cianosustituidas), o polares (polietilenglicol) (Supelco, 1997; Harynuk *et al.*, 2006); siendo estas últimas las más utilizadas, puesto que los FAME eluyen en orden

creciente de su longitud y grado de insaturación. El detector de ionización en llama (FID), es el sistema de detección más utilizado para registrar los FAME y permite realizar la comparación de sus tiempos de retención (t_R) con los de estándares certificados (Carrapiso, 2000; Wang, 2000), logrando una identificación tentativa. También, se han utilizado métodos matemáticos para identificar FA de cadena ramificada de mezclas biológicas complejas (Torres *et al.*, 2002). Como métodos confirmatorios y de identificación se utilizan cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Rueda, 2003; Thurnhofer y Vetter, 2006), resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C NMR) (Gunstone, 1993; Wada, 2001) y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) (Firestone y Shepard, 1992; Soyeurt *et al.*, 2006).

2. PARTE EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental para establecer el grado de placentotrofia, la cuantificación de los FA en las fracciones lipídicas mayoritarias, el colesterol y las vitaminas liposolubles (A y E), presentes en los diferentes estados embrionarios del lagarto vivíparo *Mabuya* sp., se realizó en varias etapas, las cuales se describen a continuación.

2.1 Identificación de las muestras: En estudios realizados en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, Grupo de Estudios en Biodiversidad de la Escuela de Biología de la UIS, se identificó temporalmente una población Andina de *Mabuya* en Colombia como *Mabuya mabouya*. Sin embargo, se ha considerado recientemente que *Mabuya mabouya* Lacepède (1788), es una especie restringida a las Antillas Menores (Miralles, 2005). De acuerdo con Miralles (2005), ni *M. mabouya* ni *M. nigropunctata* (especies de Sur América frecuentemente pero erróneamente referidas como *M. mabouya*) están presentes en la región Andina. Así, *Mabuya* de la región Andina en Colombia puede ser una especie no descrita previamente y no conocida, por lo tanto, la identidad de la especie debe ser revisada. Por esta razón, la población estudiada será nombrada como *Mabuya* sp (Ramírez-Pinilla, 2006).

2.2 Área de estudio: La población más cercana detectada de *Mabuya* sp. corresponde a la localizada en el municipio de Curití (6°36'16.85"N, 73°04'02.74"O, altitud 1497 m), jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional de Santander (CAS), entidad ante la que se tramitó el permiso para la colecta, que se realizó con ayuda de biólogos y estudiantes de la Escuela de Biología de la UIS.

2.3 Recolección de las muestras: Se colectaron ca. 25 hembras preñadas entre los meses de febrero y junio de 2006, períodos cuando los embriones estaban desde los estados iniciales de desarrollo hasta inmediatamente anteriores al parto, de acuerdo con Ramírez-Pinilla *et al.* (2002). Las hembras gestantes se llevaron al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados donde se les dio muerte por sobredosis de anestésico, empleando xilocaína al 2%; algunas de las hembras gestantes se mantuvieron en el Laboratorio hasta el parto. Los embriones en diferentes estados de desarrollo, *i.e.* huevo oviductal, embrión temprano, embrión medio, embrión medio avanzado y embrión (etapa fetal) (ver **Figura 3**), fueron extraídos de los oviductos por disección de la cavidad abdominal. Los neonatos (ver **Figura 3**) nacidos en el Laboratorio, fueron muertos por congelamiento rápido, una vez nacidos (este procedimiento se realizó por los biólogos). Los cuerpos de los ejemplares adultos ingresaron a la colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la UIS.

Figura 3. Fotografía de embriones en los diferentes estados de desarrollo evaluados (a – f) y del neonato y del lagarto vivíparo *Mabuya* sp. **a.** Huevos recientemente ovulados, cada uno con un diámetro de 1.8 mm; **b.** Huevo oviductal con embrión temprano, diámetro de 2.0 mm; **c.** Embrión temprano, diámetro aprox. 3 mm; **d.** Embrión medio, diámetro ca. 5 mm; **e.** Embrión medio avanzado, diámetro ca. 7 mm; **f.** Embrión avanzado en etapa fetal –preparto–, diámetro ca. 10-12 mm. El neonato nacido en el laboratorio prematuramente tiene una longitud rostro cloacal de ca. 25 mm.



Fuente: Fotos Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados. Las fotografías no están a escala, sin embargo, reflejan el tamaño relativo de los embriones.

2.4 Preparación de las muestras: Las muestras de huevos y neonatos de *Mabuya* sp. se analizaron rápidamente para evitar degradación enzimática y oxidativa de vitaminas liposolubles y los PUFA. Las muestras fueron pesadas, secadas a 105 °C, durante toda una noche y repesadas, para determinar sus masas húmeda y seca. Las muestras, que no se procesaron de inmediato, fueron almacenadas en frascos color ámbar, bajo atmósfera de nitrógeno y refrigeración (4 °C).

2.5 Extracción de lípidos totales y obtención de las fracciones lipídicas: Debido al tamaño tan pequeño de las muestras, fue necesario el uso de muestras compuestas para la extracción de los lípidos y la obtención de las fracciones lipídicas. Los lípidos de los huevos, embriones y neonatos de *Mabuya* sp., fueron analizados de acuerdo con el procedimiento de Thompson *et al.* (1999 a, b, c). Se empleó diclorometano en lugar de cloroformo, ya que posee la misma capacidad extractora y es menos tóxico. Las muestras secas, se homogeneizaron en diclorometano-metanol (2:1 v/v), la fase orgánica obtenida se lavó con una solución al 0.88% (p/v) de KCl. El diclorometano se evaporó a sequedad y el contenido total de lípidos se determinó gravimétricamente (% grasa y mg grasa/huevo o neonato). Una porción del extracto lipídico fue sometida a transesterificación y analizada por cromatografía gases para la determinación total de ácidos grasos (TFA). Otra parte fue usada para el análisis de vitaminas liposolubles (A y E), y el resto del extracto lipídico se fraccionó en las principales clases lipídicas (TAG, PL, FC, CE y FFA), por cromatografía en capa delgada (TLC) sobre cromatoplasmas de gel de sílice (60 F₂₅₄), con zona de concentración de 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor; una mezcla *n*-hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:2, v/v), se usó como sistema de elución. La fracción de PL fue extraída de las cromatoplasmas con una mezcla 3 x 5 mL de diclorometano:metanol:agua (5:5:1, v/v), y las demás con 3 x 5 mL de éter etílico.

2.6 Análisis de ácidos grasos

2.6.1 Conversión de ácidos grasos a sus ésteres metílicos: Los TFA y los FA de las diferentes fracciones lipídicas se analizaron en forma de ésteres metílicos mediante GC-FID, según la norma ISO 5509 (*Animal and vegetable fats and oils – preparation of methyl esters of fatty acids*), de la siguiente manera:

Las diferentes fracciones obtenidas de los extractos lipídicos de huevos y neonatos de *Mabuya* sp., así como la fracción total (ca. 10 mg grasa) se transfirieron a tubos de ensayo con tapa rosca (13 x 100 mm), seguidamente, se adicionaron 2 mL del complejo de trifluoruro de boro al 20% en metanol. Las mezclas, con agitación, se sumergieron en un baño de aceite a 85-90 °C durante 45 min, hasta observar la desaparición de la fase lipídica (**Figura 4**). Posteriormente, las muestras fueron retiradas del baño de aceite y se dejaron reposar durante 5 min. Finalmente, se realizó la extracción de los FAME con 1 x 2 mL de *n*-hexano y una alícuota de 2 µL de las soluciones fue inyectada al cromatógrafo de gases, para su respectivo análisis cromatográfico.



Figura 4. Dispositivo utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación.

2.6.2 Identificación de ácidos grasos: La identificación de los FA se realizó por comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de mezclas de estándares certificados, a saber: Supelco 37 Component FAME Mix, GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 y GLC100, adquiridos de Supelco Bellefonte PA, EE.UU, analizados bajo iguales condiciones cromatográficas. La identificación de los FA fue realizada mediante espectrometría de masas (MS).

2.6.3 Cuantificación de ácidos grasos: La cantidad relativa (%) y absoluta (μg FA/embrión o neonato) de los FA para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp, se realizó mediante la cuantificación de los FAME, empleando los métodos de normalización interna y estandarización externa, respectivamente, según la norma ISO 5508 (*Animal and vegetable fats and oil – analysis by GC of methyl esters of fatty acids*). Se evaluaron parámetros analíticos cromatográficos, tales como factores de respuesta, reproducibilidad de t_R y áreas.

2.6.4 Parámetros analíticos de GC-FID: El análisis cromatográfico de los FA se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N (Palo Alto, California, EE.UU.) con detector de ionización en llama, un inyector automático HP-7683, en el modo *split* (51:1) (ver **Figura 5**). Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos *Agilent ChemStation* B.01.01. Se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-23 de 60 m x 0.25 mm, recubierta con una fase estacionaria de 50%-cianopropil- poli(metilsiloxano) de 0.25 μm de espesor. Como gas de arrastre se utilizó helio, con un flujo de 1 mL/min (99.995%, Aga Fano S.A., Bucaramanga, Colombia). En el **Anexo 2**, se adjuntan de forma resumida los parámetros analíticos empleados para la operación del GC-FID.

2.7 Análisis de colesterol total: La determinación de colesterol total se realizó por cromatografía de gases, utilizando una metodología desarrollada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, a partir de los métodos AOAC 941.09,

994.10 y 976.26. Modificaciones adicionales se realizaron debido a la poca cantidad de muestra con la cual se dispuso.



Figura 5. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N, equipado con un FID.

2.7.1 Saponificación de la muestra: En un tubo de ensayo con tapa rosca (16 x 150 mm), se adicionaron ca. 2 mg de grasa extraída de las muestras bajo estudio, y 5 mL de una solución de hidróxido de potasio (KOH) 0.5 M en metanol. La mezcla se sometió a saponificación durante 30 min a 80 °C. Después del enfriamiento se adicionó agua destilada (2mL). El colesterol se aisló mediante extracción líquido-líquido por lotes con *n*-hexano (3 x 4 mL). Los extractos se recolectaron y se llevaron a sequedad con una corriente de nitrógeno seco.

2.7.2 Preparación del acetato de colesterilo: El residuo seco obtenido de las muestras saponificadas, se sometió a derivatización con anhídrido acético (1 mL)

y piridina (1 mL). Esta mezcla se dejó en reacción por 12 h, a temperatura ambiente. El exceso de anhídrido acético y de la piridina se eliminó mediante adición de agua destilada, y los derivados secos se disolvieron en *n*-hexano (3 mL). Cada uno de los extractos finales (1 µL) se inyectaron al cromatógrafo de gases de alta resolución con detector selectivo de masas (GC-MS), operado en el modo de iones seleccionados, SIM (*m/z* 247, 260, 353 y 368), para su análisis.

2.7.3 Cuantificación de colesterol: Para la cuantificación de colesterol, se empleó la técnica de estandarización externa. Para ello, se utilizaron factores de respuesta (R_f) establecidos a partir del análisis de soluciones de referencia de acetato de colesterilo (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 ppm). La determinación del porcentaje de recuperación de colesterol, se realizó sobre grasa extraída de huevo de tortuga, enriquecida con acetato de colesterilo.

2.7.4 Parámetros analíticos de GC-MS: El análisis cromatográfico del colesterol se realizó en un GC HP 5890A Series II (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (HP 5972) (GC-MS), un inyector automático HP-7683, en el modo *split* (31:1) (ver **Figura 6**). Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos HP *ChemStation* B.02.05. Se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-5 de 30 m x 25 mm, recubierta con una fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) de 0.25 µm de espesor. Como gas de arrastre se usó helio, con un flujo de 1 mL/min (99.995%, Aga Fano S.A., Bucaramanga, Colombia). En el **Anexo 3**, se adjuntan los parámetros analíticos empleados para el GC-MS.

2.8 Análisis de vitaminas liposolubles, A y E: La determinación de las vitaminas A y E, se llevó a cabo empleando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), directamente sobre la fracción lipídica total extraída de las muestras bajo estudio, de acuerdo con la metodología propuesta por Gliszczynska y Sikorska (2004). Cada una de las fracciones lipídicas totales de huevos,

embriones y neonatos de *Mabuya* sp., se disolvió a un volumen final de 1 mL con una mezcla de solventes diclorometano:metanol (1:1, v/v). Una alícuota (10 μ L) de estas soluciones se inyectó al cromatógrafo líquido, para su respectivo análisis.



Figura 6. Cromatógrafo de gases HP 5890A Series II, equipado con un detector selectivo de masas HP 5972.

2.8.1 Identificación de vitaminas A y E: La identificación de las vitaminas A y E, se realizó por comparación de sus t_R con los que se obtuvieron de estándares certificados de las vitaminas, corridos bajo iguales condiciones cromatográficas.

2.8.2 Cuantificación de vitaminas A y E: La cuantificación de las vitaminas A y E, se llevó a cabo mediante el método de estandarización externa. Para ello, se utilizaron factores de respuesta (R_f) establecidos del análisis de soluciones de referencia de vitaminas A y E (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50 y 100 ppm). El nivel mínimo de cuantificación (NMQ=2NMD) del detector de fluorescencia (FLD) y

del detector de arreglo de diodos (DAD), se determinó para una relación señal / ruido (S/N), igual a 5.

2.8.3 Parámetros analíticos de RP-HPLC: El análisis cromatográfico para la evaluación de las vitaminas A y E, se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1100 Series* (Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un inyector automático, un detector de arreglo de diodos y un detector de fluorescencia (ver **Figura 7**). Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos *Agilent ChemStation B.01.01*. Se empleó una columna *ZORBAX Eclipse XDB (C18)*, de 15 cm x 4.6 mm y 5 μm de tamaño de partícula. Como fase móvil se utilizó metanol en el modo isocrático a una velocidad de 1.2 mL/min. En el **Anexo 4**, se adjuntan todos los parámetros analíticos empleados para el RP-HPLC/DAD/FLD.



Figura 7. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent 1100 Series*, equipado con un DAD y un FLD.

2.9 Tratamiento estadístico de los resultados

Las diferentes muestras en este proyecto de investigación, se analizaron por duplicado. El corredor de error para los valores promedio se determinó para un intervalo de confianza del 95%, según la regla de *Student* ($\mu = \text{promedio} \pm t*s/\sqrt{n}$). t: 2.920; n:2; s: desviación estándar (Davis, 2006). La variación en el paso de lípidos en los diferentes estados de desarrollo embrionario se determinó mediante pruebas de G o chi cuadrado con un alfa de 0.05 (Zar, 1999).

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Índice de placentotrofia, pesos húmedo y seco del lagarto vivíparo *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios

En la **Tabla 5**, se muestran los pesos húmedo y seco en diferentes estados embrionarios y en neonatos para la población de *Mabuya* estudiada. Se observa el incremento en pesos húmedo y seco desde los primeros estados de desarrollo embrionario (ver **Figura 8**), indicando, por ende, una gran transferencia neta de agua y materia seca, respectivamente. La prueba G realizada para el peso húmedo mostró diferencias significativas entre los diferentes estados embrionarios $G_{(0.05, 5)} = 1974.9$, $p < 0.001$. Dichas diferencias, se presentaron, de igual forma, para el peso seco: $G_{(0.05, 5)} = 457.3$, $p < 0.001$.

Tabla 5. Índice de placentotrofia, pesos húmedo y seco (mg/muestra) de las muestras bajo estudio.

Nombre muestra	Peso húmedo (mg/muestra)	Peso seco (mg/muestra)	Índice de Placentotrofia*	n**
Huevo recientemente ovulado***	5.6	0.4	1	3
Huevo oviductal	6.6 ± 0.3	1.1 ± 0.2	2.8	14
Embrión temprano	25 ± 6	3.2 ± 0.3	8.0	10
Embrión medio	90 ± 12	17 ± 2	42.5	10
Embrión medio avanzado	200 ± 32	39 ± 6	96.5	12
Embrión avanzado (etapa fetal)	460 ± 73	100 ± 13	243.8	10
Neonato	870 ± 80	192 ± 23	479.5	13

*Relación masa seca muestra/huevo recientemente ovulado ** Cantidad de huevos o neonatos.

*** Datos tomados de Ramírez-Pinilla, M. P (2006) En: Placental transfer of nutrients during gestation in an Andean population of the highly matrotrophic lizard genus *Mabuya* (Squamata:Scincidae). *Herpetol. Monog.* 20: 194- 204.

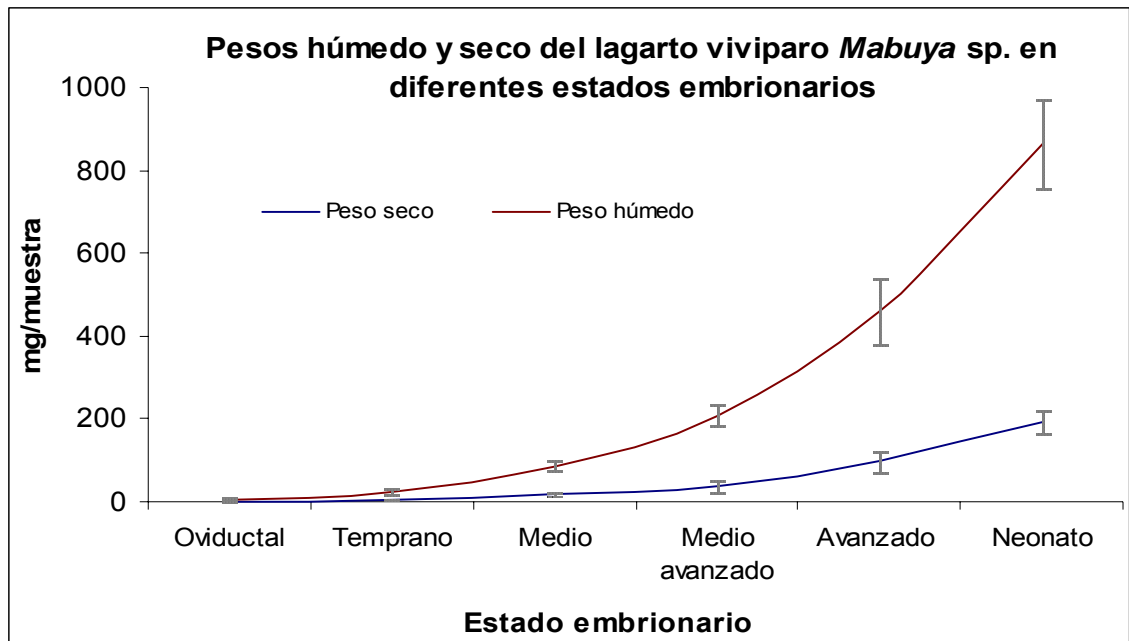


Figura 8. Pesos húmedo y seco del lagarto vivíparo *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios y en el neonato.

Mabuya sp. se caracteriza por un incremento de 47.950% en materia seca en el neonato, comparado con el huevo recientemente ovulado, y de aproximadamente la mitad (24.380%), para el estado embrionario más avanzado, antes de su nacimiento (embrión avanzado), lo que indica una clara evidencia de transferencia neta de material orgánico o índice de placentotrofia durante el desarrollo embrionario de la población estudiada y, especialmente, en el último estado de desarrollo o etapa fetal. El índice de placentotrofia para los demás estados embrionarios se presenta en la **Tabla 5**.

El índice de placentotrofia para *Mabuya* sp. fue similar al de las especies de *Mabuya* brasileñas evaluadas por Blackburn *et al.* (1984) y Blackburn y Vitt (1992), con índices de placentotrofia de 473 y 385 para *M. bistriata* y *M. heathi*, respectivamente, y muy superior a los de las especies de lagartos ovíparos y vivíparos estudiados en Australia (Thompson y Speake, 2006) (ver **Tabla 6**), cuyos

índices de placentotrofia están entre 1 y 2, para las especies de *Pseudemoia* con placentotrofia tipo III e inferiores a 1, para las especies *Eulamprus* y *Niveoscincus*, así como aquellas especies que presentan un modo ovíparo de paridad. De esta manera, comparativamente se demuestra, que las especies de *Mabuya* son las especies de reptiles con mayor índice de placentotrofia. En relación con esta eficiente función placentaria de transferencia de nutrientes, también son las especies con mayor complejidad morfofisiológica de la placenta (Jerez y Ramírez-Pinilla, 2001, 2003; Ramírez-Pinilla *et al.*, 2006, Vieira *et al.*, 2007).

Tabla 6. Índice de placentotrofia y masa seca de huevos recientemente ovulados y neonatos en lagartos de la familia Scincidae.

Especie	Paridad	Huevo seco, mg	Neonato seco, mg	Neonato/Huevo seco
<i>Lampropholis guichenoti</i>	O	34,9	26,2	0,75
<i>Lampropholis delicata</i>	O	27,1	24,1	0,89
<i>Eumeces fasciatus</i>	O	97,4	65,2	0,67
<i>Bassiana duperreyi</i>	O	79,8	68	0,85
<i>Pogota barbata</i>	O	700	490	0,7
<i>Gekko japonicus</i>	O	174	126	0,72
<i>Eulamprus quoyii</i>	V I	286	240	0,84
<i>Eulamprus tympanum</i>	V I	185,4	157,6	0,85
<i>Sceloporus bicanthalis</i>	V I	90,6	41,5	0,46
<i>Niveoscincus metallicus</i>	V II	41,8	37,9	0,91
<i>Niveoscincus coventryi</i>	V II	31,9	25,6	0,8
<i>Niveoscincus ocellatus</i>	V II	59,4	100	1,68
<i>Pseudemoia pagenstecheri</i>	V III	19	41,1	2,16
<i>Pseudemoia entrecasteauxii</i>	V III	32,5	54	1,66
<i>Pseudemoia spenceri</i>	V III	55,5	71,5	1,29
<i>Mabuya heathi</i>	V IV	0,4	154	385
<i>Mabuya bistriata</i>	V IV	0,47	222,4	473,2
<i>Mabuya sp.</i>	V IV	0,4	192	479,5

*Tomado de Thompson y Speake (2006). En: A review of the evolution of viviparity in lizards: structure, function and physiology of the placenta. *J. Comp. Physiol. B* 176: 170-189.

**Abreviaciones: O, ovíparo; VI, VII, VIII, vivíparo con placenta Tipo I, II, III ó IV.

3.2 Lípidos transferidos en el lagarto vivíparo *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios

3.2.1. Grasa total y porcentaje de grasa: La cantidad de lípidos totales transferidos por la madre, a través de la placenta, así como de aquellos que se originan durante el desarrollo embrionario del lagarto vivíparo *Mabuya* sp., muestran la complejidad que sustenta el elevado índice de placentotrofia que caracteriza a esta especie. En la **Tabla 7**, se muestran la cantidad de grasa para cada estado embrionario y el neonato (mg grasa/muestra), así como el respectivo porcentaje de grasa (%), con base en el peso seco. La prueba G realizada para la cantidad absoluta de grasa (mg grasa/muestra) mostró diferencias significativas entre los diferentes estados embrionarios $G_{(0.05, 5)} = 80.78$, $p < 0.001$, resultado que no fue significativo para la cantidad relativa de grasa (% grasa) $G_{(0.05, 5)} = 9.76$, $p > 0.05$.

Tabla 7. Cantidad y porcentaje de grasa total en neonatos y huevos de *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios.

Nombre muestra	mg grasa/muestra	%, grasa*	n**
Huevo oviductal	0.30 ± 0.06	34 ± 5	8
Embrión temprano	1.25 ± 0.3	30 ± 4	5
Embrión medio	6.0 ± 0.8	32 ± 3	8
Embrión medio avanzado	10 ± 2	27 ± 3	12
Embrión avanzado	19 ± 3	20 ± 3	5
Neonato	38 ± 4	17 ± 2	4

* Los porcentajes son con base en peso seco. ** Cantidad de huevos o neonatos utilizados.

Es muy probable, que la cantidad de lípidos recuperados en los diferentes estados embrionarios (véase **Tabla 7**), sea solamente una porción de los lípidos transferidos por la madre, ya que una fracción de éstos, se utiliza como fuente de

energía por el embrión. El desarrollo embrionario de aves (Speake *et al.*, 1998a), tortugas (Thompson *et al.*, 1999a), y de ciertos lagartos ovíparos y vivíparos no placentotróficos (Thompson, 1981; Stewart y Castillo, 1984), está acompañado de la pérdida del ca. 50% de los lípidos presentes originalmente en la yema, como producto de la β -oxidación en el tejido del embrión (Speake *et al.*, 1998a; Speake y Thompson, 1999). Por lo tanto, un contenido lipídico neonatal mayor del 50% del contenido total del huevo, es indicativo de transferencia placentar de lípidos (Speake y Thompson, 2000). Sin embargo, la transferencia de lípidos a través de la placenta en *Mabuya* sp., es obligada, ya que sus ovocitos preovulatorios carecen de placas grasas en la yema y, por ende, tal transferencia es indispensable para su desarrollo embrionario (Ramírez-Pinilla, 2006).

El contenido lipídico (38 mg) del neonato del lagarto vivíparo *Mabuya* sp., la especie con mayor complejidad placentar conocida entre los escamados, excede al del huevo oviductal 126.6 veces, indicando, por ende, una transferencia placentar de lípidos muy elevada (12660 %), de la madre hacia el embrión durante su desarrollo embrionario. La velocidad de transferencia lipídica entre los diferentes estados embrionarios, se caracteriza por presentar un comportamiento exponencial, con un incremento de cuatro y cinco veces con respecto a su contenido lipídico inicial, para los estados embrionarios temprano y medio, respectivamente. Para los demás estados, embrión medio avanzado, embrión avanzado y neonato, el incremento en la transferencia lipídica fue aproximadamente el doble entre un estado embrionario y el siguiente. A diferencia de la cantidad absoluta, la proporción relativa de lípidos (%) en los huevos oviductales es mayor que en los diferentes estados embrionarios, incluso es el doble de la cantidad relativa de los neonatos (17 %). Por lo tanto, la mayor intensidad de intercambio madre-feto de lípidos ocurre durante las últimas fases del desarrollo, durante la fase de crecimiento fetal cuando todos los otros nutrientes también pasan con mayor intensidad (Ramírez-Pinilla, 2006). Sin embargo, se puede demostrar, que aunque el huevo recién ovulado

aparentemente carezca de grandes depósitos de lípidos en forma de yema, su contenido lipídico, aunque mínimo, es proporcionalmente mayor, que en las últimas fases de la gestación, lo que indica que, al menos en las primeras etapa del desarrollo (huevo oviductal y embrión temprano), los lípidos lecitotróficos, que vienen en el citoplasma del huevo y formados antes de la ovulación, son importantes

3.2.2 Evaluación de las figuras de mérito para los FA: Para la determinación de los ácidos grasos en las diferentes fracciones lipídicas mayoritarias extraídas de embriones y neonatos del lagarto vivíparo *Mabuya* sp., se determinaron figuras de mérito para los ésteres metílicos de referencia, a saber: reproducibilidad del método empleado, niveles mínimos de cuantificación (NMC=2NMD) del FID (S/N = 5), repetibilidad de t_R y áreas cromatográficas. En el **Anexo 5**, se adjuntan un cromatograma obtenido por GC-FID de la mezcla de referencia de los FAME y las curvas de calibración.

3.2.2.1 Repetibilidad de tiempos de retención (t_R): En la **Tabla 8** se reportan los valores de t_R obtenidos para los FAME de la mezcla certificada empleada para realizar la identificación de los FA presentes en las fracciones lipídicas mayoritarias (TAG, PL, FC, CE y FFA), aisladas de neonatos y embriones en diferentes estados embrionarios. En la tabla se reportan los valores promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación (%). Los valores promedio de t_R se reportan para un intervalo de confianza del 95%, según la regla de *Student* ($\mu = \text{promedio} \pm t^*s/\sqrt{n}$).

Tabla 8. Estudio de la repetibilidad de los tiempos de retención (t_R) de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Fórmula	Éster metílico del ácido	t_R promedio $\pm \sigma$ (n=7), min	CV, %
C6:0	Caproico	5,158 \pm 0,002	0,05
C8:0	Caprílico	5,962 \pm 0,002	0,04
C10:0	Cáprico	7,372 \pm 0,002	0,03
C11:0	Undecanoico	8,332 \pm 0,002	0,03
C12:0	Láurico	9,467 \pm 0,002	0,04
C13:0	Tridecanoico	10,766 \pm 0,002	0,03
C14:0	Mirístico	12,241 \pm 0,003	0,04
C14:1n5	Miristoleico	12,961 \pm 0,003	0,03
C15:0	Pentadecanoico	13,869 \pm 0,003	0,03
(C15:1	<i>cis</i> -10-Pentadecenoico	14,680 \pm 0,004	0,03
C16:0	Palmítico	15,66 \pm 0,06	0,05
C16:1	Palmitoleico	16,310 \pm 0,004	0,03
C17:0	Heptadecanoico	17,551 \pm 0,005	0,04
C17:1	<i>cis</i> -10-Heptadecenoico	18,265 \pm 0,005	0,03
C18:0	Esteárico	19,559 \pm 0,007	0,05
C18:1n9t)	Elaídico	19,912 \pm 0,006	0,04
C18:1n9c	Oleico	20,158 \pm 0,006	0,04
C18:2n6t	Linolelaídico	20,664 \pm 0,006	0,04
C18:2n6c	Linoléico	21,255 \pm 0,005	0,03
C18:3n6	γ -Linolénico	21,936 \pm 0,005	0,03
C18:3n3	Linolénico	22,633 \pm 0,005	0,03
C20:0	Araquídico	23,699 \pm 0,008	0,04
C20:1n9	Eicosenoico	24,353 \pm 0,007	0,04
C20:2n6	Eicosadienoico	25,636 \pm 0,007	0,04
C21:0	Heneicosanoico	25,949 \pm 0,008	0,04
C20:3n6	Eicosatrienoico	26,450 \pm 0,008	0,04

Continuación de la **Tabla 8**.

Fórmula	Éster metílico del ácido	t_R promedio ± σ (n=7), min	CV, %
C20:4n6	Araquidónico	26,995 ± 0,007	0,04
C20:3n3	Eicosatrienoico	27,335 ± 0,008	0,04
C22:0	Behénico	28,59 ± 0,01	0,09
C20:5n3	Eicosapentaenoico	28,887 ± 0,008	0,03
C22:1n9	Erúcico	29,54 ± 0,01	0,04
C22:2n6	Docosadienoico	31,38 ± 0,01	0,04
C23:0	Tricosanoico	31,70 ± 0,01	0,08
C24:0	Lignocérico	35,55 ± 0,02	0,08
C24:1	Nervónico	37,01 ± 0,02	0,09
C22:6n3	Docosahexaenoico	37,30 ± 0,01	0,09

Como puede apreciarse en la **Tabla 8**, los coeficientes de variación para todos los FA en forma de sus ésteres metílicos, estuvieron por debajo de 0.1 %. Estos valores no sobrepasaron el valor máximo del 2% permitido por las Buenas Prácticas de Laboratorio, lo que indica una alta repetibilidad en el sistema de inyección y, por ende, confiabilidad al emplear el método de comparación de tiempos de retención, para la identificación tentativa de los FA presentes en las muestras bajo estudio.

En la **Figura 9**, se muestra el cromatograma típico, obtenido por GC-FID, de la mezcla certificada de los FAME empleada en este proyecto.

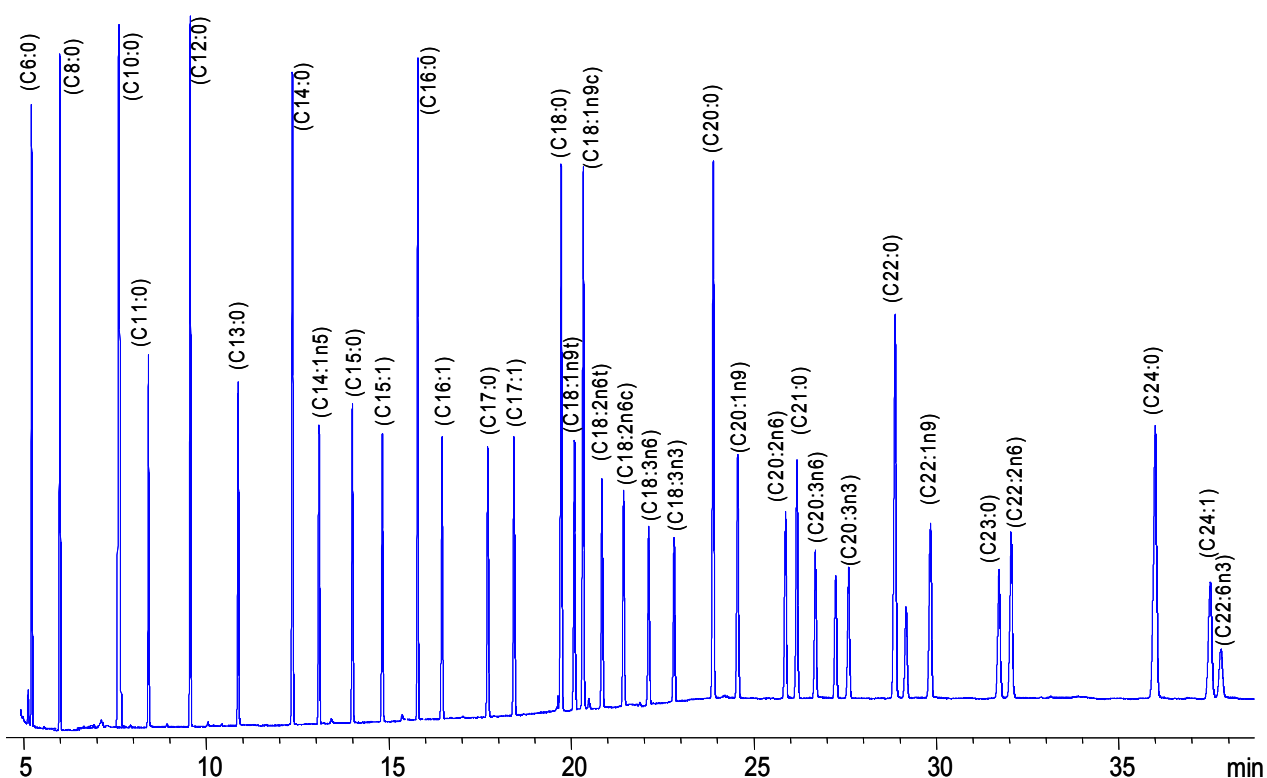


Figura 9. Cromatograma típico de la mezcla certificada (Supelco 37 *Component FAME Mix*) de ésteres metílicos de ácidos grasos de referencia, obtenidos por GC-FID. Columna DB-23 (60m X 0.25mm X 0.25 μ m).

3.2.2.2 Niveles mínimos de detección y repetibilidad de áreas cromatográficas: Los niveles mínimos de detección y los valores de las áreas de los materiales de referencia certificados de los FAME, se muestran en la **Tabla 9**. Los valores promedio de las áreas cromatográficas se reportan para un intervalo de confianza del 95%, según la regla de *Student* ($\mu = \text{promedio} \pm t^*s/\sqrt{n}$).

Tabla 9. Niveles mínimos de detección (NMC=2NMD) del FID (S/N = 5) y repetibilidad (CV, %) de las áreas de la mezcla certificada de los FAME.

Fórmula	Éster metílico del ácido	NMD, µg/muestra	Área promedio $\pm \sigma$ (n=3), cuentas	CV, %
C6:0	Caproico	2,6	107 \pm 6	3
C8:0	Caprílico	2,0	126 \pm 7	3
C10:0	Cáprico	1,8	139 \pm 8	3
C11:0	Undecanoico	3,4	77 \pm 4	3
C12:0	Láurico	1,6	152 \pm 8	3
C13:0	Tridecanoico	3,4	79 \pm 4	3
C14:0	Mirístico	1,8	161 \pm 7	2
C14:1n5	Miristoleico	4,0	76 \pm 3	2
C15:0	Pentadecanoico	3,7	83 \pm 3	2
(C15:1	<i>cis</i> -10-Pentadecenoico	4,0	80 \pm 3	2
C16:0	Palmítico	1,3	251 \pm 7	2
C16:1	Palmitoleico	4,1	81 \pm 2	2
C17:0	Heptadecanoico	4,2	79 \pm 2	2
C17:1	<i>cis</i> -10-Heptadecenoico	4,2	83 \pm 2	2
C18:0	Estearico	2,1	170 \pm 4	1
C18:1n9t)	Elaídico	4,5	84 \pm 2	1
C18:1n9c	Oleico	2,2	168 \pm 4	2
C18:2n6t	Linolelaídico	5,0	75 \pm 2	2
C18:2n6c	Linoléico	4,9	73 \pm 2	2
C18:3n6	γ -Linolénico	5,9	63 \pm 2	2
C18:3n3	Linolénico	5,7	60 \pm 2	2
C20:0	Araquídico	4,0	174 \pm 4	1
C20:1n9	Eicosenoico	8,8	83 \pm 2	1
C20:2n6	Eicosadienoico	10,6	73 \pm 2	2
C21:0	Heneicosanoico	9,3	88 \pm 2	2

Continuación de la **Tabla 9**.

Fórmula	Éster metílico del ácido	NMD*, µg/muestra	Área promedio ± σ (n=3), cuentas	CV, %
C20:3n6	Eicosatrienoico	12,7	64 ± 3	3
C20:4n6	Araquidónico	14,3	58 ± 2	2
C20:3n3	Eicosatrienoico	13,3	60 ± 2	2
C22:0	Behénico	5,7	169 ± 4	1
C20:5n3	Eicosapentaenoico	18,1	50 ± 2	3
C22:1n9	Erúcico	12,3	84 ± 3	2
C22:2n6	Docosadienoico	15,2	72 ± 2	2
C23:0	Tricosanoico	14,0	86 ± 2	2
C24:0	Lignocérico	8,5	171 ± 5	2
C24:1	Nervónico	17,9	83 ± 3	2
C22:6n3	Docosahexaenoico	33,3	43 ± 2	3

* NMD - Nivel mínimo de detección. NMQ* - Nivel mínimo de cuantificación

Los resultados, que aparecen en la **Tabla 9**, muestran alta repetibilidad en la medición de las áreas (A_{FAME}), lo que cumple con las exigencias de las Buenas Prácticas de Laboratorio, que recomiendan coeficientes de variación (%) inferiores al 10%, para las áreas de los picos cromatográficos.

3.2.2.3 Reproducibilidad de la extracción, derivación y cuantificación de FA en muestras reales: Debido al tamaño, complejidad de la matriz y al poco material de embriones en diferentes estados de desarrollo de *Mabuya* sp., con el que se dispuso, fue necesario determinar las condiciones adecuadas y la reproducibilidad total de las metodologías utilizadas para llevar a cabo la extracción, derivación y cuantificación de los FA en una matriz similar a las

utilizadas en este estudio. Para tal fin, se utilizó grasa extraída de huevos de tortuga, debido a su gran cantidad y fácil acceso.

En el presente trabajo, la derivación de los FA a sus correspondientes ésteres metílicos se realizó con el complejo de trifluoruro de boro en metanol al 20%, de acuerdo con la metodología utilizada por Rueda (2004), mientras que Thompson *et al.* (1999 a, b, c) utilizaron metanol:tolueno:ácido sulfúrico (20:10:1, v/v), como mezcla derivatizante.

En la **Tabla 10**, se muestra la cantidad relativa promedio (%) de TFA presentes en la grasa extraída de huevo de tortuga. La cantidad relativa promedio (%) de los FA, en las diferentes fracciones lipídicas se muestran en el **Anexo 6**. Los coeficientes de variación obtenidos para los TFA en forma de sus ésteres metílicos, estuvieron por debajo de 3 %, lo que indica una alta reproducibilidad en las metodologías utilizadas para extracción, derivación y cuantificación de los FA.

Tabla 10. Cantidad relativa promedio (%) de TFA presentes en grasa de huevo de tortuga, empleada para el estudio de la reproducibilidad de la metodología utilizada.

Fórmula	Éster metílico del ácido	Cantidad relativa (%)			Promedio \pm t*s/ \sqrt{n}	CV, %
		1	2	3		
C12:0	Láurico	0,32	0,33	0,33	0,33 \pm 0,01	1,6
C14:0	Mirístico	5,58	5,59	5,66	5,61 \pm 0,07	0,8
C14:1n5	Miristoleico	0,55	0,55	0,56	0,55 \pm 0,00	0,8
C15:0	Pentadecanoico	0,57	0,57	0,58	0,57 \pm 0,1	0,4
C16:0	Palmítico	26,9	26,8	27,0	26,9 \pm 0,1	0,3
C16:1	Palmitoleico	20,2	20,1	20,3	20,2 \pm 0,2	0,7
C17:0	Heptadecanoico	0,37	0,36	0,38	0,37 \pm 0,01	1,6
C18:0	Esteárico	7,8	7,8	7,7	7,7 \pm 0,1	0,7

Continuación de la **Tabla 10**.

Fórmula	Éster metílico del ácido	Cantidad relativa (%)			Promedio $\pm t^*s/\sqrt{n}$	CV, %
		1	2	3		
C18:1n9c	Oleico	33,5	33,7	33,3	33,5 \pm 0,4	0,7
C18:2n6c	Linoléico	0,92	0,92	0,91	0,92 \pm 0,01	0,4
C18:3n3	Linolénico	0,10	0,10	0,11	0,10 \pm 0,01	2
C20:0	Araquídico	0,26	0,25	0,25	0,26 \pm 0,01	2,2
C20:1n9	Eicosenoico	0,63	0,62	0,62	0,62 \pm 0,01	1,2
C20:3n6	Eicosatrienoico	0,15	0,15	0,15	0,15 \pm 0,01	0,9
C20:4n6	Araquidónico	1,47	1,45	1,45	1,46 \pm 0,02	0,9
C22:0	Behénico	0,06	0,06	0,06	0,06 \pm 0,00	3
C20:5n3	Eicosapentaenoico	0,12	0,12	0,11	0,12 \pm 0,01	1
C22:6n3	Docosahexaenoico	0,54	0,55	0,56	0,55 \pm 0,01	1,1

¹ Medición 1

² Medición 2

³ Medición 3

En la **Figura 10**, se muestra el perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-FID, de los TFA presentes en la grasa extraída de huevos de tortuga.

Los valores promedio de la cantidad relativa (%) de los TFA en la grasa extraída de huevos de tortuga fueron calculados para un intervalo de confianza del 95%, según la regla de *Student* ($\mu = \text{promedio} \pm t^*s/\sqrt{n}$). Como se puede apreciar en la **Tabla 10**, los coeficientes de variación para las metodologías utilizadas, estuvieron por debajo del 3%, cumpliendo, por ende, con los reglamentos de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

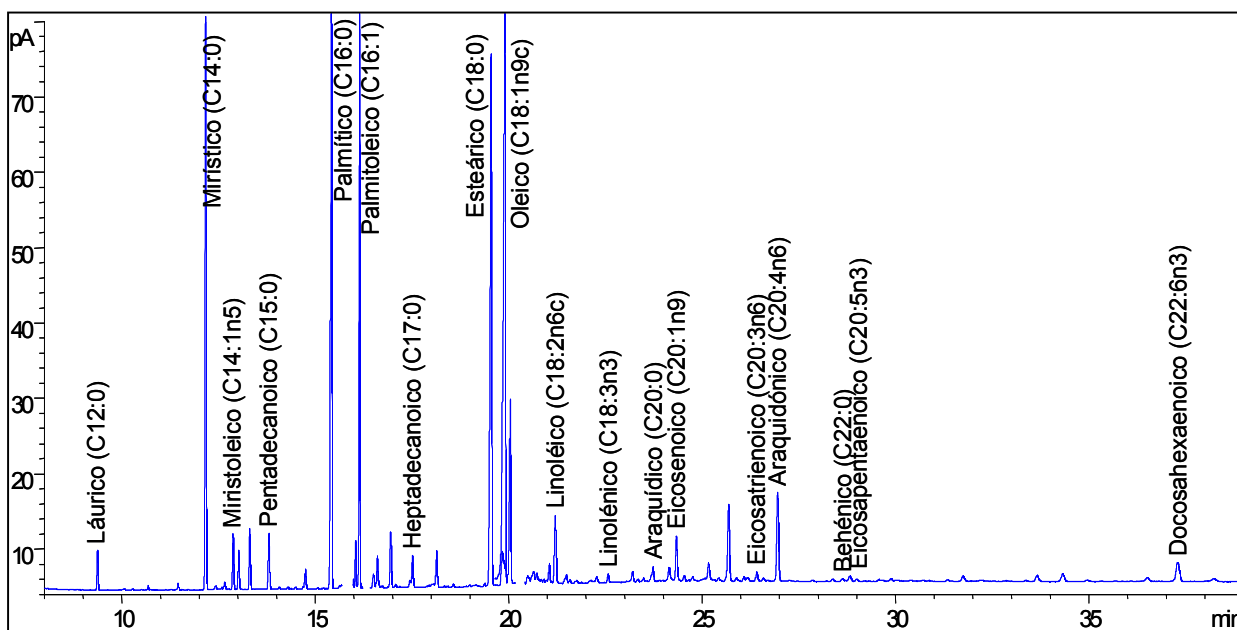


Figura 10. Cromatograma típico de los TFA presentes en grasa extraída de huevos de tortuga, obtenidos por GC-FID. Columna DB-23 (60m X 0.25mm X 0.25 μ m).

3.2.3 FA presentes en las fracciones lipídicas mayoritarias del lagarto vivíparo *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios

Extensos y diversos estudios se realizaron en Australia para determinar la proporción y la composición de los FA presentes en las fracciones lipídicas mayoritarias en huevos recientemente ovulados y neonatos de lagartos tanto ovíparos como vivíparos (Thompson *et al.*, 2000; Thompson y Speake, 2006). Sin embargo, las especies placentotroficas más evolucionadas de *Mabuya*, son estudiadas por primera vez en esta investigación, más aún, son estudiados en cada uno de sus estados embrionarios durante la gestación, estudio que hasta el momento no se realizó en ningún lagarto, según la literatura revisada hasta la fecha.

Las composiciones de los FA en las fracciones lipídicas de TAG, PL, CE y FFA de los diferentes estados embrionarios, se presentan en las **Tablas 11-14**, respectivamente. Los FA, listados en las **Tablas 11-14** representan del 99.0 a 99.8 % de los TFA identificados en los extractos grasos, en los cuales se tuvieron en cuenta FA presentes en trazas, tanto para SFA como UFA, con longitudes de cadena que varían entre 12 y 22 átomos de carbono.

3.2.3.1 Perfiles de FA de TAG de *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios.

En la **Tabla 11**, se muestra la composición de FA de las fracciones de TAG, caracterizadas de forma general por ciertas variaciones para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp. Los FA mayoritarios de los TAG fueron el palmitico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1 n9), con variaciones entre 11.8-33.8%, 9.0-22.3% y 16.7-38.1%, respectivamente (Véase **Tabla 11**). Una notable característica, fue el incremento continuo del ácido palmitoleico (C16:1) y la disminución del ácido araquídico (C20:0), durante el desarrollo embrionario de *Mabuya* sp. Este último ácido, C20:0, posiblemente, está presente en trazas en lagartos con diferentes modos de paridad tanto ovíparos como vivíparos, estudiados en Australia por Speake y Thompson (2000), como en sus principales presas alimenticias (Speake y Herbert, 2004), ya que sólo ha sido reportado, según la literatura revisada, para los lagartos vivíparos *Eulamprus tympanum* (Thompson *et al.*, 2001a) y *Niveoscincus coventry* (Thompson *et al.*, 2001), cuya cantidad relativa no supera el 0.3 y 0.4%, respectivamente, para esta clase de lípidos, tanto en huevos, como en neonatos. En *Mabuya* sp., el ácido C20:0, se encuentra presente en cantidades relativamente altas, alcanzando el mayor contenido para los embriones temprano y medio con cantidades de 19.1 y 16.3%, respectivamente.

Tabla 11. Cantidad relativa promedio (%) de FA en las fracciones de TAG en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD RELATIVA (%) DE FA EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	0,75 ± 0,05	1,16 ± 0,09	0,65 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,02
Mirístico (C14:0)	1,83 ± 0,09	2,3 ± 0,1	1,55 ± 0,06	1,59 ± 0,09	1,04 ± 0,08	1,56 ± 0,07
Miristoléico (C14:1n5)	-	-	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Pentadecanoíco (C15:0)	-	1,24 ± 0,08	0,86 ± 0,05	1,12 ± 0,08	0,49 ± 0,03	0,62 ± 0,04
Palmítico (C16:0)	21,2 ± 0,6	22,6 ± 0,5	11,8 ± 0,4	27,6 ± 0,5	30,0 ± 0,6	33,8 ± 0,8
Palmitoléico (C16:1)	-	0,86 ± 0,05	1,56 ± 0,07	8,0 ± 0,2	13,8 ± 0,4	11,5 ± 0,3
Heptadecanoíco (C17:0)	0,68 ± 0,06	1,57 ± 0,06	0,82 ± 0,04	0,81 ± 0,03	0,50 ± 0,02	0,57 ± 0,03
Estearíco (C18:0)	22,3 ± 0,6	21,5 ± 0,4	9,0 ± 0,3	10,3 ± 0,2	10,5 ± 0,3	11,1 ± 0,2
Oleico (C18:1n9c)	29,7 ± 0,7	16,7 ± 0,5	22,4 ± 0,5	31,3 ± 0,6	38,1 ± 0,6	36 ± 1
Linoleico (C18:2n6c)	0,67 ± 0,04	5,5 ± 0,2	8,7 ± 0,3	7,3 ± 0,2	1,67 ± 0,04	1,70 ± 0,07
γ-Linolénico (C18:3n6)	-	-	0,30 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,00
Linolénico (C18:3n3)	0,80 ± 0,07	0,41 ± 0,02	1,44 ± 0,07	1,57 ± 0,05	0,22 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Araquídico (C20:0)	14,8 ± 0,4	19,1 ± 0,4	16,3 ± 0,5	3,3 ± 0,1	1,49 ± 0,08	1,24 ± 0,06
Eicosenoico (C20:1n9)	1,53 ± 0,09	3,9 ± 0,2	5,5 ± 0,2	1,50 ± 0,05	0,52 ± 0,05	0,67 ± 0,05
Eicosadienoico (C20:2n6)	-	0,54 ± 0,04	1,30 ± 0,07	1,0 ± 0,1	0,19 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	-	0,82 ± 0,05	0,38 ± 0,04	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Araquidónico (C20:4n6)	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,2	8,6 ± 0,2	1,39 ± 0,04	0,34 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Behénico (C22:0)	0,70 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	0,46 ± 0,04	-	1,9 ± 0,1	0,44 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Erúcico (C22:1n9)	-	-	0,44 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Nervónico (C24:1)	-	-	0,29 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Docosahexaenoico (C22:6n3)	2,4 ± 0,1	0,42 ± 0,02	5,5 ± 0,2	1,55 ± 0,08	0,29 ± 0,01	0,28 ± 0,01

El ácido graso monoinsaturado, C18:1 n9, fue el componente acilo mayoritario de la fracción de TAG, formado por el 22.4-38.1% de los TFA en esta clase de lípidos para los estados embrionarios de *Mabuya* sp., excepto para el embrión temprano, cuyo ácido mayoritario fue el C16:0, con una cantidad relativa de 22.6%. Es de resaltar, que este ácido, C18:1 n9, es también el FA mayoritario en la fracción de TAG de huevos y neonatos de lagartos ovíparos y vivíparos (Speake y Thompson, 2000), en huevos de tortugas (Thompson *et al.*, 1998b; Speake *et al.*, 2001), caimanes (Noble *et al.*, 1990; Noble y McCartney, 1993) y aves (Speake *et al.*, 1997; Speake y Deans, 2004). El ácido linoléico (C18:2 n6), fue el PUFA mayoritario para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp., a excepción del huevo oviductal, el cual se caracterizó por el alto contenido de ácido docosahexanoico (C22:6 n-3), presente en una cantidad relativa de 2.4%.

Speake y Thompson (2000), observaron una marcada diferencia para los PUFA de C18, en las especies con mayor placentotrofia después de *Mabuya* sp., *Pseudemoia* spp (placentotrofia III). Los lagartos ovíparos y vivíparos con placentotrofia tipo I y II, estudiados por Speake y Thompson (2000), presentaron proporciones de C18:2 n-6 y C18:3 n-3 en las fracciones de TAG tanto en neonatos como en huevos muy similares. Sin embargo, los TAG presentes en los neonatos de *P. spenceri* y *P. pagenstecheri*, contienen menores proporciones de estos ácidos, en comparación con los presentes en los huevos iniciales. Para las fracciones de TAG de *Mabuya* sp., los ácidos C18:2 n-6 y C18:3 n-3, se encontraron en mayor proporción para los diferentes estados embrionarios, que en el neonato, excepto para el huevo oviductal, cuya cantidad inicial fue 2.5 veces menor (Véase **Tabla 11**). Esto sugiere, que los lípidos lecitotróficos en el huevo oviductal, tienen poca cantidad relativa de estos ácidos, y que éstos se transfieren de la madre al feto durante la gestación, para ser utilizados como recurso energético durante la fase final de crecimiento fetal antes del nacimiento. Este hecho puede reflejar el uso preferencial de estos ácidos poliinsaturados como fuente energética durante el desarrollo embrionario, como también su conversión a

derivados con cadena carbonada mas larga (Thompson *et al.*, 1999a; Speake y Thompson, 2000).

Se observó una disminución de los PUFA, tales como el ácido araquidónico (C20:4 n6), eicosapentanoico (C20:5 n-3) y el ácido C22:6 n-3, durante el desarrollo embrionario de *Mabuya* sp., excepto para el embrión medio, el cual se caracterizó por poseer el contenido mas alto de estos ácidos, en cantidades relativas de 8.7, 1.9 y 5.5%, respectivamente. Posiblemente, este estado embrionario requiere de grandes cantidades de lípidos para su desarrollo, puesto que presentó la mayor cantidad relativa de lípidos (32%), comparado con los demás estados embrionarios (Véase **Tabla 7**), y, en especial, los FA, que son constituyentes de las membranas celulares. Resultados similares en cuanto a la disminución de estos FA, fueron observados por Speake y Thompson (2000), en diferentes lagartos ovíparos y vivíparos, que, además, sugieren que estos ácidos de cadena larga, derivados de los TAG de la yema, se usan preferiblemente para la síntesis de PL en el tejido embrionario.

La mayor cantidad relativa de C22:6 n-3 con respecto a C20:5 n-3, en todos los estados embrionarios de *Mabuya* sp., puede ser el resultado de la conversión de este último ácido a C22:6 n-3, antes de su incorporación, tal como ha sido sugerido para otros lagartos tanto ovíparos como vivíparos (Speake y Thompson, 2000).

En la **Figura 11**, se muestra el perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-FID, de los FA presentes en la fracción lipídica de TAG obtenida de neonatos de *Mabuya* sp.

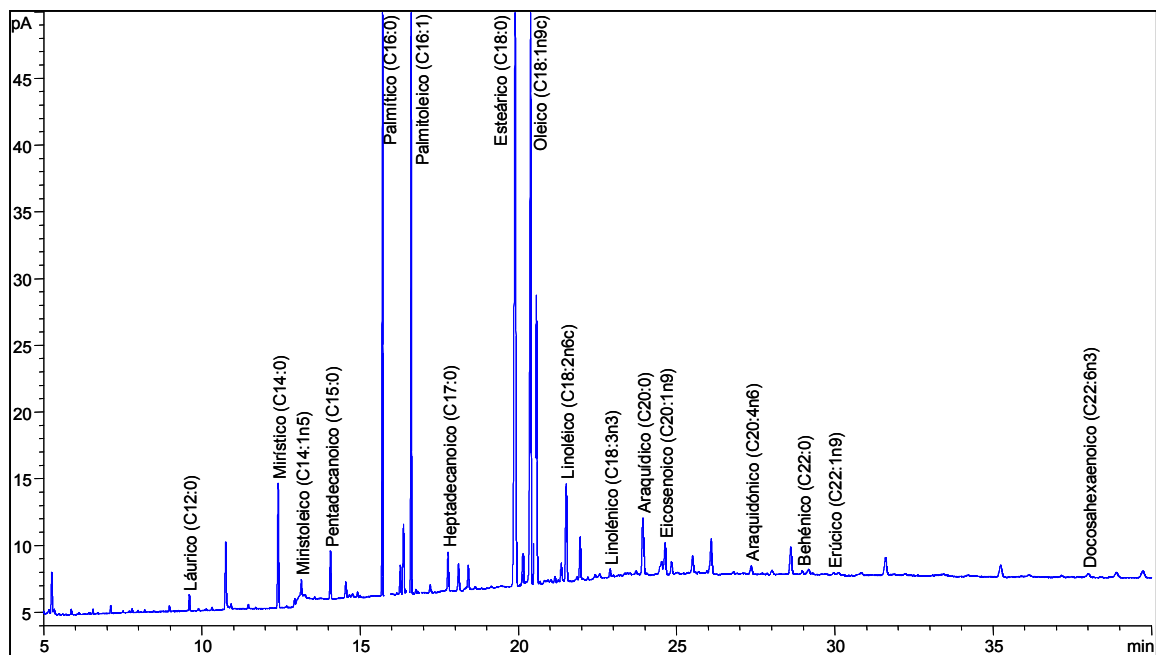


Figura 11. Perfil cromatográfico de los FA presentes en la fracción de TAG del neonato de *Mabuya* sp., obtenidos por GC-FID. Columna DB-23 (60 m X 0.25 mm X 0.25 μ m).

3.2.3.2 Perfiles de FA de PL de *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios.

En la **Tabla 12**, se muestra la composición de FA de las fracciones de PL para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp., caracterizadas por un incremento continuo en la cantidad relativa de UFA, de 35 a 64%, durante su desarrollo embrionario. Los FA mayoritarios en los PL fueron C16:0, C18:0 y C18:1 n9, en intervalos de cantidades relativas de 19.0-26.2, 13.5-27.5 y 13.5-31.9%, respectivamente (Véase **Tabla 12**).

Un comportamiento peculiar de los FA mayoritarios, fue relacionado con el incremento de C18:1 n9 desde 13.5 hasta 31.9%, acompañado de una disminución del ácido C16:0 de 24.3 a 19.8%, durante el desarrollo del embrión.

Tabla 12. Cantidad relativa promedio (%) de FA en las fracciones de PL en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD RELATIVA (%) DE FA EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	0,36 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Mirístico (C14:0)	2,1 ± 0,1	2,12 ± 0,09	1,36 ± 0,05	1,42 ± 0,04	1,1 ± 0,1	0,61 ± 0,04
Miristoleico (C14:1n5)	-	-	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,01
Pentadecanoico (C15:0)	-	1,57 ± 0,06	1,65 ± 0,05	1,50 ± 0,04	0,93 ± 0,03	0,38 ± 0,02
Palmítico (C16:0)	24,3 ± 0,5	26,2 ± 0,5	19,0 ± 0,5	20,6 ± 0,4	21,6 ± 0,6	19,8 ± 0,4
Palmitoleico (C16:1)	-	0,69 ± 0,05	0,87 ± 0,05	1,25 ± 0,06	3,6 ± 0,1	5,8 ± 0,2
Heptadecanoico (C17:0)	-	2,11 ± 0,09	2,0 ± 0,1	1,41 ± 0,05	0,93 ± 0,06	0,45 ± 0,03
Estearico (C18:0)	24,8 ± 0,7	27,5 ± 0,5	21,1 ± 0,5	19,2 ± 0,4	18,5 ± 0,3	13,5 ± 0,2
Oleico (C18:1n9c)	13,5 ± 0,4	14,9 ± 0,4	15,0 ± 0,4	17,0 ± 0,4	24,3 ± 0,4	31,9 ± 0,5
Linoleico (C18:2n6c)	8,1 ± 0,2	9,6 ± 0,3	15,6 ± 0,3	12,8 ± 0,3	6,1 ± 0,2	4,9 ± 0,2
γ-Linolénico (C18:3n6)	-	0,14 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Linolénico (C18:3n3)	3,4 ± 0,1	0,43 ± 0,02	0,94 ± 0,04	1,42 ± 0,04	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Araquídico (C20:0)	3,7 ± 0,1	4,5 ± 0,2	1,07 ± 0,06	1,68 ± 0,05	0,50 ± 0,02	0,71 ± 0,03
Eicosenoico (C20:1n9)	0,75 ± 0,04	1,36 ± 0,05	1,32 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,72 ± 0,04	1,11 ± 0,04
Eicosadienoico (C20:2n6)	-	0,59 ± 0,05	1,24 ± 0,07	0,82 ± 0,06	0,37 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	0,40 ± 0,04	1,08 ± 0,07	0,96 ± 0,08	0,70 ± 0,02	0,74 ± 0,04
Araquidónico (C20:4n6)	5,0 ± 0,1	4,6 ± 0,1	10,5 ± 0,3	10,1 ± 0,3	12,2 ± 0,2	7,4 ± 0,2
Behénico (C22:0)	-	0,75 ± 0,05	0,86 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,53 ± 0,02
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	5,3 ± 0,1	0,49 ± 0,02	1,04 ± 0,07	2,55 ± 0,09	1,44 ± 0,08	1,68 ± 0,05
Erúcico (C22:1n9)	-	0,35 ± 0,05	0,51 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,29 ± 0,01
Nervónico (C24:1)	-	0,60 ± 0,04	1,01 ± 0,04	0,56 ± 0,04	0,58 ± 0,03	1,55 ± 0,1
Docosahexaenoico (C22:6n3)	3,8 ± 0,1	0,89 ± 0,05	3,41 ± 0,05	4,6 ± 0,1	5,2 ± 0,1	7,9 ± 0,2

El ácido graso poliinsaturado C₁₈ mayoritario fue el C18:2 n₆, que presentó un incremento inicial llegando a un máximo en su cantidad relativa para el embrión medio (15.6%), seguidamente, se dio una disminución del mismo durante los demás estados de desarrollo embrionarios, llegando a un mínimo para el neonato (4.9%). Los principales ácidos poliinsaturados C₂₀₋₂₂, fueron el C20:4 n-6 y el C22:6 n-3. Este último tiene la particularidad de incrementar su cantidad relativa durante el desarrollo desde el embrión medio (0.89%) hasta alcanzar su cantidad máxima para el neonato (7.9%). El aumento relativo de C22:6 n-3, puede resultar debido a la conversión de los FA precursores, ácidos linolénico (C18:3 n-3) y C20:5 n-3, al ácido C22:6 n-3, por reacciones de desaturación/elongación en el tejido del embrión (Thompson *et al.*, 1999a, b; Speake *et al.*, 2004). Aunque el desarrollo del sistema nervioso de los reptiles no requiere, aparentemente, la toma preferencial de C22:6 n-3 de la yema; el cerebro embrionario es rico en moléculas de PL que contienen este ácido poliinsaturado (Speake *et al.*, 1994); además, hay evidencias para la expresión de mecanismos que promueven este enriquecimiento (Speake y Thompson, 2000, Speake y Deans, 2004; Speake *et al.*, 2004). Por ejemplo, en la tortuga *Emydura macquarii* (Thompson *et al.*, 1998b), la proporción de C22:6 n-3 en los PL totales del recién nacido es el doble comparado con el del huevo inicial, resultado que fue similar para *Mabuya* sp., cuando se comparó el neonato con respecto a su estado inicial (huevo oviductal). Esta biomagnificación de C22:6 n-3, fue también común para especies de lagartos ovíparos y vivíparos de menor placentotrofia que *Mabuya* sp. (Speake y Thompson, 2000), así como en caimanes (Noble *et al.*, 1990), aves (Cherian y Sim, 1993; Maldjian *et al.*, 1995; Speake *et al.*, 1998a; Speake y Deans, 2004) y mamíferos (Innis, 1991; DuttaRoy, 2000). El incremento continuo de C22:6 n-3, va acompañado, de igual forma, de una disminución de los ácidos precursores, C18:3 n-3 y C20:5 n-3, que en *Mabuya* sp., bajaron de 3.4 a 0.29% y de 5.3 a 1.68%, respectivamente (Véase **Tabla 12**).

En la **Figura 12**, se muestra el perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-FID, de los FA presentes en la fracción de PL extraída de los lípidos de neonatos del lagarto vivíparo *Mabuya* sp.

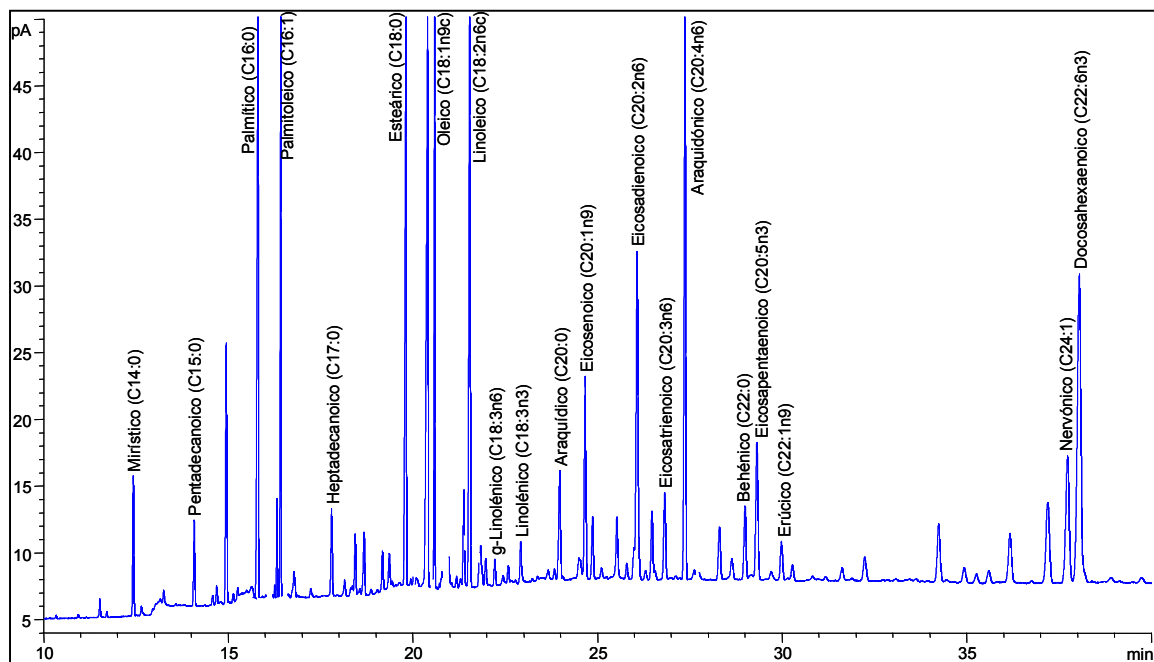


Figura 12. Cromatograma típico de los FA presentes en la fracción de PL del neonato de *Mabuya* sp., obtenidos por GC-FID. Columna DB-23 (60 m X 0.25 mm X 0.25 μ m).

3.2.3.3 Perfiles de FA en la fracción de CE para *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios.

Los FA mayoritarios presentes en la fracción de CE, a diferencia de los TAG y PL, no se caracterizaron por presentar una tendencia durante el desarrollo embrionario de *Mabuya* sp., ya que la cantidad relativa (%) de éstos para los diferentes estados fue muy variable. Los ácidos mayoritarios para los diferentes estados embrionarios fueron C16:0, C18:0, C18:1 n-9 y C20:0, excepto para el embrión medio, que tuvo la particularidad de poseer el contenido alto de C20:0 (40%), y

cantidades considerables de C20:1 n-9 (eicosenoico) y C20:4 n-6 (Véase **Tabla 13**). Este resultado observado en el embrión medio, que fue confirmado por GC-MS, puede indicar que esta especie en el estado embrionario medio utiliza preferiblemente este ácido como fuente energética o para la síntesis del tejido embrionario, en lugar del usual C18:1 n-9, descrito en la literatura (Speake y Thompson, 2000). Es de resaltar, que al comparar los FA mayoritarios en el estado inicial de desarrollo (huevo oviductal) con los presentes en el estado final (neonato), así como se ha estudiado en otras especies de lagartos (Speake y Thompson, 2000), se observa, que los SFA C16:0 y C18:0, incrementaron casi el doble durante el desarrollo del embrión de *Mabuya* sp. Aumento similar fue reportado por Speake *et al.*, 2004, para el lagarto vivíparo *Pseudemoia entrecasteauxii* (placentotrofia III); mientras que para el lagarto vivíparo *Eulamprus tympanum* (placentotrofia I) esta tendencia al contrario, ya que se observó una disminución de estos ácidos dos veces (Thompson *et al.*, 2001a).

A diferencia de *Mabuya* sp., los lagartos que anteceden en complejidad placentar, las especies *Pseudemoia* (*P. entrecasteauxii*, *P. pagenstecheri* y *P. spenceri*), se caracterizaron por la presencia del ácido C18:1 n9 como FA mayoritario, en cantidades superiores al 43 y 32% para huevos y neonatos, respectivamente (Thompson *et al.*, 1999b, c; Speake *et al.*, 2004). El ácido C18:2 n-6, fue otro compuesto acilo principal en esta clase de lípidos en lagartos ovíparos y vivíparos, con una cantidad relativa superior en los neonatos comparados con los de los huevos recientemente ovulados (Speake y Thompson, 2000). En *Mabuya* sp., el contenido del ácido C18:2 n-6 en el neonato, fue el doble comparado con el del huevo oviductal, lo que indica su transferencia a través de la placenta durante la gestación (Véase **Tabla 13**), fenómeno opuesto al observado para los PL.

Los principales ácidos poliinsaturados C₂₀₋₂₂, fueron el C20:4 n-6 y el C22:6 n-3, y sus cantidades relativas más altas se observaron para el estado inicial de

Tabla 13. Cantidad relativa promedio (%) de FA en las fracciones de CE en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD RELATIVA (%) DE FA EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	-	0,43 ± 0,03	0,44 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,60 ± 0,04
Mirístico (C14:0)	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2	1,10 ± 0,07	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,58 ± 0,1
Miristoleico (C14:1n5)	-	-	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Pentadecanoico (C15:0)	-	0,73 ± 0,06	0,26 ± 0,02	0,76 ± 0,04	0,60 ± 0,04	0,60 ± 0,03
Palmítico (C16:0)	12,3 ± 0,4	19,6 ± 0,6	3,4 ± 0,2	16,3 ± 0,4	23,7 ± 0,5	26,0 ± 0,6
Palmitoleico (C16:1)	-	0,49 ± 0,04	0,27 ± 0,02	3,0 ± 0,2	5,9 ± 0,2	4,2 ± 0,2
Heptadecanoico (C17:0)	0,40 ± 0,03	1,2 ± 0,1	0,25 ± 0,02	0,79 ± 0,06	0,86 ± 0,05	1,15 ± 0,06
Estearico (C18:0)	13,5 ± 0,4	22,0 ± 0,6	4,4 ± 0,2	13,0 ± 0,4	17,0 ± 0,5	25,8 ± 0,6
Oleico (C18:1n9c)	10,6 ± 0,3	12,8 ± 0,4	5,3 ± 0,2	22,0 ± 0,6	22,7 ± 0,6	16,4 ± 0,4
Linoléico (C18:2n6c)	2,52 ± 0,09	5,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,7 ± 0,2	3,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2
γ -Linolénico (C18:3n6)	-	-	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,51 ± 0,05
Linolénico (C18:3n3)	3,5 ± 0,2	0,70 ± 0,05	0,71 ± 0,07	1,26 ± 0,06	0,44 ± 0,03	0,32 ± 0,02
Araquídico (C20:0)	37,2 ± 0,7	15,0 ± 0,5	40 ± 1	17,9 ± 0,7	13,7 ± 0,4	8,2 ± 0,2
Eicosenoico (C20:1n9)	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	9,0 ± 0,3	4,7 ± 0,3	3,0 ± 0,1	0,71 ± 0,04
Eicosadienoico (C20:2n6)	-	1,0 ± 0,1	0,96 ± 0,06	0,99 ± 0,08	1,20 ± 0,08	0,93 ± 0,05
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	-	0,64 ± 0,05	0,51 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,33 ± 0,03
Araquidónico (C20:4n6)	10,8 ± 0,4	10,3 ± 0,5	17,1 ± 0,8	5,1 ± 0,2	2,72 ± 0,09	3,8 ± 0,2
Behénico (C22:0)	-	0,38 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,32 ± 0,02
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	2,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	0,69 ± 0,03	1,31 ± 0,06
Erúcico (C22:1n9)	-	-	0,47 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,28 ± 0,03
Nervónico (C24:1)	-	-	0,46 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Docosahexaenoico (C22:6n3)	4,0 ± 0,2	3,4 ± 0,2	5,9 ± 0,2	2,8 ± 0,1	1,07 ± 0,05	0,58 ± 0,02

desarrollo (huevo oviductal), comparado con el estado final (neonato). El lagarto vivíparo *P. spenceri* (Thompson *et al.*, 1999c), mostró una composición similar a la de *Mabuya* sp., en cuanto a estos FA, sin embargo, para las especies *P. entrecasteauxii* (Speake *et al.*, 2004) y *P. pagenstecheri* (Thompson *et al.*, 1999b), los resultados fueron opuestos a los de la primera especie. El ácido C22:6 n-3, presenta disminución en su cantidad relativa durante el desarrollo embrionario, excepto para el embrión medio, desde 4.0% para el huevo oviductal, hasta alcanzar su cantidad mínima de 0.58% en el neonato. La mayor cantidad relativa de los PUFA, se observó para el ácido C20:4 n-6, para los estados embrionarios huevo oviductal y embriones temprano y medio, en cantidades de 10.8, 10.3 y 17.1%, respectivamente.

En la **Figura 13**, se muestra el perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-FID, de los FA presentes en la fracción de CE extraída de los lípidos de neonatos del lagarto vivíparo *Mabuya* sp.

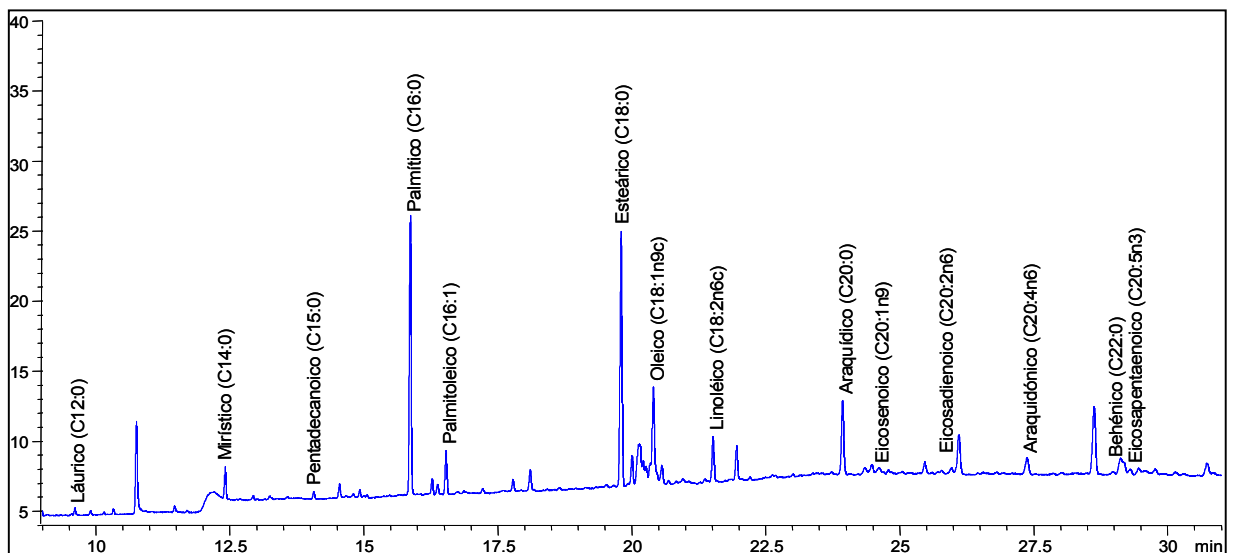


Figura 13. Cromatograma típico de los FA presentes en la fracción de CE del neonato de *Mabuya* sp., obtenido por GC-FID. Columna DB-23 (60 m X 0.25 mm X 0.25 µm).

3.2.3.4 Perfiles de FFA presentes en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

La transferencia de FFA de la madre a la circulación fetal de mamíferos se realiza por la acción de proteínas transportadoras de FA localizadas en las membranas plasmáticas de las células placentales. En particular, las proteínas enlazantes de ácidos grasos (*Fatty Acid Binding Protein*, p-FABP_{pm}) presentes en las microvellosidades de las células placentales humanas, en las que, se presume, se facilita la transferencia preferencial y unidireccional de C20:4 n-6 y C22:6 n-3 al feto (Dutta-Roy, 2000). En adición, la expresión placentar de la actividad hidrolítica de lipoproteínas lipasas causa la hidrólisis de triacilglicéridos de lipoproteínas en el plasma materno, liberando FFA, los cuales se transfieren a través de la placenta (Bonet *et al.*, 1992).

En la **Figura 14**, se muestra el perfil cromatográfico típico, obtenido por GC-FID, de los FFA presentes en los lípidos extraídos de neonatos del lagarto vivíparo *Mabuya* sp.

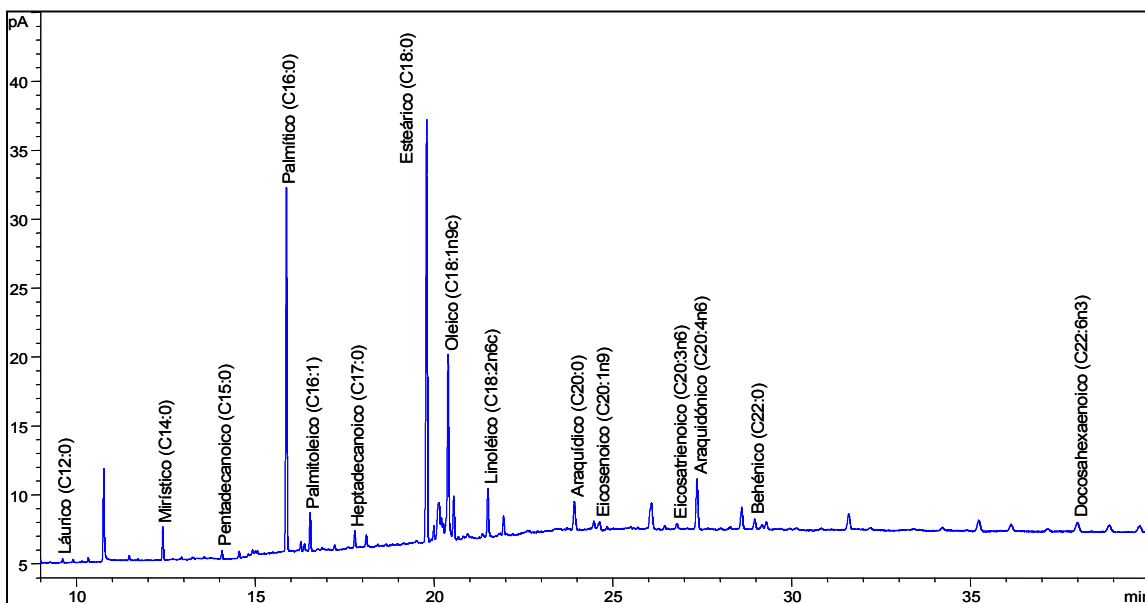


Figura 14. Cromatograma típico de FFA presentes en el neonato de *Mabuya* sp., obtenido por GC-FID. Columna DB-23 (60 m X 0.25 mm X 0.25 μ m).

Las fracciones de FFA para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp., al igual que las de CE, no presentaron una tendencia definida. Estas fracciones, contenían a los ácidos C16:0, C18:0 y C18:1 n-9, como mayoritarios, excepto para los estados embrionarios temprano y medio avanzado. Para estos últimos, el ácido C20:0, fue el ácido mayoritario, presente en cantidades relativas de 18.0 y 22.9%, respectivamente, y presente en cantidades considerables para los demás estados embrionarios, mostrando su menor valor para el neonato (2.8 %) y una relación de tres veces mayor cuando éste, es comparado con el huevo recientemente ovulado (Véase **Tabla 14**). El ácido C20:0, no ha sido reportado para las especies con placentotrofia menor a la presentada en *Mabuya* spp, *Pseudemoia* (*P. spenceri*, *P. entrecasteauxii* y *P. pagenstecheri*) (Thompson *et al.*, 1999b, c; Speake *et al.*, 2004), y se encontró, posiblemente, en trazas para esta fracción lipídica. Es de resaltar, que este ácido sólo ha sido reportado en los lagartos vivíparos *Eulampus tympanum* (Thompson *et al.*, 2001a) y *Niveoscincus coventryi* (Thompson *et al.*, 2001), presentes en una relación 1.8 veces mayor y 1.7 veces menor, respectivamente, en comparación con el valor en neonato, con su huevo recientemente ovulado.

Los SFA C16:0 y C18:0, en los estados embrionarios huevo oviductal, embriones medio y avanzado y neonato, presentaron una disminución inicial durante su desarrollo, con sus valores mínimos 15.3 y 12.2%, para los embriones medio avanzado y medio, respectivamente (Véase **Tabla 14**). La suma de estos SFA en la fracción lipídica de FFA, representa el 68% del total de los FA del huevo oviductal, mientras que para el neonato fue de 53%. Es de resaltar, que la suma de estos ácidos en los lagartos vivíparos estudiados en Australia, *N. metallicus* (Thompson *et al.*, 1999), *E. tympanum* (Thompson *et al.*, 2001a), *P. pagenstecheri* (Thompson *et al.*, 1999b) y *P. spenceri*, (Thompson *et al.*, 1999c), no supera el 32% de los FA totales presentes en los huevos recientemente ovulados, ni el 24% en sus respectivos neonatos.

Tabla 14. Cantidad relativa promedio (%) de FFA para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD RELATIVA (%) DE FA EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	-	0,31 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,77 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,20 ± 0,02
Mirístico (C14:0)	0,33 ± 0,03	1,82 ± 0,1	1,70 ± 0,1	1,15 ± 0,08	1,2 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Miristoleico (C14:1n5)	-	-	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Pentadecanoico (C15:0)	-	0,80 ± 0,04	1,35 ± 0,09	0,70 ± 0,04	0,67 ± 0,05	0,52 ± 0,05
Palmitico (C16:0)	32,0 ± 0,6	20,4 ± 0,7	16,1 ± 0,4	15,3 ± 0,4	19,9 ± 0,5	23,6 ± 0,7
Palmitoleico (C16:1)	-	0,83 ± 0,04	3,4 ± 0,2	1,13 ± 0,08	5,8 ± 0,3	2,5 ± 0,1
Heptadecanoico (C17:0)	1,60 ± 0,09	1,22 ± 0,07	1,1 ± 0,1	0,89 ± 0,04	0,78 ± 0,04	1,13 ± 0,09
Esteárico (C18:0)	36 ± 1	21,5 ± 0,6	12,2 ± 0,3	15,1 ± 0,4	17,7 ± 0,5	29,2 ± 0,8
Oleico (C18:1n9c)	21 ± 1	14,5 ± 0,4	22,8 ± 0,5	16,6 ± 0,4	25,5 ± 0,6	19,2 ± 0,4
Linoleico (C18:2n6c)	0,86 ± 0,07	8,3 ± 0,2	15,0 ± 0,4	8,3 ± 0,2	6,3 ± 0,3	3,9 ± 0,2
γ -Linolénico (C18:3n6)	-	-	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,02
Linolénico (C18:3n3)	-	0,48 ± 0,03	1,49 ± 0,07	0,94 ± 0,06	0,63 ± 0,05	0,13 ± 0,01
Araquídico (C20:0)	8,1 ± 0,7	18,0 ± 0,4	7,0 ± 0,2	22,9 ± 0,6	7,6 ± 0,3	2,8 ± 0,2
Eicosenoico (C20:1n9)	-	3,5 ± 0,2	2,4 ± 0,1	6,0 ± 0,2	0,41 ± 0,02	0,97 ± 0,07
Eicosadienoico (C20:2n6)	-	0,39 ± 0,02	1,31 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,18 ± 0,01	1,32 ± 0,1
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	-	0,88 ± 0,06	0,34 ± 0,03	-	0,52 ± 0,05
Araquidónico (C20:4n6)	-	6,1 ± 0,3	6,7 ± 0,2	6,3 ± 0,2	7,4 ± 0,3	6,5 ± 0,3
Behénico (C22:0)	-	0,21 ± 0,02	-	0,83 ± 0,06	0,32 ± 0,02	1,02 ± 0,08
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	-	0,47 ± 0,04	0,73 ± 0,06	0,07 ± 0,01	0,66 ± 0,04	1,32 ± 0,08
Erúcico (C22:1n9)	-	-	0,30 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Nervónico (C24:1)	-	-	0,13 ± 0,01	-	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Docosahexaenoico (C22:6n3)	-	1,19 ± 0,06	4,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1

Una particularidad en las especies de lagartos tanto ovíparos, como vivíparos, estudiados en Australia, es la presencia del ácido C18:1 n-9, como FA mayoritario tanto en huevos recientemente ovulados, como en neonatos, con valores que van, por ejemplo, desde 26% para neonatos de *Niveoscincus metallicus* (Thompson *et al.*, 1999), hasta cantidades que alcanzan el 41% para el neonato de *P. pagenstecheri* (Thompson *et al.*, 1999b). En *Mabuya* sp., este ácido está presente en el neonato en una cantidad relativa del 19.2%, y alcanza su mayor valor en el estado fetal (embrión avanzado) con un valor de 25.5%.

Los FA poliinsaturados C₁₈, a saber: C18:2 n-6, C18:3 n-6 y C18:3 n-3, presentaron una disminución continua a partir del estado embrionario medio hasta el neonato. Los ácidos poliinsaturados C₂₀₋₂₂, en los diferentes estados embrionarios, excepto para el huevo oviductal en los que estuvo ausente, fueron C20:4 n-6 y C22:6 n-3, en cantidades de 6.1 y 1.19%, respectivamente. Los ácidos C20:5 n-3 y eicosadienoico (C20:2 n-6), estuvieron presentes en menor cantidad, con mayores valores para el neonato (1.32%). Resultados similares, en los cuales C22:6 n-3, se encontró siempre en mayor cantidad, que el ácido C20:5 n-3, fueron obtenidos por Noble y McCarrthey (1993) en huevos de caimanes criados en cautiverio y en neonatos de lagartos vivíparos *P. pagenstecheri*, *P. spenceri* (Thompson *et al.*, 1999b, c) y *E. tympanum* (Thompson *et al.*, 2001a).

3.2.3.5 Cantidad absoluta de TFA presentes en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

Para la cuantificación de los TFA, presentes en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp., se utilizaron factores de respuesta (R_f) establecidos del análisis de soluciones de referencia de FAME. A diferencia de las cantidades relativas (%), las absolutas (µg FA/embrión o neonato), presentaron un incremento continuo de todos los FA durante el desarrollo embrionario de la población estudiada, con excepción de los ácidos C15:0, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:0 y

C20:2, que disminuyeron su cantidad entre el estado avanzado y el del neonato (Véase **Tabla 15**); y los ácidos C18:1 n-9, C18:2 n-6 y C22:6 n-3, entre el estado embrionario temprano a medio. La mayor velocidad de transferencia de TFA entre los estados bajo estudio, se dio especialmente, entre el estado medio avanzado y el estado avanzado, para los FA monoinsaturados C16:1 y C18:1 n9, con incrementos de 46 y 17 veces, respectivamente. En la **Tabla 15**, se muestran las cantidades absolutas (μg FA/embrión o neonato) de los TFA en los diferentes estados embrionarios y neonatos de la población de *Mabuya* estudiada. La cantidad absoluta (μg / embrión o neonato) de las fracciones lipídicas se muestra en el **Anexo 7**. Los ácidos C16:0 y C18:1 n9, fueron los FA mayoritarios para todos los estados embrionarios, alcanzando su máxima cantidad en el neonato con valores de 3490 y 4300 μg /neonato, respectivamente, seguidos de los ácidos C18:0, C22:6 n3, C20:4 n6 y C18:2 n6c, en cantidades de 1530, 404, 287 y 202 μg /neonato, respectivamente.

De los escasos reportes encontrados en la literatura revisada para las cantidades absolutas μg /huevo o neonato, se encuentra el trabajo, realizado por Speake *et al.*, 2004, en el lagarto vivíparo *Pseudemoia entrecasteauxii*; en el que reportaron resultados con cierta similitud a los obtenidos para *Mabuya sp.* Para *P. entrecasteauxii*, los FA mayoritarios fueron también los ácidos C16:0 y C18:1 n9, con cantidades de 1170 y 2610 μg /neonato, respectivamente. Los PUFA C18:2 n-6 y C18:3 n-3, disminuyeron su cantidad 0.7 y 0.5 veces, respectivamente, durante el desarrollo embrionario (de huevo a neonato). Esta disminución en *Mabuya sp.* fue de 0.6 veces, entre el desarrollo del estado avanzado a neonato.

El ácido C16:1, fue el FA que presentó la mayor transferencia placentar de la madre hacia el embrión durante el desarrollo embrionario de *Mabuya sp.*, con una relación 1426 veces mayor en el neonato comparado con el huevo oviductal. En *P. entrecasteauxii*, la mayor transferencia se dio para el ácido C22:6 n3 seguido del

Tabla 15. Cantidad absoluta promedio (μg FA/embrión o neonato) de TFA en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD ABSOLUTA (μg FA/embrión o neonato) DE FA EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	-	-	-	-	7,4 \pm 0,4	6,7 \pm 0,6
Mirístico (C14:0)	1,20 \pm 0,01	4,4 \pm 0,1	6,1 \pm 0,1	17,0 \pm 0,2	117 \pm 1	142 \pm 2
Miristoleico (C14:1n5)	-	-	-	-	19,4 \pm 0,1	24,5 \pm 0,2
Pentadecanoico (C15:0)	2,44 \pm 0,01	6,0 \pm 0,1	7,7 \pm 0,1	17,1 \pm 0,1	62 \pm 1	57 \pm 1
Palmítico (C16:0)	16,4 \pm 0,2	49 \pm 4	75 \pm 1	218 \pm 2	3170 \pm 8	3490 \pm 30
Palmitoleico (C16:1)	1,15 \pm 0,02	5,0 \pm 0,1	9,5 \pm 0,1	29,8 \pm 0,3	1360 \pm 3	1640 \pm 13
Heptadecanoico (C17:0)	2,27 \pm 0,03	6,6 \pm 0,2	6,9 \pm 0,1	17,2 \pm 0,1	51,1 \pm 0,3	60 \pm 1
Esteárico (C18:0)	16,4 \pm 0,2	48 \pm 2	63 \pm 1	188 \pm 3	1320 \pm 7	1530 \pm 10
Oleico (C18:1n9c)	28,6 \pm 0,2	52 \pm 1	45,2 \pm 0,6	199 \pm 2	3300 \pm 15	4300 \pm 27
Linoleico (C18:2n6c)	22,5 \pm 0,5	34,3 \pm 0,6	18,3 \pm 0,3	82,8 \pm 0,5	325 \pm 2	202 \pm 2
γ -Linoléico (C18:3n6)	-	-	-	1,70 \pm 0,02	17,4 \pm 0,1	9,6 \pm 0,2
Linoléico (C18:3n3)	1,3 \pm 0,1	-	2,2 \pm 0,1	29,6 \pm 0,1	35,6 \pm 0,2	22,8 \pm 0,3
Araquídico (C20:0)	4,62 \pm 0,1	7,5 \pm 0,8	5,1 \pm 0,2	7,8 \pm 0,1	105 \pm 1	95 \pm 3
Eicosenoico (C20:1n9)	1,3 \pm 0,1	3,7 \pm 0,4	3,4 \pm 0,1	9,2 \pm 0,2	52,5 \pm 0,6	109 \pm 1
Eicosadienoico (C20:2n6)	2,85 \pm 0,06	-	1,3 \pm 0,1	6,1 \pm 0,1	19,5 \pm 0,1	9,7 \pm 0,2
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	-	-	6,3 \pm 0,1	22,9 \pm 0,6	30,1 \pm 0,6
Araquidónico (C20:4n6)	12,7 \pm 0,1	16,5 \pm 0,3	17,5 \pm 0,2	59 \pm 1	272 \pm 2	287 \pm 2
Behénico (C22:0)	0,61 \pm 0,03	2,2 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	19,9 \pm 0,4	57,9 \pm 0,8
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	1,4 \pm 0,1	-	2,8 \pm 0,2	18,3 \pm 0,2	51 \pm 1	63 \pm 1
Erúcico (C22:1n9)	-	-	1,3 \pm 0,1	2,61 \pm 0,03	6,8 \pm 0,4	18,3 \pm 0,1
Nervónico (C24:1)	-	-	1,9 \pm 0,4	3,3 \pm 0,1	13,9 \pm 0,2	48,4 \pm 0,5
Docosahexaenoico (C22:6n3)	4,6 \pm 0,2	5,8 \pm 0,5	4,6 \pm 0,1	36,8 \pm 0,3	189 \pm 1	404 \pm 3

ácido C16:1, con tan solo una relación de 3.8 y 264 veces mayor, respectivamente.

En general, la composición de los TFA en *Mabuya* sp., así como de sus fracciones lipídicas, probablemente, refleja la composición de la dieta maternal, tal como lo demostró Speake y Herbert (2004) para lagartos ovíparos y vivíparos estudiados en Australia; sin embargo, estos estudios no han sido desarrollados para *Mabuya* sp., y serán fuente de posteriores estudios para ampliar el conocimiento acerca del patrón nutricional de esta especie americana.

3.2.4 Identificación por espectrometría de masas de algunos FA en las fracciones lipídicas de TAG y PL extraídas de *Mabuya* sp.

Con el fin de obtener una mayor certeza en la identificación de FA presentes en las muestras bajo estudio, se realizó el análisis por cromatografía de gases de alta resolución con detector selectivo de masas (GC-MS) de los correspondientes ésteres metílicos. Los espectros de masas obtenidos fueron comparados con los de la base de datos del equipo, *i.e.* Wiley 138, NBS 74K y Adams, y con los de patrones certificados (Supelco 37, *Component FAME Mix*). Se estudio también sus patrones de fragmentación.

El grado de coincidencia entre los espectros de masas de los ésteres metílicos de FA y los de las bases de datos del GC-MS, superó el 95 %, con excepción de los PUFA, para los cuales la variación fue entre el 87 y 90%. La interpretación “manual” de los espectros de masas, implicó el estudio de las rutas de fragmentación, típicas para los FAME.

En la **Figura 15**, se ilustra el espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico, SFA, compuesto mayoritario en las fracciones lipídicas de TAG y PL del

neonato de *Mabuya* sp. En el espectro de masas de este ácido, se destaca la presencia del ion pico de base, con una relación m/z 74, que corresponde al producto de rearrreglo McLafferty [McLafferty, 1993]. El ion molecular M^+ (m/z 270), con una intensidad media (20%), se fragmenta eliminando los radicales $CH_3O\cdot$ y $C_3H_7\cdot$, con formación de los fragmentos en 239 y m/z 227, respectivamente.

En el **Esquema 1**, se puede apreciar la ruta de fragmentación del éster metílico del ácido palmítico (C16:0). El patrón de fragmentación de los demás SFA presentes en las fracciones lipídicas mayoritarias extraídas de la grasa de *Mabuya* sp., son similares.

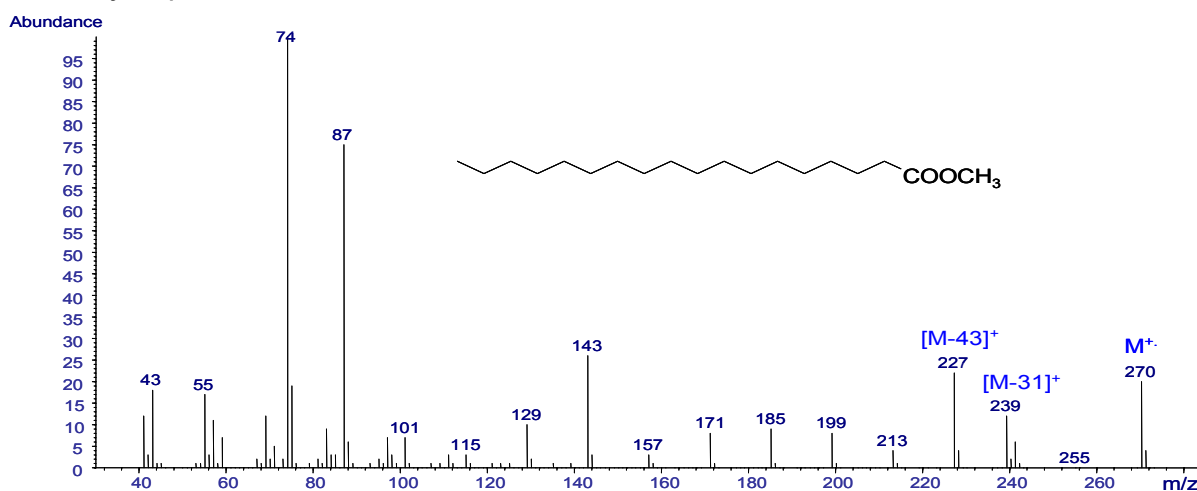
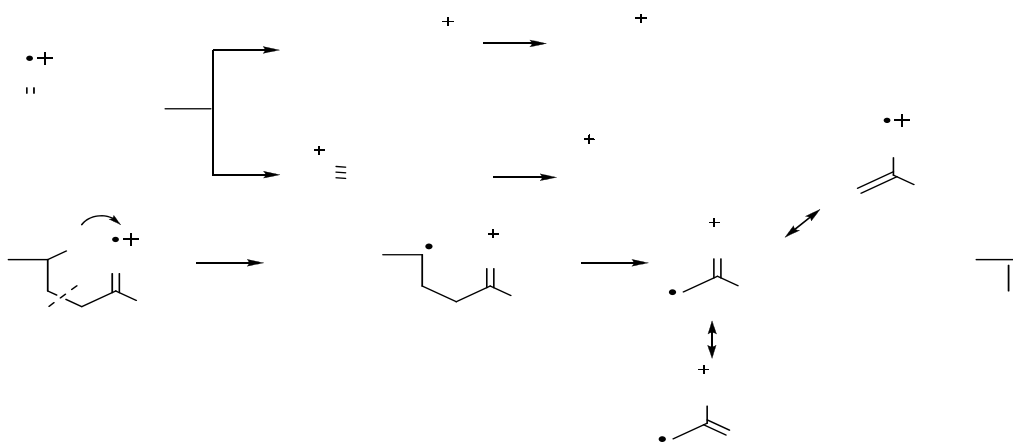


Figura 15. Espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico, EI (70 eV).



Esquema 1. Fragmentación típica del éster metílico del ácido palmítico.

En la **Figura 16**, se presenta el espectro de masas del éster metílico del ácido oleico (C18:1), UFA, compuesto que también es mayoritario en las fracciones lipídicas de TAG y PL del neonato de *Mabuya* sp. Su ruta de fragmentación, se ilustra en el **Esquema 2**, y se caracteriza por la formación del ion molecular, M^+ , en m/z 296, y de los iones correspondientes a las pérdidas del radical $CH_3O\cdot$ y del reordenamiento McLafferty, en m/z 265 y m/z 222 respectivamente. Además, el ion pico de base, en m/z 55, corresponde a la formación del ion $[C_4H_7]^+$.

El impacto de electrones (EI, 70 eV), usado como modo de ionización en el análisis de UFA mediante GC-MS, no permite distinguir la posición de dobles enlaces y el tipo de isómeros *cis*- o *trans*-.

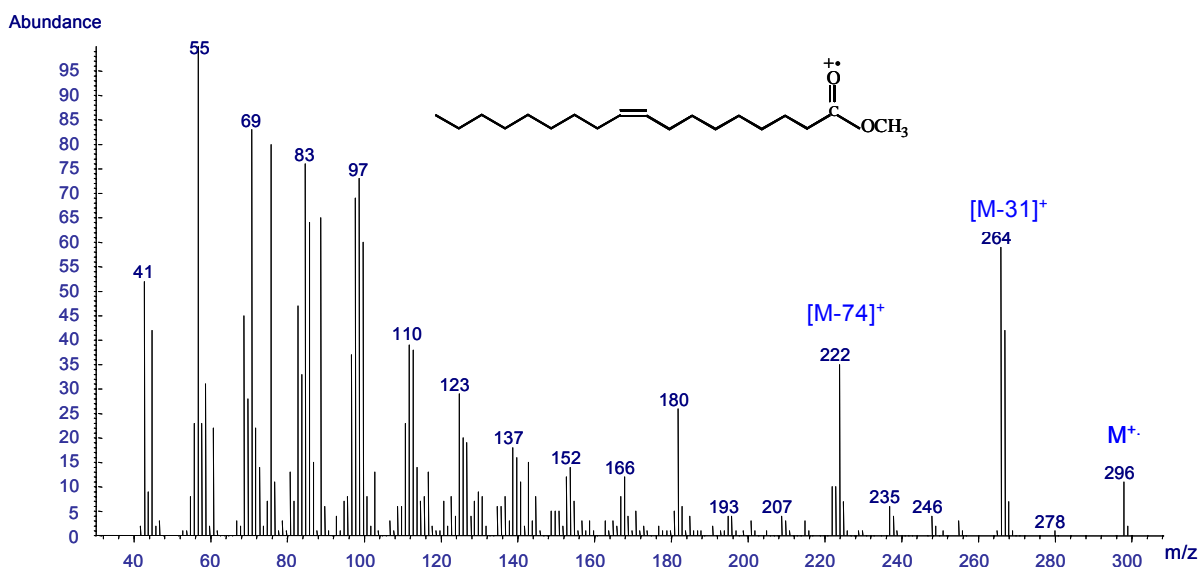
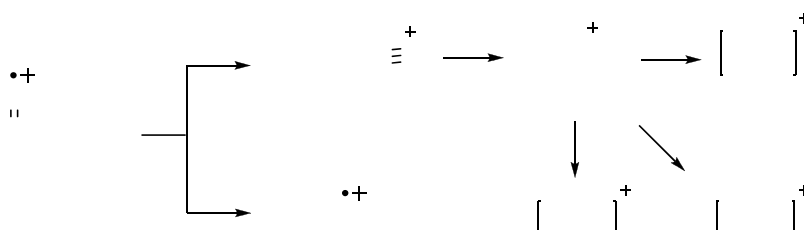


Figura 16. Espectro de masas del éster metílico del ácido oleico, EI (70 eV).



Esquema 2. Fragmentación típica del éster metílico del ácido oleico

3.2.5 Colesterol presente en el lagarto vivíparo *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios

El análisis del colesterol se realizó por GC-MS en el modo de monitoreo del ion(es) seleccionado(s) (SIM), del derivado acetilado. El porcentaje de recuperación (%) del colesterol obtenido mediante la metodología empleada, descrita en los Numerales 2.7.1 y 2.7.2 de la Parte Experimental, fue de $94 \pm 1\%$. En la **Tabla 16**, se presenta la cantidad absoluta (μg colesterol/embrión o neonato) de CE y FC en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

Tabla 16. Cantidad del colesterol libre (FC) y esterificado (CE) en los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

MUESTRA	Concentración promedio de FC y CE $\pm \sigma$ (μg / embrión o neonato)			
	CE	FC	Total	n
Huevo oviductal	$19,4 \pm 0,2$	$<0.6^*$	$19,4 \pm 0,2$	8
Embrión temprano	21 ± 1	26 ± 2	47 ± 2	5
Embrión medio	27 ± 2	27 ± 2	54 ± 2	8
Embrión medio avanzado	98 ± 5	210 ± 7	310 ± 10	12
Embrión avanzado	105 ± 2	720 ± 6	830 ± 6	5
Neonato	42 ± 2	1100 ± 52	1140 ± 52	4

* NMQ=2NMD de la metodología (S/N = 5)

El contenido del colesterol en el neonato puede ser el mejor indicador del transporte placentar de lípidos, ya que éste no puede ser oxidado para la obtención de energía (Speake y Thompson, 2000). La cantidad de CE y FC en el neonato, fue 2.2 y >1830 veces mayor, respectivamente, que la cantidad de colesterol presente inicialmente en el huevo oviductal. Tal diferencia, sustenta el elevado índice de placentotrofía que caracteriza a *Mabuya* sp. Sin embargo, es de resaltar, que, posiblemente, gran proporción del colesterol requerido para su

desarrollo, se sintetiza *de novo* por el embrión (Speake *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2001 a, b).

En la **Figura 17**, se observa la variación en la transferencia placentar del colesterol (FC y CE), durante el desarrollo embrionario. La cantidad y la proporción de FC incrementaron progresivamente a medida que se desarrollaba el embrión de *Mabuya* sp. El contenido de CE cambió desde $19,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{huevo}$ para el huevo oviductal, hasta 105 ± 2 $\mu\text{g}/\text{embrión}$ para el estado embrionario, antes del nacimiento (embrión avanzado). Esta transferencia ocurrió a una velocidad mucho menor comparada con la que se dio para el FC. En el neonato, la cantidad de CE fue de 42 ± 2 $\mu\text{g}/\text{neonato}$, se disminuyó su contenido 2.5 veces en comparación con el estado embrionario anterior (embrión avanzado). Esta disminución podría ser el resultado del alto requerimiento de CE por el embrión, para su desarrollo, por lo que éste recurre a sus reservas en forma esterificada. Sin embargo, esta interpretación necesita mayor documentación.

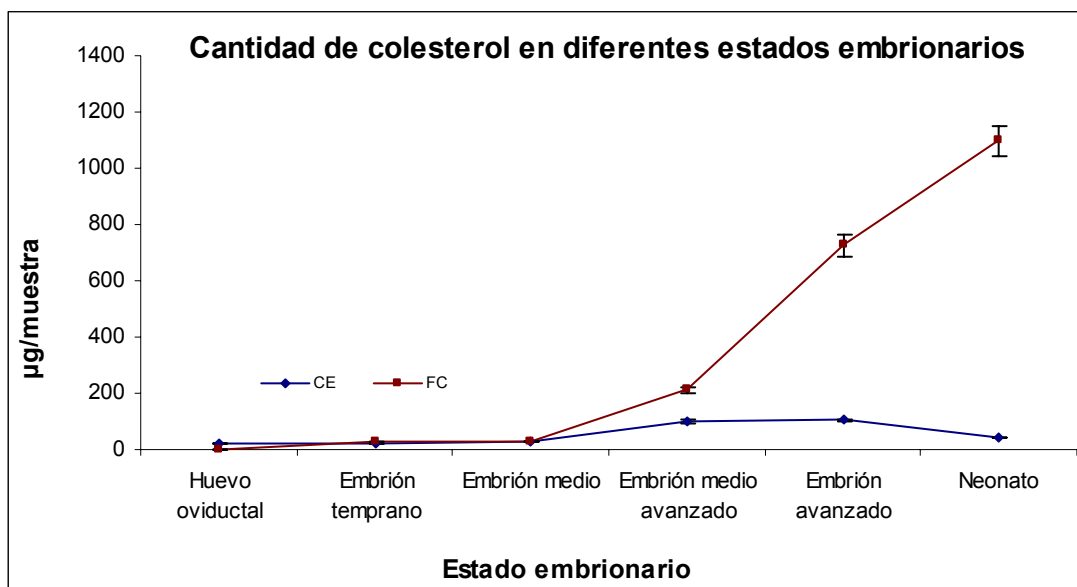


Figura 17. Cantidad de FC y CE en el lagarto vivíparo *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios.

Para el embrión medio, la cantidad de FC y CE fue similar ($27 \pm 2 \mu\text{g}/\text{embrión}$). La prueba G realizada para la cantidad de FC transferido, mostró diferencias significativas entre los estados de desarrollo $G_{(0.05, 5)} = 3043.62$, $p < 0.001$. Esta prueba, mostró también variación significativa para la cantidad de CE entre los estados de desarrollo $G_{(0.05, 5)} = 141.6$, $p < 0.001$.

En la **Figura 18**, aparecen las corrientes iónicas reconstruidas (TIC) para el derivado acetilado del colesterol presente en el neonato de *Mabuya* sp. y la señal correspondiente al material de referencia certificado. En el **Anexo 7**, se adjuntan la corriente iónica reconstruida (TIC) del derivado acetilado del colesterol y la curva de calibración.

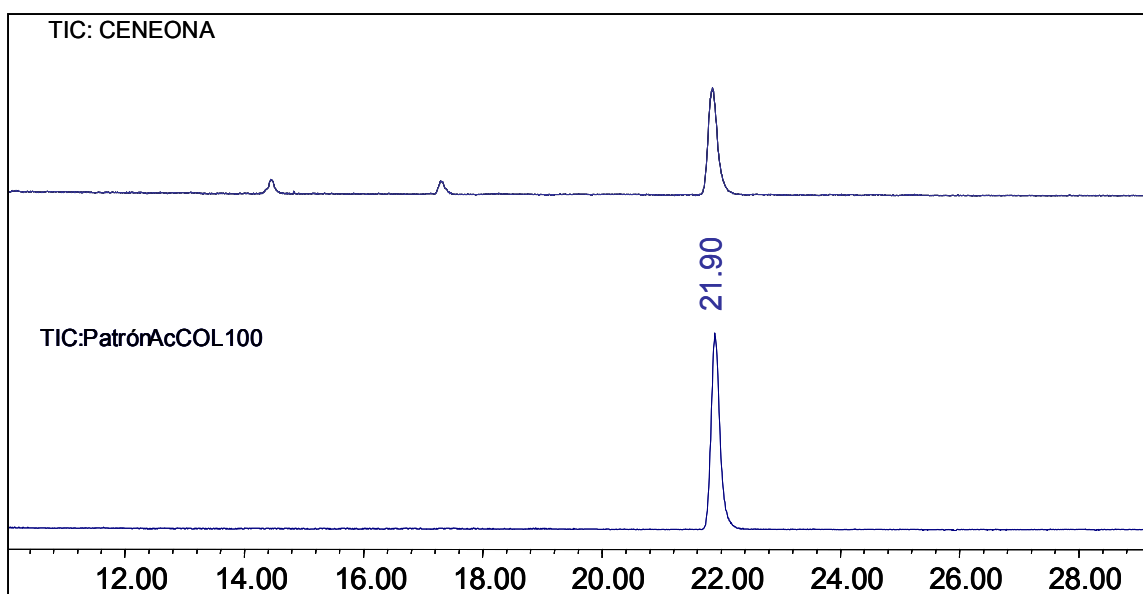


Figura 18 Corriente iónica total (TIC) del derivado acetilado de colesterol presente en el neonato y el del material de referencia certificado de acetato de colesterol, obtenidos por GC-MS. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 μm).

El contenido relativo de FC (% de FC con respecto a los lípidos totales) en el huevo oviductal, fue < 0.2 %, que representa una cantidad relativa menor que la encontrada en huevos de lagartos ovíparos del género *Lampropholis* (*L. guichenoti* y *L. delicada*) estudiados en Australia, cuyos valores fueron ca. 1% (Thompson *et al.*, 2001). Valores aún menores comparados se observaron para aves (pollo, gaviota, pingüino y paloma) y caimán (Noble, 1991), la tortuga de agua dulce *Emydura macquarii* (Thompson *et al.*, 1999a) y algunas especies vivíparas de lagartijas (Thompson, *et al.*, 1999c,d); el contenido de FC fue de forma consistente con un valor ca. 5% de los lípidos totales.

En aves, la proporción de FC en la yema es muy resistente a cambios por genética, dieta o medios farmacológicos, y, por ende, hay poca variación de la cantidad de este esteroide entre especies (Speake *et al.*, 1998a). Los resultados obtenidos para lagartos tanto ovíparos, como vivíparos (Véase **Tabla 17**), no presentaron una tendencia bien definida para las cantidades relativas de FC, según su modo de paridad, al contrario, estuvieron distribuidos de forma aleatoria.

El contenido relativo de CE en el huevo oviductal (6.5 %) para el lagarto vivíparo *Mabuya* sp., estuvo presente en una cantidad intermedia entre 4.7 y 7.1%, en comparación con las especies *Pseudemoia* (*pagenstecheri*, *spenceri* y *entrecasteauxii*), lagartos, que se caracterizan por la mayor placentotrofia después de la especie estudiada en este proyecto. Sin embargo, la cantidad relativa de CE en el neonato de *Mabuya* sp. (0.11 %), fue menor, que la cantidad relativa de CE comparado con las demás especies de lagartos estudiados en Australia (Véase **Tabla 17**).

Tabla 17. Cantidad y proporción de FC y CE en huevos y neonatos de lagartos ovíparos y vivíparos que presentan diferentes modos de paridad.

Especie	Referencia bibliográfica	Paridad*	FC, %		CE, %	
			Huevo	Neonato	Huevo	Neonato
<i>Lampropholis guichenoti</i> ^a	Thompson, <i>et al.</i> , (2001)	O	0,7 ± 0,3	7,7 ± 0,4	2,2 ± 0,2	10 ± 1
<i>Lampropholis delicata</i> ^a	Thompson, <i>et al.</i> , (2001)	O	1,3 ± 0,3	7,9 ± 0,4	2,0 ± 0,4	15 ± 4
<i>Eulamprus tympanum</i> ^b	Thompson, <i>et al.</i> , (2001a)	V I	1,9 ± 0,1	7,3 ± 0,6	1,3 ± 0,1	7,0 ± 0,4
<i>Niveoscincus metallicus</i> ^c	Thompson, <i>et al.</i> , (1999)	V II	6 ± 1	7,6 ± 0,6	5 ± 2	8,4 ± 0,6
<i>Niveoscincus coventryi</i> ^d	Thompson, <i>et al.</i> , (2001)	V II	2,9 ± 0,3	9,9 ± 0,7	4 ± 1	9 ± 1
<i>Pseudemoia pagenstecheri</i> ^e	Thompson, <i>et al.</i> , (1999b)	V III	5,0 ± 0,2	12,5 ± 0,6	7,1 ± 0,4	8,2 ± 0,8
<i>Pseudemoia spenceri</i> ^f	Thompson, <i>et al.</i> , (1999c)	V III	2,3 ± 0,3	4,8 ± 0,6	4,7 ± 0,9	7,1 ± 0,8
<i>Pseudemoia entrecasteauxii</i> ^g	Speake, <i>et al.</i> , (2004)	V III	1,9 ± 0,4	4,3 ± 0,3	7,8 ± 1,4	4,7 ± 0,6
<i>Mabuya sp.</i>		V IV	< 0,2**	2,9 ± 0,1	6,5 ± 0,1	0,11 ± 0,01

* Abreviaciones: O, Ovíparo; VI, VII, VIII, Vivíparo con placenta Tipo I, II, III ó IV.

** Cantidad presente por debajo del NMD

3.2.6 Vitaminas liposolubles (A y E) presentes en el lagarto vivíparo *Mabuya* sp. en diferentes estados embrionarios:

Debido al tamaño tan pequeño y complejo de las muestras bajo estudio, fue necesario el uso de muestras compuestas, para la determinación de las vitaminas liposolubles A y E, por HPLC/DAD/FLD. En la **Tabla 18**, se presentan las cantidades de vitaminas A (Retinol) y E (α -tocoferol), encontrados para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

Tabla 18. Cantidad de vitaminas A y E presentes en diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

NOMBRE MUESTRA	Concentración (ng vitamina/ embrión o neonato)		
	Vitamina A *	Vitamina E	n **
Huevo oviductal	< 25	< 10	6
Embrión temprano	< 25	< 10	5
Embrión medio	< 25	230 ± 13	10
Embrión medio avanzado	< 25	360 ± 12	8
Embrión avanzado	< 25	< 10	3
Neonato	< 25	640 ± 20	5

* NMC = 2NMD (S/N =5) ** Cantidad de embriones o neonatos

Como se puede observar en la **Tabla 18**, este estudio indica, que los diferentes estados embrionarios del lagarto vivíparo *Mabuya* sp., carecen de vitamina A o ésta se encuentra en cantidades inferiores al NMD de la metodología utilizada (25 ng/ embrión o neonato). Resultados similares se obtuvieron por Speake *et al.* (2001), para huevos de tortuga Hermann (*Testudo hermanni boettgeri*), en los cuales se observó, que la especie careció también de esta vitamina (vitamina A). Estudios realizados sobre huevos del lagarto vivíparo *P.pagenstacheri*, mostraron que el contenido de vitamina A (4.1 mg/g) fue *ca.* el doble que en huevos de otros

reptiles: *Emydura macquarii* (tortuga) y *Niveoscincus metallicus* (lagarto) (Thompson *et al.*, 1998b), pero menor que la cantidad encontrada en la yema de huevo de gallina (Naber y Squires, 1993), y otras aves (Ionov *et al.*, 1994).

La vitamina A y sus derivados cumplen funciones esenciales en el desarrollo del embrión, particularmente durante la proliferación y diferenciación celular, morfogénesis y en el desarrollo de la retina (Gaal *et al.*, 1995; Morris – Kay y Sokolova, 1996). La carencia de vitamina A en *Mabuya* sp., se debe, posiblemente, a la poca habilidad del embrión para convertir el β -caroteno transferido por la madre a través de la placenta, a vitamina A. Otra posible alternativa puede ser que la vitamina A esté presente en los embriones en forma del ácido retinoico, el cual no puede ser detectado por la metodología usada en este proyecto, tal como lo reporta Speake *et al.* (2001) para los huevos de tortuga Hermann (*Testudo hermanni*).

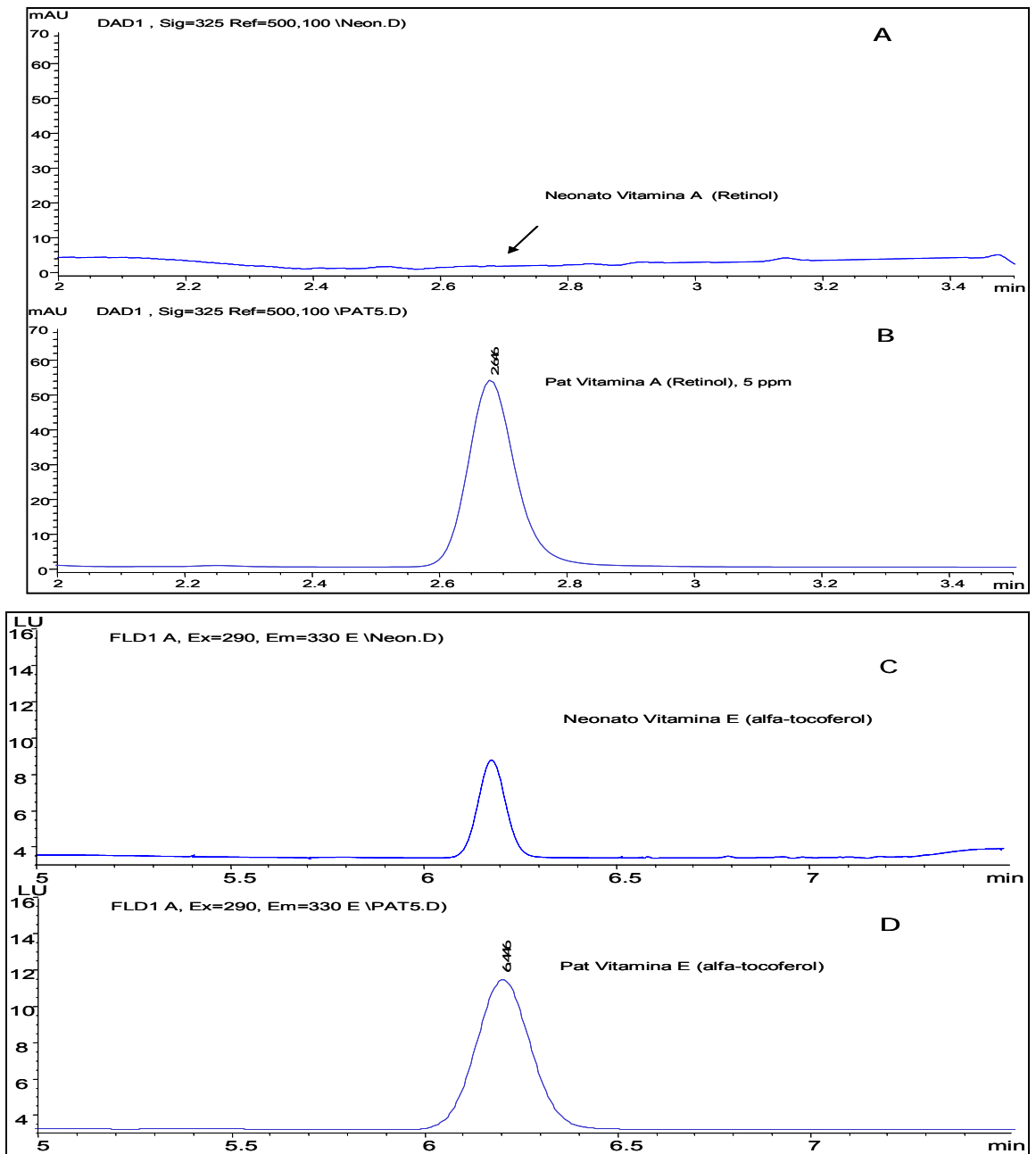
Para los estados embrionarios de *Mabuya* sp., huevo oviductal, huevo medio y huevo avanzado, la vitamina E, no se detectó por encima del NMD de la metodología utilizada. Es de resaltar, que la no detección de esta vitamina, se debe posiblemente a la poca transferencia placental de ésta en sus estados iniciales de desarrollo, a la ausencia de ésta en el huevo oviductal. porque el huevo prácticamente carece de la vitamina E y a la poca cantidad de muestra con que se contó, especialmente, para el estado embrionario avanzado (n= 3). Para los demás estados embrionarios se observa una transferencia creciente de vitamina E durante su desarrollo embrionario, que no puede ser más que a través de la placenta, encontrándose la mayor cantidad de vitamina para el neonato con una cantidad de 640 ± 29 ng/neonato ($3.3 \mu\text{g/g}$ neonato). Este contenido de vitamina E, es inferior al encontrado en huevos de otros reptiles estudiados en Australia (Thompson *et al.*, 1998; Thompson, *et al.*, 1999; Thompson, *et al.*, 1999b; Speake *et al.* 2001). Es de resaltar, que la literatura revisada reporta el contenido de vitaminas liposolubles (A y E) sólo en huevos, mas nunca en

neonatos. Tal vez, el contenido en estos últimos, se encuentra por debajo del NMD de la metodología utilizada (Thompson *et al.*, 1998; Thompson, *et al.*, 1999; Thompson, *et al.*, 1999b; Speake *et al.*, 2001).

La principal forma de vitamina E encontrada en reptiles es el α -tocoferol (Thompson, *et al.*, 1999b), pequeñas cantidades del γ -tocoferol también han sido reportados (Thompson, *et al.*, 1999). Estudios realizados en huevos del lagarto vivíparo *Niveoscincus metallicus* (Thompson *et al.*, 1999b), han reportado cantidad de la vitamina E (63 ± 3 mg/g) similar a la encontrada para huevos de tortuga (Thompson *et al.*, 1998), pero *ca.* el doble a la de huevos de *Pseudemoia pagenstecheri* (Thompson *et al.*, 1999). La cantidad de vitamina E en huevos de tortuga Hermann (*Testudo hermanni*) (46.8 μ g/g), fue *ca.* 60% de la presente en los huevos de *E. macquarii* (Speake *et al.*, 2001).

La vitamina E de la yema está presente casi completamente en la forma de α -tocoferol, lo que es consistente con la predominancia de esta isoforma en los cloroplastos de las plantas (Hess, 1993), fuente alimenticia de algunos insectos, presas principales de los lagartos (Caicedo, 2003; Speake y Herbert, 2004). La función principal de la vitamina E, derivada de la yema, es proporcionar protección antioxidante al embrión, previniendo el daño oxidativo al tejido en desarrollo (Surai, 1999; Surai *et al.*, 1999; Speake *et al.*, 2001).

En la **Figura 19**, se muestra el cromatograma típico, obtenido por HPLC/DAD/FLD de las vitaminas A y E presentes en el neonato y el del material de referencia, respectivamente. En el **Anexo 8**, se juntan los cromatogramas obtenidos por HPLC/DAD/FLD de las vitaminas A y E de referencia y sus curvas de calibración.



A. Extracto lipídico obtenido del neonato; **B.** Vitamina A de referencia (5 ppm); **C.** Extracto lipídico obtenido del neonato; **D.** Vitamina E de referencia (5 ppm).

Figura 19. Cromatogramas del extracto obtenidos del neonato por HPLC/DAD/FLD, así como los de las vitaminas A y E de referencia.

4. CONCLUSIONES

- El patrón de nutrición placentotrófica basado en la relación de masa seca entre el neonato y los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp., es el mayor conocido para reptiles escamados y similar a las *Mabuya* spp. estudiadas en Brasil.
- La determinación de la relación del peso seco entre el neonato y los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp., es una metodología simple y rápida que permitió estimar el transporte neto de material de la madre al embrión a través de la placenta;
- La determinación de pesos húmedo y seco para los embriones de *Mabuya* sp., mostró un incremento significativo desde los primeros estados de desarrollo embrionario, indicando, por ende, una transferencia neta de agua y materia seca durante toda la gestación;
- La cantidad absoluta de grasa (mg grasa/embrión o neonato) aumentó significativamente durante el desarrollo entre los diferentes estados embrionarios, demostrando el paso efectivo de lípidos a través de la placenta. Este resultado, sin embargo, no fue significativo para la cantidad relativa de grasa (% grasa);
- Aunque el huevo oviductal de *Mabuya* sp. aparentemente carezca de yema, se encontró que hay lípidos presentes con un perfil determinado y en una proporción mayor que en cualquier estado de desarrollo posterior, indicando que sí hay lípidos lecitotróficos en esta especie, aunque en una mínima cantidad.

- El análisis de las figuras de mérito, tales como la repetibilidad de t_R , áreas cromatográficas, % de recuperación y reproducibilidad de la metodología utilizada para llevar a cabo la extracción, derivación y cuantificación de los FA, colesterol y vitaminas liposolubles fue confiable ya que cumplió con las exigencias de las Buenas Prácticas de Laboratorio;
- La transferencia de FC incrementó progresiva y aceleradamente a medida que se desarrollaba la gestación y hasta el neonato de *Mabuya* sp.. Esta transferencia ocurrió a una velocidad mucho menor en CE comparada con FC;
- Para los estados embrionarios de *Mabuya* sp., huevo oviductal, embriones medio y avanzado, no se detectó la vitamina E, por encima del NMD de la metodología utilizada, sin embargo, para los demás estados embrionarios se observó una transferencia placentar creciente de vitamina, encontrándose la mayor cantidad para el neonato. La vitamina A no se detectó en ningún estado embrionario de *Mabuya* sp., por encima del NMD de la metodología utilizada (< 25 ng /embrión);
- Los ácidos C16:0, C18:0 y C18:1 n9, fueron mayoritarios para los estados embrionarios en las diferentes fracciones lipídicas, excepto para el embrión medio en la fracción CE y embriones temprano y medio avanzado en los FFA, donde lo fue el ácido C20:0;
- En la fracción de TAG, los ácidos C18:2 n-6 y C18:3 n-3, estuvieron en mayor proporción para los diferentes estados embrionarios comparado con el neonato (excepto para el huevo oviductal), lo que refleja, posiblemente, el uso preferencial de estos ácidos poliinsaturados como fuente energética durante el desarrollo embrionario, como también su conversión a derivados de mayor cadena carbonada, similar a lo que ocurre en otros lagartos;

- El aumento relativo del ácido C22:6 n-3 durante el desarrollo embrionario de *Mabuya* sp., acompañado de una disminución de los ácidos C18:3 n-3 y C20:5 n3 en la fracción de PL, posiblemente, es el resultado de la conversión de estos últimos como precursores, en el primero, por reacciones de desaturación/elongación en el tejido embrionario, tal como ha sido propuesto para lagartos australianos;
- La suma de los SFA en la fracción lipídica de FFA, representa el 68 y 53% del total de los FA para el huevo oviductal y el neonato, respectivamente, mientras que para los lagartos vivíparos con menor nivel de placentotrofia, no superan el 32 ni el 24%, respectivamente;
- En general, la composición de los FFA en *Mabuya* sp., así como de las demás fracciones lipídicas, probablemente, refleja la composición de la dieta maternal tal como se ha demostrado para lagartos ovíparos y vivíparos estudiados en Australia; sin embargo, estos estudios no han sido desarrollados para *Mabuya* sp., y serán fuente de posteriores investigaciones para ampliar el conocimiento acerca del patrón nutricional para esta especie americana.

5. RECOMENDACIONES

- ❖ Determinar el perfil lipídico de FA de varias presas de *Mabuya* sp., y compararlo con los perfiles lipídicos de FA de los estados embrionarios de *Mabuya* sp;
- ❖ Es necesario realizar la cuantificación relativa (%) de las fracciones lipídicas mayoritarias presentes en los estados embrionarios de *Mabuya* sp., empleando densitometría o HPLC con detectores másicos tales como MSD o ELSD (Evaporative Light Scattering Detector);
- ❖ Estudiar las fracciones fosfolipídicas y cuantificar los principales fosfolípidos (fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina) presentes en huevos y neonatos de *Mabuya* sp, empleando detectores másico, puesto que el DAD, no sirve ya que los solventes en que son solubles los PL responden en el rango en que dan respuesta estos últimos;
- ❖ Analizar las diferentes isoformas de vitaminas liposolubles estudiadas en este proyecto, en particular el γ -tocoferol y el ácido retinoico para las vitaminas E y A, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

Aleryani, S. L., Cluette, J. E., Khan, Z. A. and Laposata, M. 2005. Fatty acid methyl esters are detectable in the plasma and their presence correlates with liver dysfunction. *Clin. Chim. Acta.* 359 (1):141-149.

Anklam, E., Berg, H., Mathiasson, L. and Ulberth, F. 1998. Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review. *Food Addit. Contam.* 15, 729-750.

Badui, S. 1996. Química de los Alimentos. 3 ed. México : Legman de México. p. 213-220.

Blackburn, D. G.; Vitt, L. J. and Bauchat, A. 1984. Eutherian like reproductive specializations in a viviparous reptile. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:4860–4863.

Blackburn, D.G. and L.J. Vitt. 1992. Reproduction in viviparous South American lizards of the genus *Mabuya*. En: Stewart, J. R. and Thompson, M. B. 1993. A novel pattern of embryonic nutrition in a viviparous reptile. *J. Exp. Biol.* 174, 97-108.

Blackburn, D. G. 1992. Convergent evolution of Viviparity, Matrotrophy, and specializations for fetal nutrition in Reptiles and other Vertebrates. *Amer. Zool.* 32:313-321.

_____. 1994. Standardized criteria for the recognition of embryonic nutritional patterns in the Squamate Reptiles. *Copeia* 1994 (4):925-935.

Blackburn, D.G. and L.J. Vitt. 2002. Specialization of the chorioallantoic placenta in the Brazilian Scincid lizard *Mabuya heathi* a new placental morphotype for reptiles. *J. Morphol.* 254: 121-131.

Bligh, E. G., and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.

Bohinski, R. 1987. Bioquímica. 2 ed. México : Addison-Wesley Iberoamericana. p. 2-3.

Bonet B., Brunzell J.D., Gown, A.M. and Knoop R.H. 1992. Metabolism of very low density lipoprotein triglyceride by human placental cells: the role of lipoprotein lipase. En Speake, B. K., Herbert J. F, Thompson M. B. 2004. Evidence for placental transfer of lipids during gestation in the viviparous lizard, *Pseudemoia entrecasteauxii*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 139:213–220.

- Buyer, J. 2006. Rapid and sensitive FAME analysis of bacteria by cold trap injection gas chromatography. *J. Microbiol. Methods*. 67: 187–190.
- Caicedo Portilla, José Rances. 2003. Dieta de una población de *Mabuya mabouya* (Sauria: Scincidae) de Yacopí, Cundinamarca. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Biología.
- Carranza, A. 2003. Investigating the origen of transoceanis distributions: mtDNA shows *Mabuya* lizards (Reptilia, Scincidae) crossed the Atlantic twice. *Syst. Biod.* 1: 275-282.
- Carrapiso, A. and García, C. 2000. Development in lipid analysis: Some new extraction techiques and *in situ* transesterification. *Lipids* 35: 1167-1177.
- Cherian G. and Sim J. S. 1993. Net transfer and incorporation of yolk n-3 fatty acids into developing chick embryos. *Poult. Sci.* 72: 98-105.
- Christie, W.W. 1989. Gas Chromatography and Lipids. 2 ed. Dundee : Oily Press. p. 303-444.
- Cyberlipid Center. 2006. Purification and analysis of simple or neutral lipids, Analysis of fatty acids. Tomado de: www.cyberlipid.org/cyberlipid/anl0010htm. (18/10/05).
- Davis, Lide. 2006. Handbook of chemistry and physics,. New York : CRC Press. p. A-92.
- Dionex Corporation. 1999. Determination of total fat in powdered infant formula using accelerated solvent extraction (ASE). Application Note 329.
- _____. 2000. Determination of fat in dried milk products using accelerated solvent extraction (ASE). Application Note 340.
- Dionisi, F., Hug, B., Aeschlimann, J. M. and Houllamar, A. 1999. Supercritical CO₂ extraction for total fat analysis of food products. *J. food Sci.* 64: 1-6.
- Dunn, E. R. 1936. Notes on American Mabuyas. Proceedings of the Academy of Natural Sciences. En: Miralles A. 2005. The identity of *Lacertus mabouya* Lacépède, 1788, with description of a neotype: an approach toward the taxonomy of New World *Mabuya*. *Herpetologica* 61: 46-53
- Dutta-Roy A. K. 2000. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 315– 322.

- Evershed, R. 1992. Gas chromatography of lipids in lipid analysis "A practical approach". New York : Oxford University Press. p. 113-150.
- Firestone, D. and Sheppard, A. 1992. Determination of *trans* fatty acids. In advances in lipid methodology-two. Dundee : Oily Press. p. 273-322.
- Folch, J., Lees, M., and Stanley, H. S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226: 497-507.
- Gaal, T., Mezes, M., Noble, R. C., Dixon, J. and Speake, B. K. 1995. Development of antioxidant capacity in the chick embryos. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B: 711-716.
- García, L.E., Velasco, J. and Dobarganes, M. C. 2002. Double use of focused microwaves irradiation for accelerated matrix hydrolysis and lipid extraction in milk samples. *Int. Dairy J.* 9: 667-674.
- Gliszczynska, A. and Sikorska, E. 2004. Simple reversed – phase liquid chromatography method for determination of tocopheroles in edible plant oils. *J. Chromatogr. A* 1048:195-198.
- Gómez, D. and Ramírez-Pinilla, M. P. 2004. Ovarian histology of the placentotrophic *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *J. Morph.* 259: 90-105.
- Greer A. and B. Roadley D. 2000. Six characters of systematic importance in the scincid lizard genus *Mabuya*. *Hamadryad* 25 (1): 1-12.
- Gunstone, F. 1993. High resolution ¹³C NMR spectroscopy of lipids in advances in lipid methodology-two. Dundee: Oil press. p. 1-68.
- Gunstone, F., Harwood, J. and Dijkstra, A. 2007. The lipid handbook. CRC Press. p. 1-16.
- Hamilton, R.J. and Hamilton, S. (1992). Lipid Analysis, A Practical Approach. Oxford : University Press. p. 1-4, 263-267.
- Harynuk, J., Wynne, P.M., Marriott, P.J. (2006). Evaluation of new stationary phases for the separation of fatty acid methyl esters. *Chromatogr.* 13: 61-66.
- Innis S.M. 1991. Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* 30, 39– 103.
- Ionov I., Surai, P. and Sakhatsky N. 1994. Vitamins A and E content in avian egg yolk. *J. Ornithol.* 135:102.

- ISO 5508:1990 (E). 1990. Animal and vegetable fats and oil- analysys by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. p. 1-7.
- ISO 5509:2000 (E). 2000. Animal and vegetable fats and oil- Preparation of methyl esters of fatty acids. p.1-6.
- James, A.T. and Martin, A.T.J. (1952). Gas-liquid partition chromatography: The separation and microestimation of volatile fatty acids, *Biochem. J.* 50: 679-690.
- Jerez, A. and Ramírez-Pinilla, M. P. 2001. The allantoaplacenta of *Mabuya mabouya*. (Sauria, Scincidae). *J Morphol.* 249:132–146.
- _____. 2003. Morphogenesis of extraembryonic membranes and placentation of *Mabuya mabouya*. *J. Morphol.* 258:158–178.
- Jones S. M.; Swain, R. 2006. Placental transfer of 3H-oleic acid in three species of viviparous lizard: a route for supplementation of embryonic fat bodies?. *Herpetol. Monog.* 20: 186- 193.
- Labconco Corporation. 2006. Extractor de Goldfisch. Tomado de: www.labconco.com/product_lit. (17/11/06).
- Liu, K.S. 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-Chromatographic analysis of lipids in biological material. *JAOCS.* 71: 1179-87.
- Liu, Y., *et al.* 2002. Soli-phase microextraction and on-line methylation gas chromatography for aliphatic carboxylic acids. *Anal. Bioanal. Chem.* 373: 64-69.
- Maldjian A., Farkas K., Noble R.C., Cocchi M. and Speake B. K. 1995. The transfer of docosahexaenoic acid from the yolk to the tissues of the chick embryo. *Biochim. Biophys. Acta* 1258: 81-89.
- Manirakiza, P., Covaci, A. and Schepens, P. 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh and Dyer, and Modified Bligh and Dyer extraction methods. *J. Food Eng.* 14: 93-100.
- Mausfeld P. *et al.* 2002. Phylogenetic affinities of *Mabuya atlantica* Schmidt, 1945, endemic to the Atlantic Ocean Archipelago of Fernando de Noronha (Brazil): necessity of partitioning the genus *Mabuya Fitzinger*, 1826 (Scincidae: Lygosominae). *Zoologischer Anzeiger* 241: 281-293.
- McLafferty, F.W. and Turecek, F. 1993. Interpretation of Mass Spectra. California: University Science Books, p. 374

- Miralles A. 2005. The identity of *Lacertus mabouya* Lacépède, 1788, with description of a neotype: an approach toward the taxonomy of New World *Mabuya*. *Herpetologica*. 61: 46-53.
- Mondello L.; Quinto, P.; Dugo, P. and Dugo, G. 2006. Rapid, micro-scale preparation and very fast gas chromatographic separation of cod liver oil fatty acid methyl esters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1566–1570.
- Morris – Kay y Sokolova, 1996 Embryonic development and pattern formation. En: Speake, B. K., Surai, P.F. and Gore M. 2001. Lipid Composition, Fatty Acid Profiles, and Lipid-Soluble Antioxidants of Eggs of the Hermann's Tortoise (*Testudo hermanni boettgeri*). *Zoo Biology*. 20:75–87.
- Murray, Robert, Mayes, Meter, Granner, Daryl y Rodwell, Victor. 2001. Bioquímica de Harper. 15 Ed. México : Manual moderno,. p.p. 169-182.
- Naber E. C. and Squires M. W. 1993. Vitamin profiles of eggs as indicators of nutritional status in laying hen: diet to egg transfer and commercial flock survey. *Poultry Sci.* 72: 1046-1053.
- Noble R.C, Deeming D.C, Ferguson M.J. and McCartney R.J. 1990. Changes in the lipid and fatty acid composition of the yolk during embryonic development of the alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Comp Biochem Physiol.* 96:183–187.
- Noble R.C, Deeming D.C, Ferguson M.J. and McCartney R.J. 1991. The utilization of yolk phosphoglycerides by the alligator during embryonic development. *J. Comp Physiol B.* 161:383–6.
- Ramírez-Pinilla, M. P., Serrano, V. H., Galeano, J. C. 2002. Annual reproductive activity of *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *J. Herpetol* 36: 667-677.
- Ramírez -Pinilla, M. P. 2006. Placental transfer of nutrients during gestation in an andean population of the highly matrotrophic lizard genus *Mabuya* (Squamata:Scincidae). *Herpetol. Monog.* 20: 194- 204.
- Ramírez-Pinilla, M. P.; Perez, G. and Carreño-Escobar, J. F. 2006. Allantoplacental ultrastructure of an Andean population of *Mabuya* (Squamata, Scincidae). *J. Morphol.* 267:1227- 1247.
- Perretti, G.; Montanari, L. and Fantozzi, P. 2006. Lipid extraction from *Olea europea* L. by supercritical carbon dioxide for analytical use. *J. Food Eng.* 6: 50-62.

- Rueda, E., Delgado, J., Martínez, J. and Stashenko, E. 2003. Fatty acids profiles of *Atta laevigata* (big-bottom ant), a food product consumed in Santander, Colombia. Poster presentado en el Tercer Simposio Internacional en Biociencias, realizado en Moscú del 13-18 mayo, 2003.
- Rueda Parra, Elkin Darío. Extracción y análisis de ácidos grasos presentes en la hormiga "Culona" (*Atta laevigata*). 2004. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química.
- Shen, J. M., De Li, R. and Gao, F. Y. 2005. Effects of ambient temperature on lipid and fatty acid composition in the oviparous lizards, *Phrynocephalus przewalskii*. *Comp Biochem Physiol. B* 142: 293 - 301.
- Soyeurt, H.; Dardenne, P. Dehareng, F. and Lognay, G. 2006. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.* 89 (9): 3690-3695.
- Speake, B.K., Cerolini, S., Maldjian, A. and Noble, R.C. 1997. The preferential mobilisation of C₂₀ and C₂₂ polyunsaturated fatty acids from the adipose tissue of the chick embryo: potential implications regarding the provision of essential fatty acids for neural development. *Biochim. Biophys. Acta.* 317-326.
- Speake, B.K., Murray, A.M.B., Noble, R.C. 1998a. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.* 37:1-32.
- Speake, B.K., Thompson, M.B. 1999. Comparative aspects of yolk lipid utilisation in birds and reptiles. *Poult. Avian Biol. Revs.* 10:181-211.
- Speake, B. K and Thompson M. B. 2000. Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A: 453- 467.
- Speake, B. K., Surai, P.F. and Gore M. 2001. Lipid Composition, Fatty Acid Profiles, and Lipid-Soluble Antioxidants of Eggs of the Hermann's Tortoise (*Testudo hermanni boettgeri*). *Zoo Biology.* 20:75-87.
- Speake, B. K., Deans, E. 2004. Biosynthesis of oleic, arachidonic and docosahexaenoic acids from their C₁₈ precursors in the yolk sac membrane of the avian embryo. *Comp Biochem Physiol. B* 138: 407 - 414.
- Speake, B. K., Herbert J. F, Thompson M. B. 2004. Evidence for placental transfer of lipids during gestation in the viviparous lizard, *Pseudemoia entrecasteauxii*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 139:213-220.

- _____. 2004. Comparison of the fatty- acid compositions of prey items and yolks of Australian insectivorous scincid lizards. *J. Comp. Physiol. B.* 174:293–397.
- Surai P.F. 1999. Vitamin E in avian reproduction. *Poult Avian Biol Rev.* 10:1–60.
- Surai P.F, Noble R.C, Speake B.K. 1999. Relationship between vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick. *Br. Poul.t Sci.* 40:406–10.
- Stewart, J.R., Castillo, R.E. 1984. Nutritional provision of the yolk of two species of viviparous reptiles. *Physiol. Zool.* 57:377–383.
- Stewart, J. R. and Thompson M. B. 2000. Evolution of placentation among squamate reptiles: recent research and future directions. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A:411- 431.
- Supelco Inc. 1997. Comparison of 37 component FAME standard on four capillary GC columns, Bulletin Number 907, 5.
- Swain, R., Jones, S.M. 1997. Maternal-fetal transfer of 3H-labelled leucine in the viviparous lizard *Niveoscincus metallicus* (Scincidae, Lygosominae). *J. Exp. Zool.* 77:139-145.
- Thompson M. B., Speake, B. K., Russell, K. J., McCartney, R. J. and Surai, P. F. 1998b. Changes in fatty acid profiles and in protein, ion and energy contents of eggs of the Murray short-necked tortoise, *Emydura macquarii* (Chelonia, Pleurodira) during development. *Comp. Biochem. Physiol.* 122 A:75-84.
- Thompson M. B., Stewart, J. R., Speake, B. K., Russell, K.J., McCartney, R. J., Surai, P.F. 1999a. Placental nutrition in a viviparous lizard with a complex placenta. *J. Zool.* 248:295-305.
- _____. 1999b. Placental nutrition in the viviparous lizard *Niveoscincus metallicus*: the influence of placental type. *J. Exp. Biol.* 202:2985-2992.
- _____. 1999c. Placental transfer of nutrients during gestation in the viviparous lizard, *Pseudemoia spenceri*. *J. Comp. Physiol.* 169B:319-328.
- _____. 1999d. Changes in fatty acid profiles and in protein, ion and energy contents of eggs of the Murray short-necked turtle, *Emydura macquarii* (Chelonia, Pleurodira) during development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 122:75–84.

Thompson M. B., Stewart, J. R., Speake, B. K. 2000. Comparison of nutrient transport across the placenta of lizards differing in placental complexity. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A:469-479.

Thompson M. B., Stewart, J. R., Speake, B. K., Russell, K.J., McCartney, R. J. 2001. Utilization of nutrients by embryos of the enigmatic Australian viviparous skink, *Niveoscincus coventryi*. *J. Exp. Zool.* 290: 291-298.

_____. 2001a. Nutrient up take by embryos of the Australian viviparous lizard *Eulamprus tympanum*. *Physiol. Biochem. Zool.* 74:560–567.

_____. 2001b. Placental nutrition in the Tasmanian skink, *Niveoscincus ocellatus*. *J. Comp. Physiol. B* 171:155- 160.

Thompson M. B. and Speake B. K. 2003. Energy and utilization by embryonic reptiles. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A: 529- 538.

Thompson M. B., Adams S. M., Herbert J. F., Biazik J. M. and Murphy C. R. 2004. Placental function in lizards. *International Congress Series* 1275: 218–225.

Thompson M. B. and Speake B. K. 2004. Egg morphology and composition. In: Deeming D.C. Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour. Nottingham University Press, Nottingham, p.p. 45- 74.

Thompson M. B. and Speake B. K. 2006. A review of the evolution of viviparity in lizards: structure, function and physiology of the placenta. *J. Comp. Physiol. B* 176: 170-189.

Torres, A., Trugo, N. and Trugo, L. C. 2002. Mathematical method for the prediction of retention times of fatty acid methyl esters in temperature programmed capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4156- 4163.

Thurnhofer, S. and Vetter, W. 2006. Application of ethyl esters and d3-methyl esters as internal standards for the gas chromatographic quantification of transesterified fatty acid methyl esters in food. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3209-3214.

Vázquez, L.; Torres, C.; Fornari, T. and Señoráns, F. 2006. Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates. *Europ. J. Lipid Sci. Technol.* 108 (8): 659- 665.

Vieira, s., de Perez G. and Ramírez-Pinilla M. P. 2007. Invasive cells in the placentome of Andean populations of *Mabuya*: an endotheliochorial contribution to the placenta?. *The Anatomical Record* 290:1508–1518.

Vitt, L. J. and D. G. Blackburn. 1991. Ecology and life history of the viviparous lizard *Mabuya bistrriata* (Scincidae) in the Brazilian Amazonia. *Copeia*. 4 :916-927.

Wada, S. 2001. Rapid analysis of PUFAS by NMR and LC-MS in Chemical abstract No 136:246562. *Lipid Technology*. 13: 116-119.

Wang, Y., Sunwoo, H., Cherian, G. and Sim, J. S. 2000. Fatty Acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. *Poultry Sci*. 79: 1168-1171.

Zar, H. H. 1996. Biostatistical Analysis. 3rd. ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

ANEXO 1

Transferencia placentar de nutrientes durante la gestación en una población de *Mabuya* sp.

Martha Patricia Ramírez- Pinilla¹, Elena Stashenko², Elkin Darío Rueda-Parra²

¹ Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, Grupo de Estudios en Biodiversidad, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. e-mail: mpramir@uis.edu.co.

² Laboratorio de Cromatografía, Centro de Investigación en Biomoléculas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. e-mail: elena@tucan.uis.edu.co

Resumen

Las especies de scíncidos americanos del género *Mabuya* son vivíparas, producen huevos microlecitos (1-2 mm de diámetro) en los que se ha eliminado casi completamente la vitelogénesis, y tienen la morfología placentaria más compleja conocida en Reptilia. Dadas estas características, se ha sugerido que todos los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario son obtenidos por medio de la placenta. Para probar esta inferencia cuantificamos el intercambio de nutrientes durante la gestación en una población santandereana de *Mabuya* sp. y los resultados los comparamos con otras especies de scíncidos y mamíferos placentotróficos. Se estudiaron huevos recientemente ovulados, embriones en diferentes estados de desarrollo y neonatos usando diferentes técnicas cromatográficas. Encontramos que hay un paso neto de agua, iones (calcio, potasio, sodio, hierro y magnesio), proteínas, lípidos (en sus diferentes fracciones) y materia seca durante la gestación. La transferencia placentotrófica de nutrientes sucede desde los estados más tempranos de desarrollo; sin embargo, se incrementó significativa y dramáticamente durante los últimos estados (fase de crecimiento fetal). La reducción en la contribución ovárica de nutrientes lecitotróficos al embrión se relaciona con una reducción recíproca del tamaño del huevo y un incremento en complejidad morfofuncional placentaria. Este patrón es diferente y mayor que el de cualquier otro reptil placentotrófico y converge con el de mamíferos eutherios.

ANEXO 2

Parámetros analíticos de GC-FID

CG Modelo: Agilent Technologies 6890N (Palo Alto, California, EE.UU)

Detector: FID Temperatura: 280 °C

Horno Temperatura inicial: 130 °C tiempo inicial: 1 min

a 6.5 °C/min hasta 170 °C durante 0 min

a 2.8 °C/min hasta 215 °C durante 20 min

a 40 °C/min hasta 230 °C durante 3 min

Columna Longitud (m) 60 d.i (mm): 0.25

Fase: DB-23 [50%-cianopropil-poli(metilsiloxano)] Espesor(μm): 0.25

Velocidad del gas de arrastre: 1.0 mL/min (100 °C)

Presión de entrada de columna: 26.10 psi

2. **Inyector** Manual: ---- Automático: HP-7683

Split: 50 mL/min Splitless: --- Relación split: 51:1

Temperatura (°C): 250

Volumen de inyección (μL): 1.0

Gases Carrier: Helio (99.995%) Nitrógeno (mL/min): 25

Aire (mL/min): 360 Mezcla Ar/CH₄ (mL/min): ---

Hidrógeno (mL/min): 30

ANEXO 3

Parámetros analíticos de GC-MS

GC-MS Modelo: HP 5890A Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU) acoplado a un detector selectivo de masas (HP 5972)

Horno Temperatura inicial: 200°C tiempo inicial: 5 min
a 10 °C/min hasta 270 °C durante 20 min

Columna Longitud (m) 30 d.i (mm): 0.25
Fase: 5%fenil-poli(dimetilsiloxano) Espesor(μm): 0.25
Velocidad del gas de arrastre: 1 mL/min (70 °C)
Presión de entrada de columna: 200 kPa

3. **Inyector** Manual: ---- Automático: HP6890
Split: X *Splitless*: ---- Relación *split*: 31:1
Temperatura (° C): 250

Gases *Carrier*: Helio (99.995%)

Analizador Emisión (mA): 35.0 Ion Focus (V): 90
Repeller (V): 25.03 *Lens* (V): 28.61
Energía de e⁻ (eV): 70 Multiplicador (V): 1835
Vel. de barrido (*scan*/seg): 2.43 Filamento *off* (min): 5
Rango de masas (u.m.a.s): 40-350

Fte Iones Temperatura (°C): 175 Presión (torr): 5.6 x 10⁻⁵ (N₂)
Línea de transferencia (°C): 285

Modo *Full scan*: --- SIM: X

ANEXO 4

Parámetros analíticos de RP-HPLC-DAD/FLD

LC-DAD/FLD Modelo: *Agilent 1100 Series* (Palo Alto, California, EE.UU.)

Detectores: DAD Longitud de onda (λ) 325 nm
FLD (λ) Excitación 290 nm (λ) Emisión 330 nm

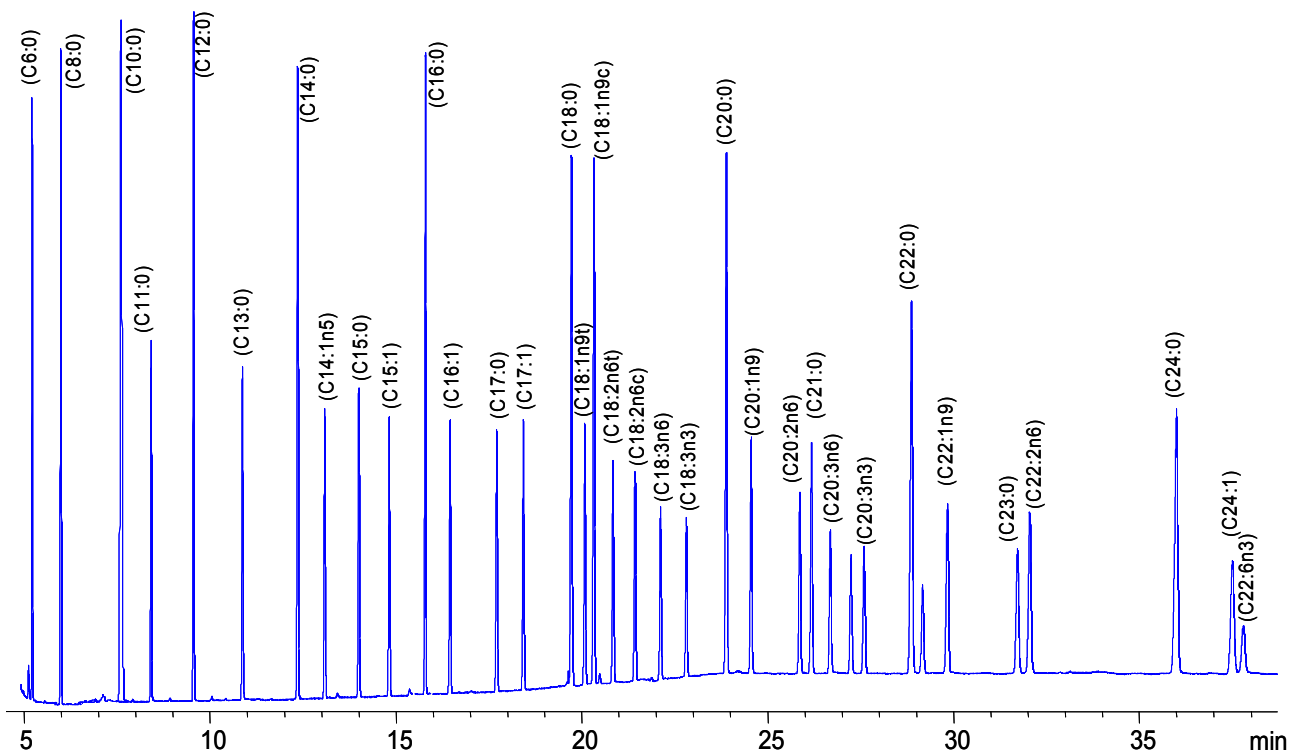
Columna Longitud (cm) 15 d.i (mm): 4.6
Fase: ZORBAX Eclipse XDB (C18) Tamaño partícula (μm): 5
Velocidad del flujo: 1.2 mL/min
Presión en la columna: 79 bar Temperatura ($^{\circ}\text{C}$): 25

4. Inyector Manual: ---- Automático: X
Volumen de inyección (μL) 10

Fase móvil: Metanol (Grado HPLC) **Flujo:** Isocrático

ANEXO 5

Cromatograma obtenido por GC-FID de la mezcla de referencia certificada de FAME y las curvas de calibración.



Curva de calibración FAME's

Calib. Data Modified : 20/02/2008 06:32:25 a.m.

Calculate : Area Percent

Rel. Reference Window : 0.500 %

Abs. Reference Window : 0.100 min

Rel. Non-ref. Window : 0.500 %

Abs. Non-ref. Window : 0.100 min

Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Uncalibrated Peaks : not reported

Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated

Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear

Origin : Forced

Weight : Equal

Recalibration Settings:

Average Response : Average all calibrations

Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :

Printout of recalibrations within a sequence:

Calibration Table before Recalibration

Calibration Table after Recalibration

Normal Report after Recalibration

If the sequence is done with bracketing:

Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: FID2 B,

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ppm]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
5.158	1	10.00000	5.11400	1.95542	Caprónico (C6:0)
		20.00000	10.06900	1.98629	
		40.00000	23.59800	1.69506	
		100.00000	55.19100	1.81189	
		200.00000	125.87000	1.58894	
		300.00000	196.60000	1.52594	
5.962	1	10.00000	6.23200	1.60462	Caprílico (C8:0)
		20.00000	11.85600	1.68691	
		40.00000	27.92800	1.43225	
		100.00000	64.88200	1.54126	
		200.00000	147.00000	1.36054	
		300.00000	239.99000	1.25005	
7.372	1	10.00000	6.93700	1.44155	Cáprico (C10:0)
		20.00000	13.04300	1.53339	
		40.00000	31.07700	1.28713	
		100.00000	71.13800	1.40572	
		200.00000	160.63000	1.24510	
		300.00000	268.86000	1.11582	
8.332	1	5.00000	3.70400	1.34989	Undecanoico (C11:0)
		10.00000	6.91900	1.44530	
		20.00000	16.60200	1.20467	
		50.00000	38.02400	1.31496	
		100.00000	85.91900	1.16389	
		150.00000	144.80000	1.03591	
9.467	1	10.00000	7.36900	1.35704	Láurico (C12:0)
		20.00000	13.81300	1.44791	
		40.00000	32.91200	1.21536	
		100.00000	74.74200	1.33794	
		200.00000	167.73000	1.19239	
		300.00000	282.95000	1.06026	
10.766	1	5.00000	3.98400	1.25502	Tridecanoico (C13:0)
		10.00000	7.46900	1.33887	
		20.00000	17.70200	1.12982	
		50.00000	40.19800	1.24384	
		100.00000	89.94900	1.11174	
		150.00000	152.17000	9.85740e-1	

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ppm]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
12.241	1	10.00000	8.13800	1.22880	Mirístico (C14:0)
	2	20.00000	15.28800	1.30822	
	3	40.00000	36.08500	1.10849	
	4	100.00000	81.76000	1.22309	
	5	200.00000	182.46000	1.09613	
	6	300.00000	308.58000	9.72195e-1	
12.961	1	5.00000	3.81500	1.31062	Miristoleico (C14:1n5)
	2	10.00000	7.21500	1.38600	
	3	20.00000	17.02500	1.17474	
	4	50.00000	38.73800	1.29072	
	5	100.00000	86.41600	1.15719	
	6	150.00000	146.10000	1.02669	
13.869	1	5.00000	4.21100	1.18737	Pentadecanoico (C15:0)
	2	10.00000	7.94300	1.25897	
	3	20.00000	18.74500	1.06695	
	4	50.00000	42.56900	1.17456	
	5	100.00000	94.52400	1.05793	
	6	150.00000	159.80000	9.38673e-1	
14.680	1	5.00000	4.03100	1.24039	cis-10-Pentadecenoico (C15:1)
	2	10.00000	7.56300	1.32223	
	3	20.00000	17.87300	1.11901	
	4	50.00000	40.63100	1.23059	
	5	100.00000	90.62600	1.10344	
	6	150.00000	153.01000	9.80328e-1	
15.660	1	15.00000	12.65500	1.18530	Palmítico (C16:0)
	2	30.00000	23.73800	1.26380	
	3	60.00000	55.79600	1.07535	
	4	150.00000	126.64000	1.18446	
	5	300.00000	281.69000	1.06500	
	6	450.00000	477.07000	9.43258e-1	
16.310	1	5.00000	4.07200	1.22790	Palmitoleico (C16:1)
	2	10.00000	7.72900	1.29383	
	3	20.00000	18.25200	1.09577	
	4	50.00000	41.55400	1.20325	
	5	100.00000	92.57100	1.08025	
	6	150.00000	156.44000	9.58834e-1	
17.551	1	5.00000	4.00300	1.24906	Heptadecanoico (C17:0)
	2	10.00000	7.66100	1.30531	
	3	20.00000	18.08500	1.10589	
	4	50.00000	41.07200	1.21737	
	5	100.00000	91.40800	1.09400	
	6	150.00000	154.77000	9.69180e-1	
18.265	1	5.00000	4.12900	1.21095	cis-10-Heptadecenoico (C17:1)
	2	10.00000	7.92100	1.26247	
	3	20.00000	18.60800	1.07481	
	4	50.00000	42.29300	1.18223	
	5	100.00000	93.87600	1.06523	
	6	150.00000	158.78000	9.44703e-1	
19.559	1	10.00000	8.66700	1.15380	Esteárico (C18:0)
	2	20.00000	16.24600	1.23107	
	3	40.00000	38.01300	1.05227	
	4	100.00000	86.29000	1.15888	
	5	200.00000	191.53000	1.04422	
	6	300.00000	324.62000	9.24157e-1	
19.912	1	10.00000	7.88200	1.26871	Elaídico (C18:1n9t)
	2	20.00000	18.74200	1.06712	
	3	40.00000	42.88300	9.32771e-1	
	4	100.00000	95.46500	1.04750	
	5	150.00000	161.68000	9.27759e-1	

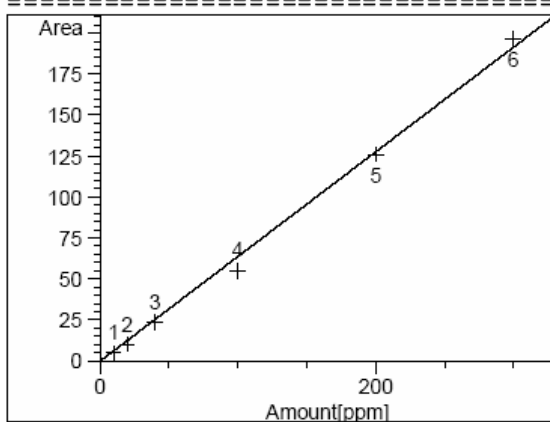
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ppm]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
20.158	1 1	10.00000	8.60000	1.16279	Oleico (C18:1n9c)
	2	20.00000	15.90900	1.25715	
	3	40.00000	37.04200	1.07986	
	4	100.00000	83.98900	1.19063	
	5	200.00000	186.53000	1.07221	
	6	300.00000	315.50000	9.50872e-1	
20.664	1 1	10.00000	7.04400	1.41965	Linolelaidico (C18:2n6t)
	2	20.00000	16.64000	1.20192	
	3	50.00000	37.90700	1.31902	
	4	100.00000	83.96300	1.19100	
	5	150.00000	141.87000	1.05731	
21.255	1 1	10.00000	7.28000	1.37363	Linoleico (C18:2n6c)
	2	20.00000	17.10100	1.16952	
	3	50.00000	38.88300	1.28591	
	4	100.00000	86.30300	1.15871	
	5	150.00000	145.85000	1.02845	
21.936	1 1	10.00000	6.12700	1.63212	g-Linolénico (C18:3n6)
	2	20.00000	14.49700	1.37960	
	3	50.00000	33.23400	1.50448	
	4	100.00000	73.66500	1.35750	
	5	150.00000	124.37000	1.20608	
22.633	1 1	10.00000	6.29000	1.58983	Linolénico (C18:3n3)
	2	20.00000	15.07900	1.32635	
	3	50.00000	34.42900	1.45226	
	4	100.00000	76.39800	1.30893	
	5	150.00000	129.13000	1.16162	
23.699	1 1	10.00000	8.72700	1.14587	Araquídico (C20:0)
	2	20.00000	16.40800	1.21892	
	3	40.00000	38.32900	1.04360	
	4	100.00000	87.58900	1.14170	
	5	200.00000	194.84000	1.02648	
	6	300.00000	330.32000	9.08210e-1	
24.353	1 1	10.00000	8.28700	1.20671	Eicosenoico (C20:1n9)
	2	20.00000	19.15300	1.04422	
	3	50.00000	43.73300	1.14330	
	4	100.00000	96.73900	1.03371	
	5	150.00000	163.59000	9.16926e-1	
25.636	1 1	10.00000	7.06400	1.41563	Eicosadienoico (C20:2n6)
	2	20.00000	17.06800	1.17178	
	3	50.00000	38.92000	1.28469	
	4	100.00000	86.41800	1.15717	
	5	150.00000	145.89000	1.02817	
25.949	1 1	10.00000	8.07200	1.23885	Heneicosanoico (C21:0)
	2	20.00000	19.36900	1.03258	
	3	50.00000	44.57600	1.12168	
	4	100.00000	99.25700	1.00749	
	5	150.00000	168.17000	8.91955e-1	
26.450	1 2	20.00000	15.39000	1.29955	Eicosatrienoico (C20:3n6)
	3	50.00000	35.09700	1.42462	
	4	100.00000	77.82100	1.28500	
	5	150.00000	131.44000	1.14121	
26.995	1 2	20.00000	14.08600	1.41985	
	3	50.00000	32.31100	1.54746	
	4	100.00000	71.60700	1.39651	
	5	150.00000	120.57000	1.24409	
27.335	1 2	20.00000	14.96200	1.33672	Eicosatrienoico (C20:3n3)
	3	50.00000	34.11400	1.46567	
	4	100.00000	75.31400	1.32777	
	5	150.00000	127.07000	1.18045	

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ppm]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
28.590	1	20.00000	16.21700	1.23327	Behénico (C22:0)
		40.00000	38.33800	1.04335	
		100.00000	87.69900	1.14026	
		200.00000	194.92000	1.02606	
		300.00000	330.52000	9.07661e-1	
		300.00000	330.52000	9.07661e-1	
28.887	1	20.00000	11.71000	1.70794	Eicosapentaenoico (C20:5n3)
		50.00000	27.58300	1.81271	
		100.00000	61.01900	1.63883	
		150.00000	102.32000	1.46599	
		150.00000	102.32000	1.46599	
29.540	1	20.00000	18.93200	1.05641	Erúcico (C22:1n9)
		50.00000	43.56900	1.14760	
		100.00000	96.98900	1.03104	
		150.00000	164.17000	9.13687e-1	
		150.00000	164.17000	9.13687e-1	
31.380	1	20.00000	18.80600	1.06349	Tricosanoico (C23:0)
		50.00000	44.26500	1.12956	
		100.00000	98.97100	1.01040	
		150.00000	168.14000	8.92114e-1	
		150.00000	168.14000	8.92114e-1	
31.700	1	20.00000	16.28000	1.22850	Docosadienoico (C22:2n6)
		50.00000	38.77000	1.28966	
		100.00000	86.33500	1.15828	
		150.00000	146.01000	1.02733	
		150.00000	146.01000	1.02733	
35.550	1	40.00000	37.20300	1.07518	Lignocerico (C24:0)
		100.00000	86.98600	1.14961	
		200.00000	195.03000	1.02548	
		300.00000	331.37000	9.05332e-1	
		300.00000	331.37000	9.05332e-1	
		300.00000	331.37000	9.05332e-1	
37.010	1	20.00000	18.80400	1.06360	Nervónico (C24:1)
		50.00000	38.75300	1.29022	
		100.00000	96.46000	1.03670	
		150.00000	164.29000	9.13020e-1	
		150.00000	164.29000	9.13020e-1	
37.318	1	20.00000	9.81300	2.03811	Docosahexaenoico (C22:6n3)
		50.00000	22.32400	2.23974	
		100.00000	49.15200	2.03451	
		150.00000	82.63800	1.81515	
		150.00000	82.63800	1.81515	

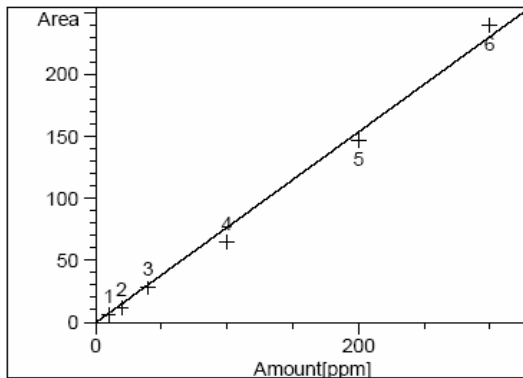
=====
Peak Sum Table
=====

No Entries in table
=====

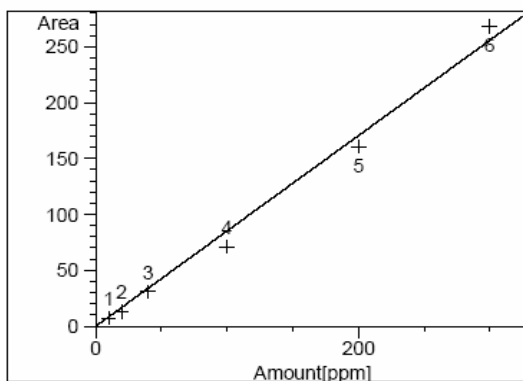
=====
Calibration Curves
=====



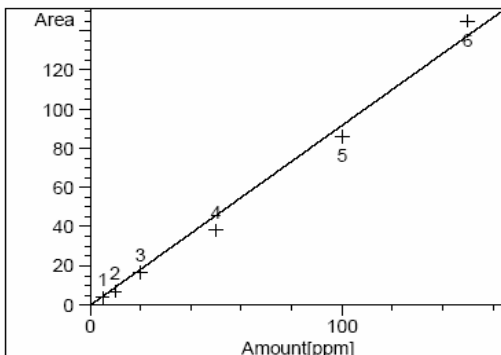
=====
Caprónico (C6:0) at exp. RT: 5.158
FID2 B,
Correlation: 0.99900
Residual Std. Dev.: 4.82445
Formula: $y = mx$
m: 6.39476e-1
x: Amount [ppm]
y: Area
=====



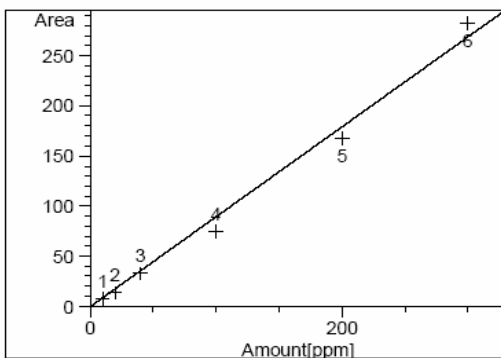
Caprílico (C8:0) at exp. RT: 5.962
 FID2 B,
 Correlation: 0.99822
 Residual Std. Dev.: 7.73997
 Formula: $y = mx$
 m: $7.69189e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



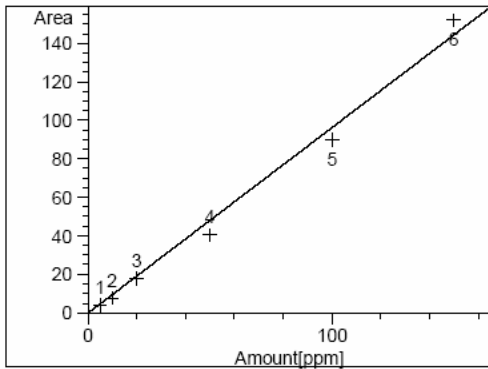
Cáprico (C10:0) at exp. RT: 7.372
 FID2 B,
 Correlation: 0.99762
 Residual Std. Dev.: 9.95373
 Formula: $y = mx$
 m: $8.54828e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



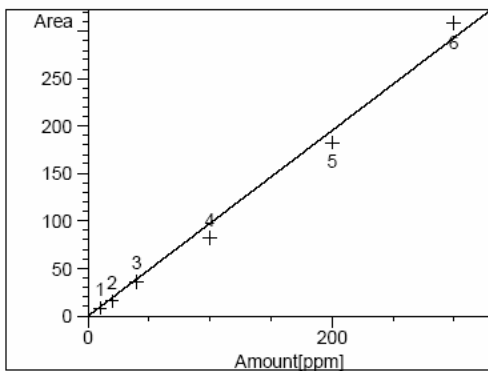
Undecanoico (C11:0) at exp. RT: 8.332
 FID2 B,
 Correlation: 0.99741
 Residual Std. Dev.: 5.58575
 Formula: $y = mx$
 m: $9.18588e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



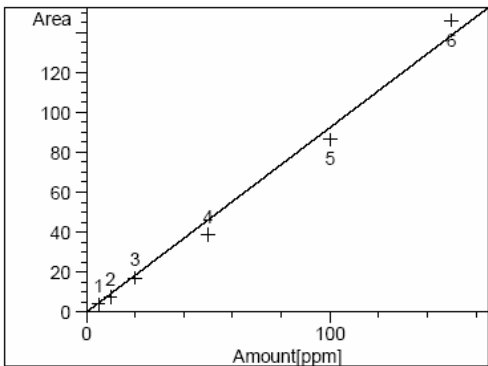
Láurico (C12:0) at exp. RT: 9.467
 FID2 B,
 Correlation: 0.99748
 Residual Std. Dev.: 10.77103
 Formula: $y = mx$
 m: $8.97760e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



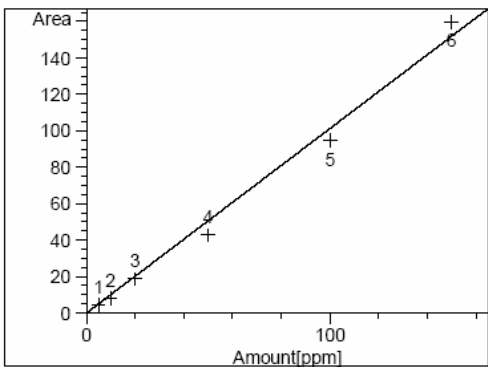
Tridecanoico (C13:0) at exp. RT: 10.766
 FID2 B,
 Correlation: 0.99743
 Residual Std. Dev.: 5.84507
 Formula: $y = mx$
 m: $9.64925e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



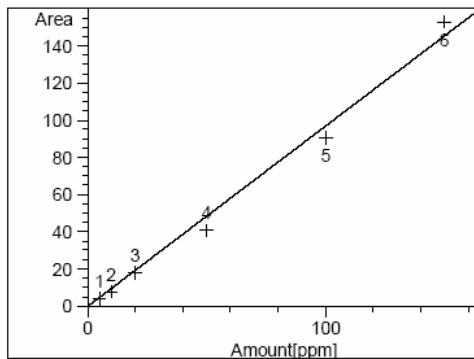
Mirístico (C14:0) at exp. RT: 12.241
 FID2 B,
 Correlation: 0.99747
 Residual Std. Dev.: 11.75128
 Formula: $y = mx$
 m: $9.78695e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



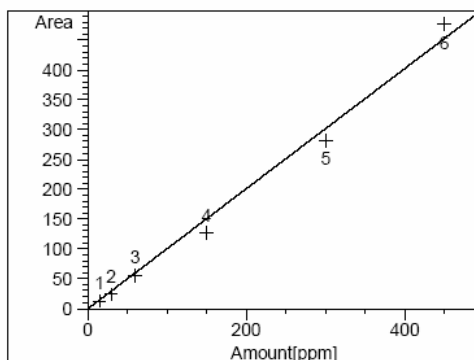
Miristoleico (C14:1n5) at exp. RT: 12.961
 FID2 B,
 Correlation: 0.99748
 Residual Std. Dev.: 5.55559
 Formula: $y = mx$
 m: $9.26818e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



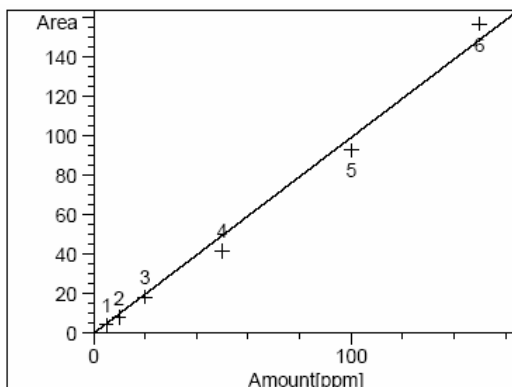
Pentadecanoico (C15:0) at exp. RT: 13.869
 FID2 B,
 Correlation: 0.99754
 Residual Std. Dev.: 6.01004
 Formula: $y = mx$
 m: 1.01411
 x: Amount [ppm]
 y: Area



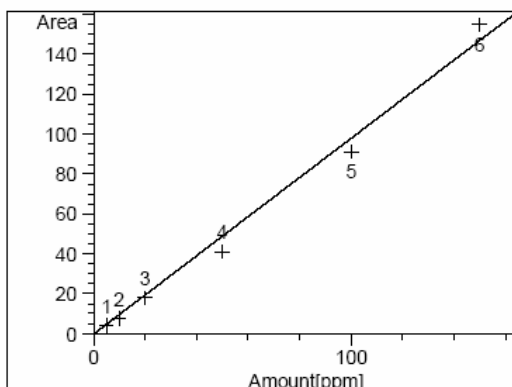
cis-10-Pentadecenoico (C15:1) at exp. RT: 14.680
 FID2 B,
 Correlation: 0.99752
 Residual Std. Dev.: 5.77017
 Formula: $y = mx$
 m: $9.71116e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



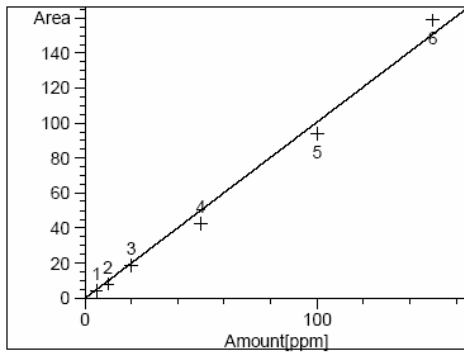
Palmítico (C16:0) at exp. RT: 15.660
 FID2 B,
 Correlation: 0.99747
 Residual Std. Dev.: 18.18328
 Formula: $y = mx$
 m: 1.00847
 x: Amount [ppm]
 y: Area



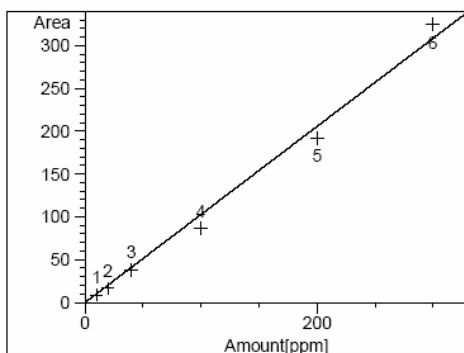
Palmitoleico (C16:1) at exp. RT: 16.310
 FID2 B,
 Correlation: 0.99751
 Residual Std. Dev.: 5.91857
 Formula: $y = mx$
 m: $9.92639e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



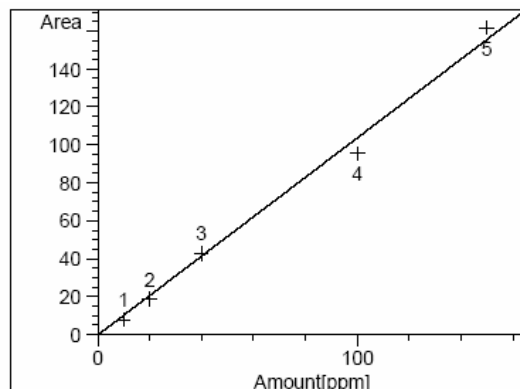
Heptadecanoico (C17:0) at exp. RT: 17.551
 FID2 B,
 Correlation: 0.99746
 Residual Std. Dev.: 5.90380
 Formula: $y = mx$
 m: $9.81512e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



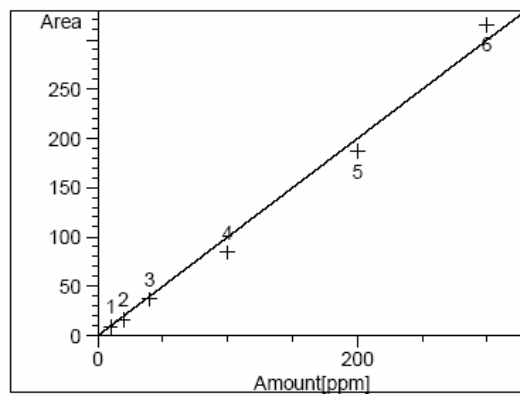
cis-10-Heptadecenoico (C17:1) at exp. RT: 18.265
 FID2 B,
 Correlation: 0.99753
 Residual Std. Dev.: 5.98352
 Formula: $y = mx$
 m: 1.00750
 x: Amount [ppm]
 y: Area



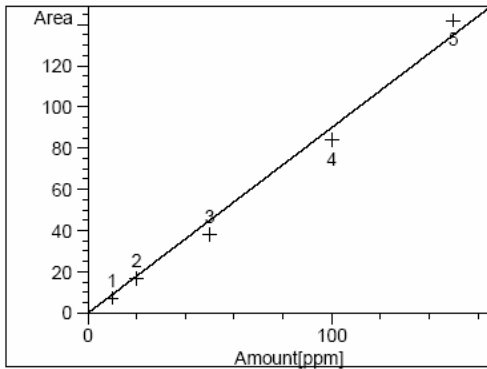
Esteárico (C18:0) at exp. RT: 19.559
 FID2 B,
 Correlation: 0.99747
 Residual Std. Dev.: 12.36354
 Formula: $y = mx$
 m: 1.02923
 x: Amount [ppm]
 y: Area



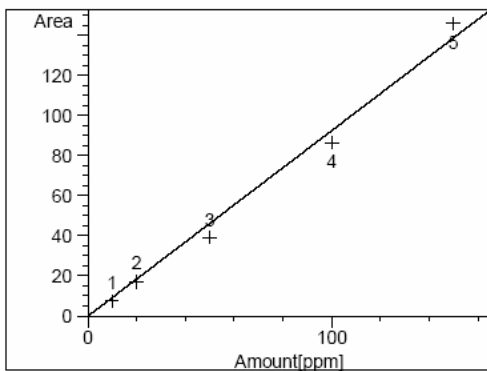
Elaídico (C18:1n9t) at exp. RT: 19.912
 FID2 B,
 Correlation: 0.99843
 Residual Std. Dev.: 5.41578
 Formula: $y = mx$
 m: 1.03952
 x: Amount [ppm]
 y: Area



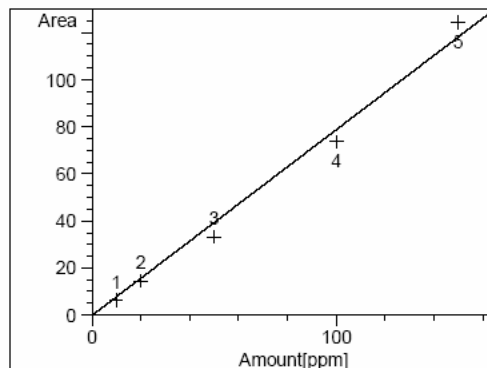
Oleico (C18:1n9c) at exp. RT: 20.158
 FID2 B,
 Correlation: 0.99753
 Residual Std. Dev.: 11.87729
 Formula: $y = mx$
 m: 1.00099
 x: Amount [ppm]
 y: Area



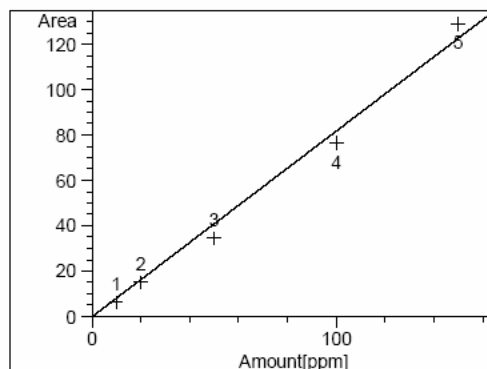
Linolelaidico (C18:2n6t) at exp. RT: 20.664
 FID2 B,
 Correlation: 0.99759
 Residual Std. Dev.: 5.90784
 Formula: $y = mx$
 m: $9.00715e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



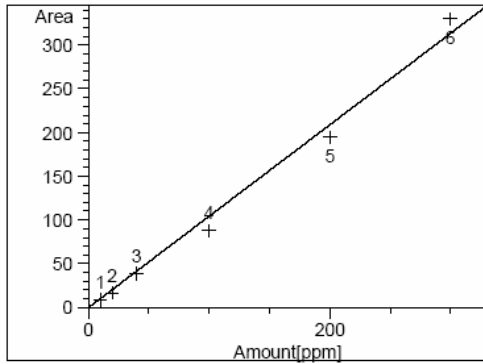
Linoleico (C18:2n6c) at exp. RT: 21.255
 FID2 B,
 Correlation: 0.99756
 Residual Std. Dev.: 6.10122
 Formula: $y = mx$
 m: $9.25825e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



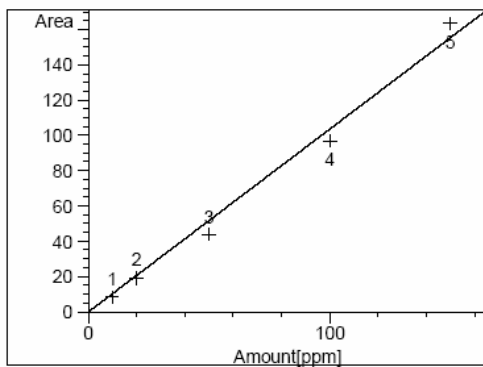
g-Linolénico (C18:3n6) at exp. RT: 21.936
 FID2 B,
 Correlation: 0.99759
 Residual Std. Dev.: 5.17253
 Formula: $y = mx$
 m: $7.89716e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



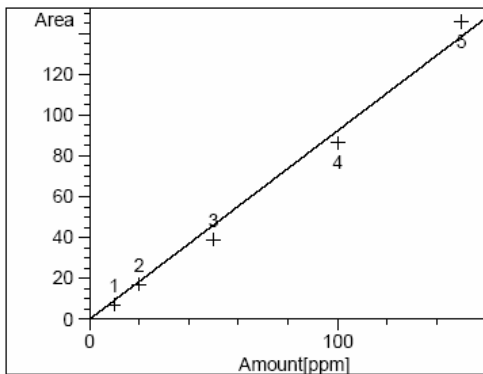
Linolénico (C18:3n3) at exp. RT: 22.633
 FID2 B,
 Correlation: 0.99754
 Residual Std. Dev.: 5.42043
 Formula: $y = mx$
 m: $8.19584e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



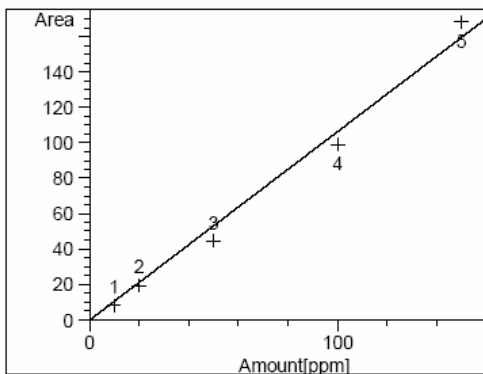
Araquídico (C20:0) at exp. RT: 23.699
 FID2 B,
 Correlation: 0.99743
 Residual Std. Dev.: 12.68112
 Formula: $y = mx$
 m: 1.04695
 x: Amount [ppm]
 y: Area



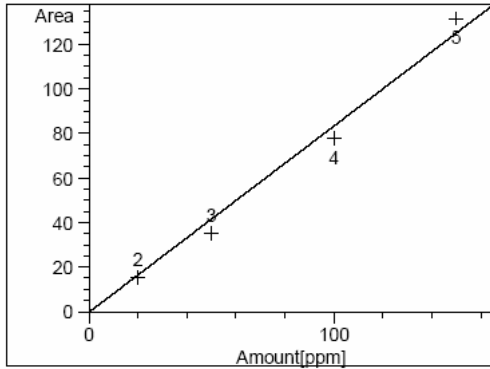
Eicosenoico (C20:1n9) at exp. RT: 24.353
 FID2 B,
 Correlation: 0.99758
 Residual Std. Dev.: 6.81479
 Formula: $y = mx$
 m: 1.03845
 x: Amount [ppm]
 y: Area



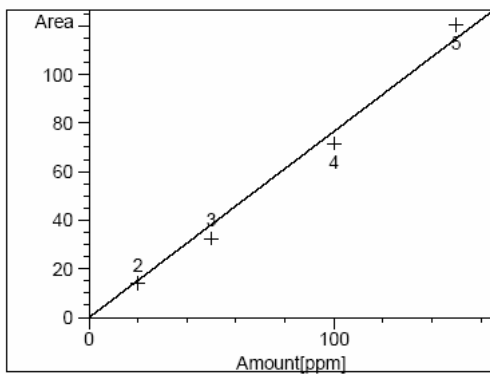
Eicosadienoico (C20:2n6) at exp. RT: 25.636
 FID2 B,
 Correlation: 0.99757
 Residual Std. Dev.: 6.09240
 Formula: $y = mx$
 m: 9.26290e-1
 x: Amount [ppm]
 y: Area



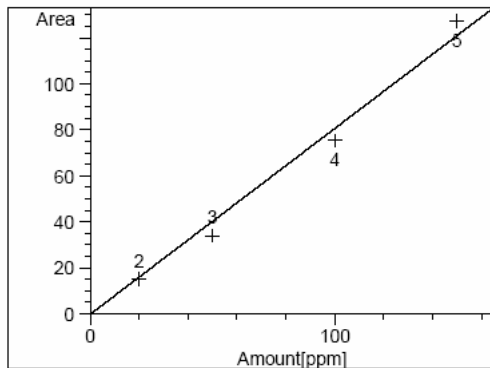
Heneicosanoico (C21:0) at exp. RT: 25.949
 FID2 B,
 Correlation: 0.99742
 Residual Std. Dev.: 7.22710
 Formula: $y = mx$
 m: 1.06614
 x: Amount [ppm]
 y: Area



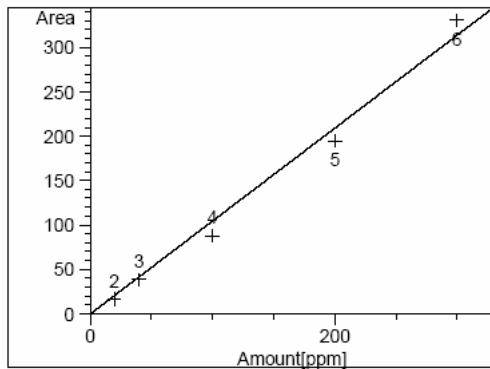
Eicosatrienoico (C20:3n6) at exp. RT: 26.450
 FID2 B,
 Correlation: 0.99765
 Residual Std. Dev.: 6.23286
 Formula: $y = mx$
 m: $8.35049e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



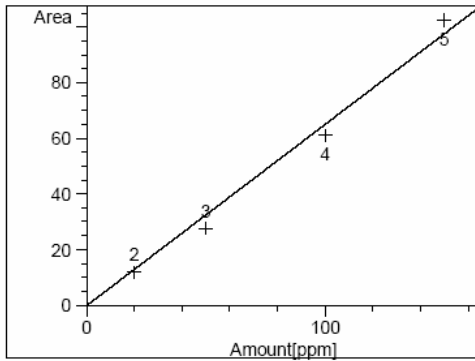
Araquidónico (C20:4n6) at exp. RT: 26.995
 FID2 B,
 Correlation: 0.99774
 Residual Std. Dev.: 5.61098
 Formula: $y = mx$
 m: $7.66765e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



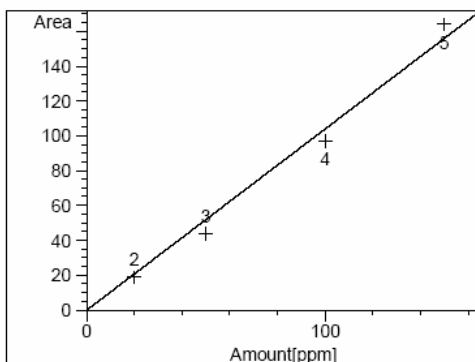
Eicosatrienoico (C20:3n3) at exp. RT: 27.335
 FID2 B,
 Correlation: 0.99772
 Residual Std. Dev.: 5.93018
 Formula: $y = mx$
 m: $8.07820e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



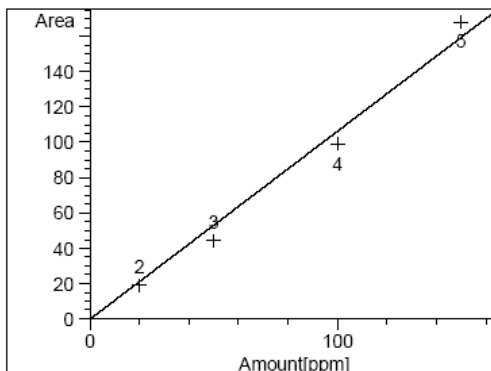
Behénico (C22:0) at exp. RT: 28.590
 FID2 B,
 Correlation: 0.99743
 Residual Std. Dev.: 14.16961
 Formula: $y = mx$
 m: 1.04766
 x: Amount [ppm]
 y: Area



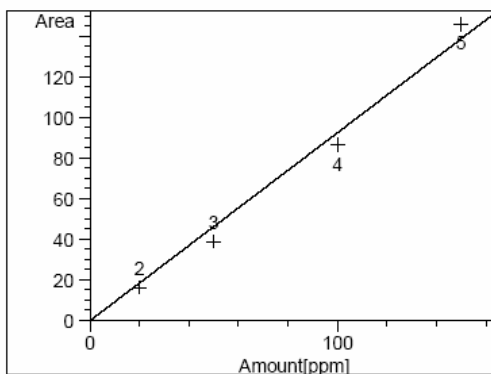
Eicosapentaenoico (C20:5n3) at exp. RT: 28.887
 FID2 B,
 Correlation: 0.99785
 Residual Std. Dev.: 4.64907
 Formula: $y = mx$
 m: $6.51504e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



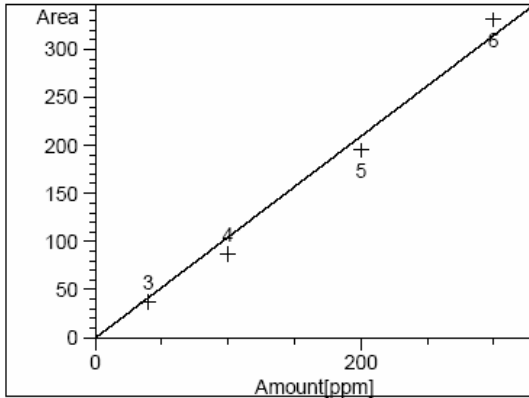
Erúxico (C22:1n9) at exp. RT: 29.540
 FID2 B,
 Correlation: 0.99753
 Residual Std. Dev.: 7.96561
 Formula: $y = mx$
 m: 1.04185
 x: Amount [ppm]
 y: Area



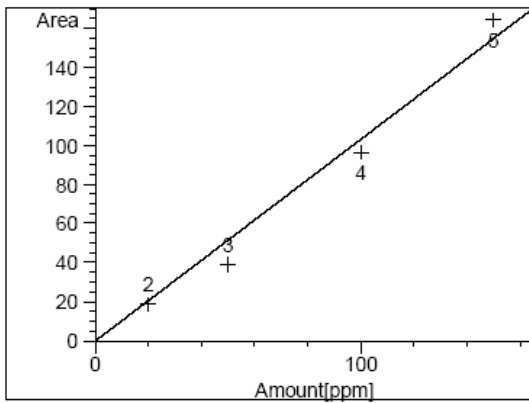
Tricosanoico (C23:0) at exp. RT: 31.380
 FID2 B,
 Correlation: 0.99735
 Residual Std. Dev.: 8.44644
 Formula: $y = mx$
 m: 1.06518
 x: Amount [ppm]
 y: Area



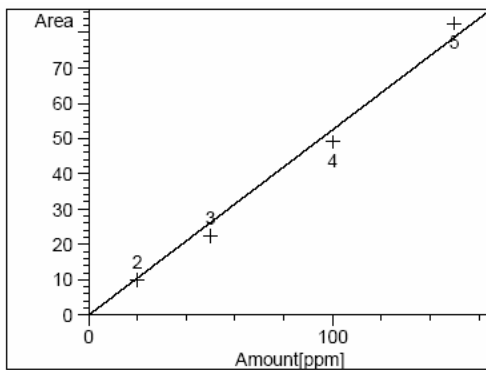
Docosadienoico (C22:2n6) at exp. RT: 31.700
 FID2 B,
 Correlation: 0.99752
 Residual Std. Dev.: 7.10659
 Formula: $y = mx$
 m: $9.26528e-1$
 x: Amount [ppm]
 y: Area



Lignocericic (C24:0) at exp. RT: 35.550
 FID2 B,
 Correlation: 0.99732
 Residual Std. Dev.: 16.72874
 Formula: $y = mx$
 m: 1.04946
 x: Amount [ppm]
 y: Area



Nervónico (C24:1) at exp. RT: 37.010
 FID2 B,
 Correlation: 0.99601
 Residual Std. Dev.: 10.06254
 Formula: $y = mx$
 m: 1.03399
 x: Amount [ppm]
 y: Area



Docosahexaenoico (C22:6n3) at exp. RT: 37.318
 FID2 B,
 Correlation: 0.99785
 Residual Std. Dev.: 3.74920
 Formula: $y = mx$
 m: 5.26084e-1
 x: Amount [ppm]
 y: Area

=====

Anexo 6

Cantidad relativa promedio (%) de FA en las fracciones lipídicas mayoritarias presentes en la grasa extraída de huevo de tortuga.

Éster metílico del ácido:	FA		PL		TAG + CE	
	Promedio ± desv	%CV	Promedio ± desv	%CV	Promedio ± desv	%CV
Láurico (C12:0)	1,7 ± 0,1	7	0,5 ± 0,05	10	0,4 ± 0,01	2
Mirístico (C14:0)	4,8 ± 0,3	6	1,3 ± 0,1	9	6,18 ± 0,07	1
Miristoleico (C14:1n5)	-	-	-	-	0,6 ± 0,01	2
Pentadecanoico (C15:0)	0,6 ± 0,01	2	0,26 ± 0,01	2	0,62 ± 0,00	1
Palmítico (C16:0)	31,9 ± 0,4	1	20,8 ± 0,6	3	27,96 ± 0,04	0
Palmitoleico (C16:1)	6,4 ± 0,5	7	4,28 ± 0,04	1	21,32 ± 0,09	0
Heptadecanoico (C17:0)	0,91 ± 0,08	9	0,49 ± 0,01	2	0,37 ± 0,01	2
Estéarico (C18:0)	30 ± 1	4	16,6 ± 0,3	2	7,6 ± 0,1	2
Oleico (C18:1n9c)	13,4 ± 0,7	5	36,8 ± 0,8	2	31,9 ± 0,1	0
Linoleico (C18:2n6c)	2,00 ± 0,09	5	2,9 ± 0,2	6	0,01 ± 0,00	1
Linolénico (C18:3n3)	-	-	0,25 ± 0,02	9	0,09 ± 0,00	3
Araquídico (C20:0)	4,6 ± 0,3	6	1,28 ± 0,04	3	0,25 ± 0,02	9
Eicosenoico (C20:1n9)	-	-	0,68 ± 0,03	5	0,60 ± 0,01	1
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	-	0,91 ± 0,04	5	0,08 ± 0,00	4
Araquidónico (C20:4n6)	-	-	7,4 ± 0,3	4	0,86 ± 0,01	1
Behénico (C22:0)	3,47 ± 0,06	2	0,79 ± 0,01	1	0,13 ± 0,01	4
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	-	-	0,73 ± 0,03	5	0,05 ± 0,00	7
Docosaheptaenoico (C22:6n3)	-	-	3,95 ± 0,08	2	0,21 ± 0,00	1

* n = 3

ANEXO 7

Tabla A. Cantidad absoluta promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de FA en las fracciones de TAG para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD ABSOLUTA PROMEDIO ($\mu\text{g}/\text{mg}$) DE FA EN LA FRACCIÓN DE TAG PARA LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	0,3	-	0,3	0,9	2,3	5,0
Mirístico (C14:0)	0,4	1,2	0,7	8,1	33	56
Miristoleico (C14:1n5)	-	-	0,1	0,7	4,9	10,1
Pentadecanoico (C15:0)	-	0,6	0,4	6,1	20,1	27,1
Palmítico (C16:0)	5,9	11,5	5,4	146	700	1676
Palmitoleico (C16:1)	-	0,4	0,7	44	297	782
Heptadecanoico (C17:0)	0,1	0,8	0,4	4,1	15,3	27
Esteárico (C18:0)	5,9	11	4,3	49	211	574
Oleico (C18:1n9c)	9,6	6,7	9,0	141	735	1913
Linoléico (C18:2n6c)	0,2	2,8	3,9	41	71	94
γ -Linolénico (C18:3n6)	-	-	0,1	0,8	3,4	5,9
Linolénico (C18:3n3)	0,3	0,2	0,6	8,3	7,8	12,5
Araquídico (C20:0)	5,7	9,7	7,6	15,4	24	77
Eicosenoico (C20:1n9)	0,7	1,9	2,5	6,6	12,9	28
Eicosadienoico (C20:2n6)	-	0,2	0,6	5,2	5,3	10,7
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	-	0,4	2,1	3,7	4,1
Araquidónico (C20:4n6)	1,0	0,9	3,9	7,6	15	18,5
Behénico (C22:0)	0,2	0,1	0,1	0,6	1,3	6,4
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	1,0	-	0,8	2,0	1,8	2,7
Erúcico (C22:1n9)	-	-	0,2	1,0	0,8	2,7
Nervónico (C24:1)	-	-	0,1	0,5	0,2	1,3
Docosahexaenoico (C22:6n3)	1,1	0,2	2,5	8,5	12,0	15

Tabla B. Cantidad absoluta promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de FA en las fracciones de PL para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD ABSOLUTA PROMEDIO ($\mu\text{g}/\text{mg}$) DE FA EN LAS FRACCIONES DE PL PARA LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	0,1	-	0,1	0,1	0,4	0,3
Mirístico (C14:0)	0,4	1,4	1,2	3,6	10,5	16,2
Miristoleico (C14:1n5)	-	-	-	0,1	0,3	0,4
Pentadecanoico (C15:0)	-	1,0	1,7	4,5	9,8	13,4
Palmítico (C16:0)	6,0	17,4	18,0	56	217	358
Palmitoleico (C16:1)	-	0,4	0,8	3,6	38,8	73,7
Heptadecanoico (C17:0)	-	1,4	1,8	3,9	9,0	13,7
Esteárico (C18:0)	7,7	18,2	19,7	51	188	272,2
Oleico (C18:1n9c)	2,2	7,5	11,4	37,4	192	364
Linoléico (C18:2n6c)	3,0	6,3	14,2	39,5	62	92
γ -Linolénico (C18:3n6)	-	-	0,3	0,8	2,4	2,3
Linolénico (C18:3n3)	1,4	0,3	0,9	4,4	3,0	4,6
Araquídico (C20:0)	0,4	3,0	1,0	2,0	5,1	10,6
Eicosenoico (C20:1n9)	0,3	0,9	1,2	1,8	6,3	12,9
Eicosadienoico (C20:2n6)	-	0,4	1,1	2,3	4,1	5,6
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	-	1,0	2,9	7,6	12,7
Araquidónico (C20:4n6)	1,9	3,0	9,5	31,0	124	203
Behénico (C22:0)	-	0,5	0,8	1,5	4,4	11,2
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	2,1	0,3	0,9	7,4	13,3	20,6
Erúcico (C22:1n9)	-	0,2	0,5	0,8	2,2	3,6
Nervónico (C24:1)	-	0,4	0,9	1,5	5,7	13,9
Docosahexaenoico (C22:6n3)	2,2	0,7	3,1	13,8	53	125

Tabla C. Cantidad absoluta promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de FA en las fracciones de CE para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

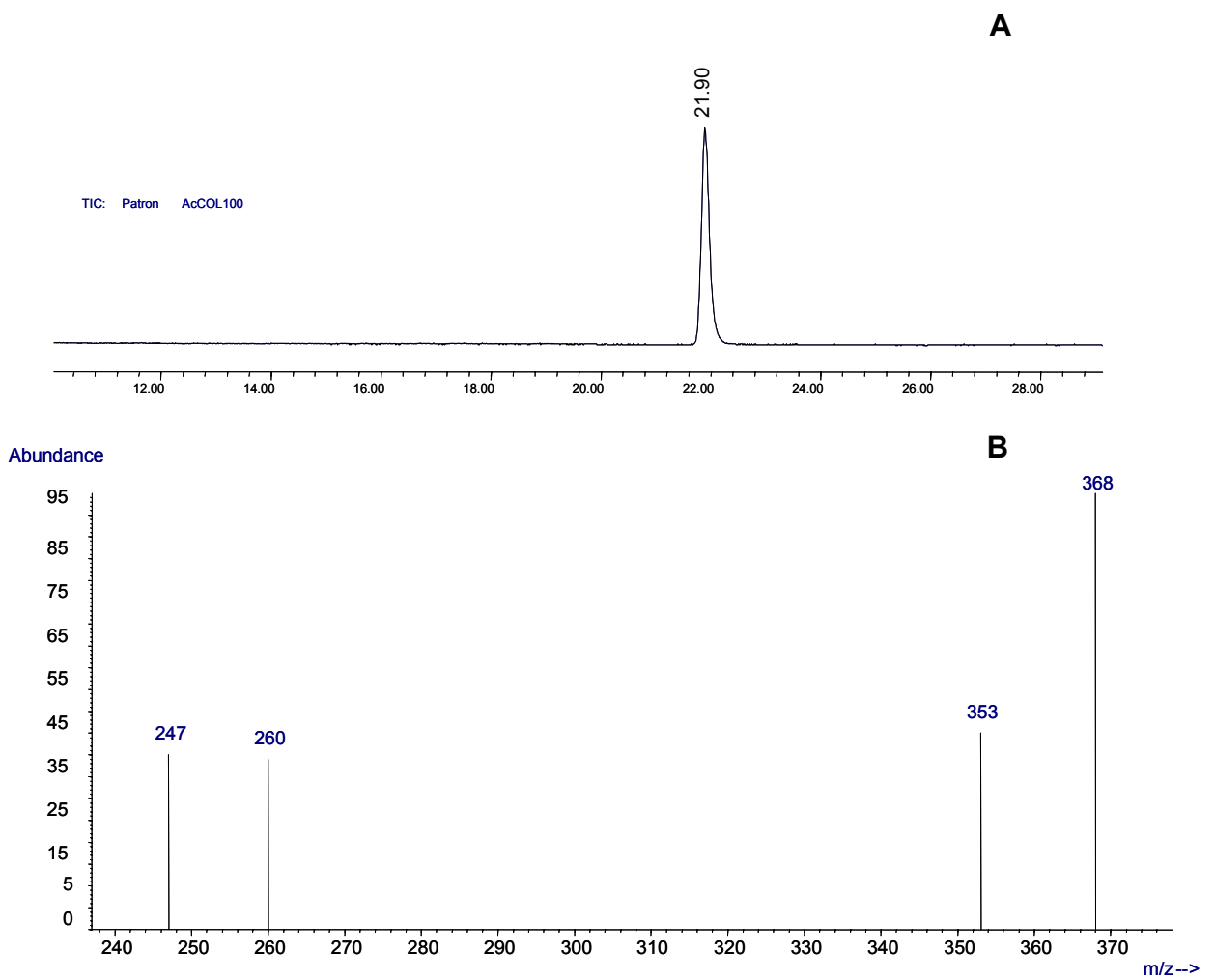
ÁCIDO GRASO	CANTIDAD ABSOLUTA PROMEDIO ($\mu\text{g}/\text{mg}$) DE FA EN LAS FRACCIONES DE CE PARA LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	-	0,05	-	0,3	0,3	0,4
Mirístico (C14:0)	0,23	0,08	0,9	1,3	1,3	3,8
Miristoleico (C14:1n5)	-	0,003	-	0,1	0,1	-
Pentadecanoico (C15:0)	-	0,03	0,3	0,7	0,5	1,4
Palmitico (C16:0)	1,83	0,3	8,1	10,4	13,0	45,7
Palmitoleico (C16:1)	-	0,03	0,2	3,2	3,6	15,7
Heptadecanoico (C17:0)	0,05	0,03	0,5	0,5	0,5	1,3
Estearico (C18:0)	1,86	0,4	9,0	6,2	11,6	25,7
Oleico (C18:1n9c)	2,38	0,6	4,0	15,9	8,4	42,8
Linoléico (C18:2n6c)	1,13	0,5	2,4	6,3	5,2	8,4
γ -Linolénico (C18:3n6)	-	0,02	-	0,3	-	0,4
Linolénico (C18:3n3)	1,60	0,08	0,2	1,4	0,3	1,2
Araquídico (C20:0)	15,81	5,0	6,1	16,2	18,4	29,8
Eicosenoico (C20:1n9)	0,39	1	0,7	4,8	2,8	6,7
Eicosadienoico (C20:2n6)	-	0,1	0,3	1,0	0,5	2,3
Eicosatrienoico (C20:3n6)	-	0,08	-	0,5	0,2	0,7
Araquidónico (C20:4n6)	4,76	2	4,3	5,5	5,1	7,0
Behénico (C22:0)	-	0,03	-	0,2	0,3	0,6
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	1,34	0,5	-	1,7	-	0,9
Erúcico (C22:1n9)	-	0,06	-	0,5	-	0,4
Nervónico (C24:1)	-	0,06	-	0,2	-	0,5
Docosahexaenoico (C22:6n3)	1,85	0,7	1,3	3,1	0,7	3,1

Tabla D. Cantidad absoluta promedio ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de FFA para los diferentes estados embrionarios de *Mabuya* sp.

ÁCIDO GRASO	CANTIDAD ABSOLUTA PROMEDIO ($\mu\text{g}/\text{mg}$) DE FFA EN LOS ESTADOS EMBRIONARIOS DE <i>Mabuya</i> sp. (n= 2)					
	OVIDUCTAL	TEMPRANO	MEDIO	MEDIO AVANZADO	AVANZADO	NEONATO
Láurico (C12:0)	0,0	0	0,5	0,8	0,4	1,1
Mirístico (C14:0)	0,06	0,9	0,8	2,4	2,3	4,4
Miristoleico (C14:1n5)	0	0	0,1	0,2	0,1	0,4
Pentadecanoico (C15:0)	0,0	0,4	0,5	1,9	1,3	2,4
Palmítico (C16:0)	0,57	10,2	10,6	25,1	38,1	70
Palmitoleico (C16:1)	0	0,4	0,8	5,0	9,8	21,1
Heptadecanoico (C17:0)	0,01	0,6	0,6	1,7	1,9	2,8
Estearico (C18:0)	0,60	10,8	10,3	17,5	41,9	64
Oleico (C18:1n9c)	0,94	5,7	9,3	28,8	40,8	75
Linoléico (C18:2n6c)	0,25	4,2	5,7	21,8	10,1	22,4
γ -Linolénico (C18:3n6)	0,00	0,0	0,2	0,3	0,3	0,8
Linolénico (C18:3n3)	0,00	0,0	0,7	2,1	0,6	2,3
Araquídico (C20:0)	0,03	9,0	15,8	10,1	21,1	27,2
Eicosenoico (C20:1n9)	0,0	1,7	4,2	3,5	4,4	1,5
Eicosadienoico (C20:2n6)	0,00	0,0	0,3	2,0	0,2	0,6
Eicosatrienoico (C20:3n6)	0,00	0,0	0,2	1,3	1,2	0,0
Araquidónico (C20:4n6)	0,0	3,0	4,4	9,7	23,8	26,7
Behénico (C22:0)	0,0	0,0	0,5	0,0	1,8	1,2
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	0,0	0,0	0,05	1,0	1,4	2,3
Erúcico (C22:1n9)	0,00	0,0	0,1	0,4	0,3	0,7
Nervónico (C24:1)	0,00	0,0	0,0	0,2	0,2	0,2
Docosahexaenoico (C22:6n3)	0,0	0,0	1,3	6,2	5,3	13,9

ANEXO 8

Corriente iónica reconstruida (TIC) del derivado acetilado de colesterol de referencia (A), junto con su fragmentograma (B) y la curva de calibración.



Calibración Acetato de colesterilo

Calib. Data Modified : 28/12/2006 07:58:37 a.m.

Calculate : External Standard
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 0.000 %
Abs. Reference Window : 0.080 min
Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
Abs. Non-ref. Window : 0.080 min
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks : not reported
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

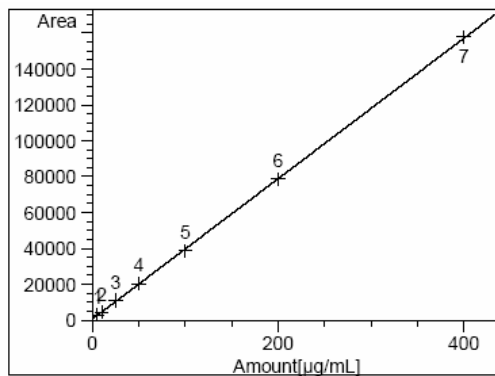
Curve Type : Linear
Origin : Included
Weight : Equal

Recalibration Settings:
Average Response : Average all calibrations
Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :

Printout of recalibrations within a sequence:
Calibration Table after Recalibration
Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
Results of first cycle (ending previous bracket)

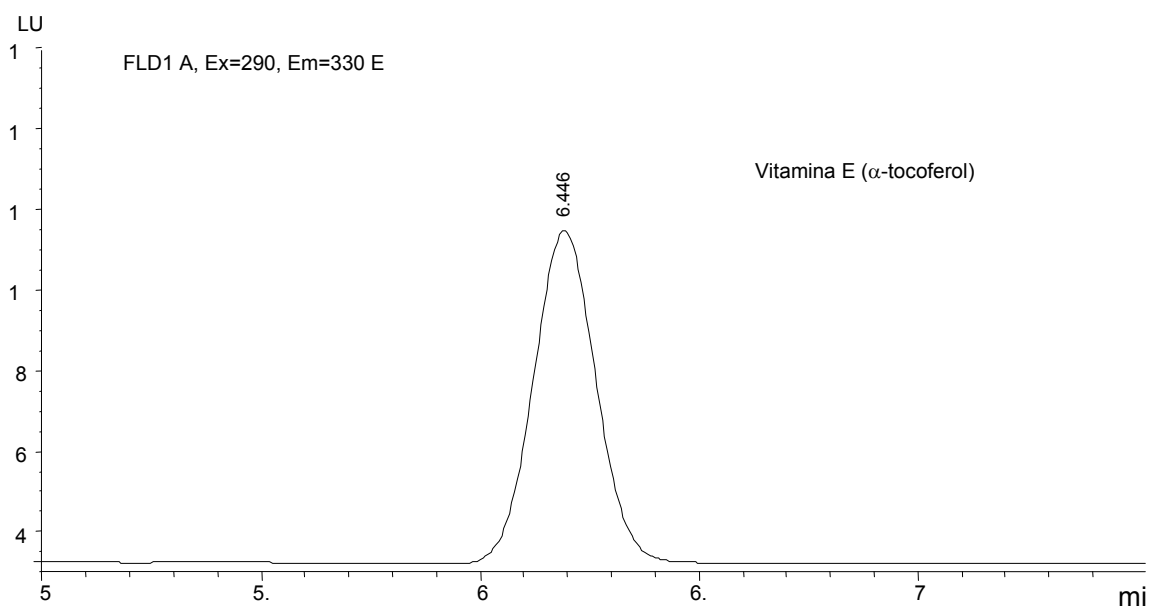
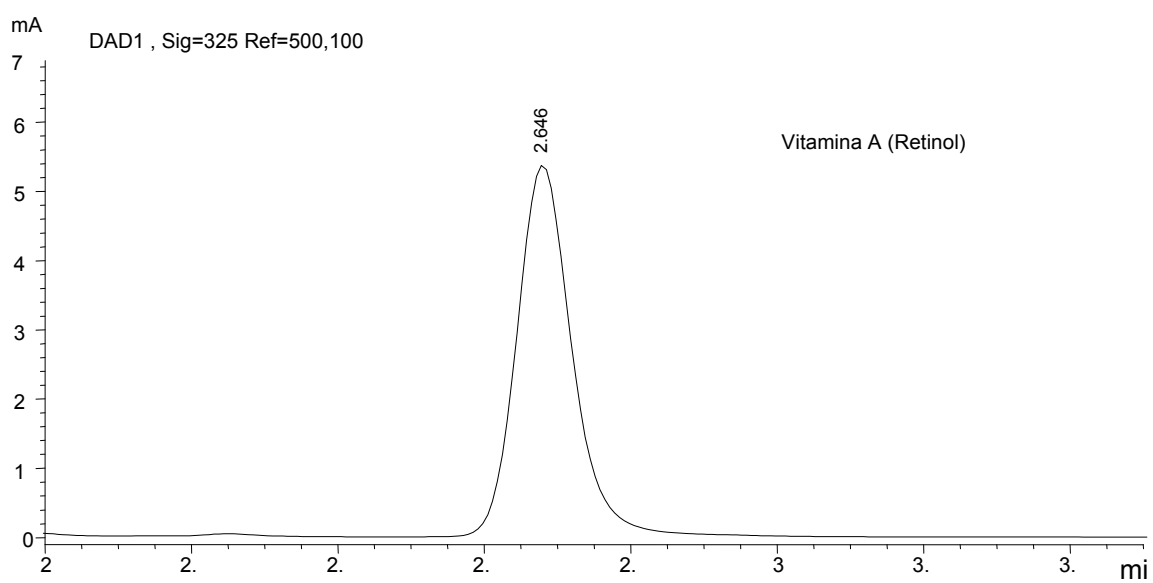
RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [µg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
21.900	1	5.00000	2755.00000	1.81488e-3	Acetato de colesterilo
		10.00000	4287.00000	2.33263e-3	
		25.00000	1.08810e4	2.29758e-3	
		50.00000	2.03140e4	2.46136e-3	
		100.00000	3.88150e4	2.57632e-3	
		200.00000	7.84080e4	2.55076e-3	
		400.00000	1.57818e5	2.53457e-3	



Acetato de colesterilo at exp. RT: 21.900
FID2 B,
Correlation: 0.99995
Residual Std. Dev.: 571.19699
Formula: $y = mx + b$
m: 392.63124
b: 387.41492
x: Amount [µg/mL]
y: Area

ANEXO 9

Cromatogramas de las vitaminas A y E obtenidos por HPLC/DAD/FLD y las curvas de calibración.



Curva de calibracion de vitaminas A y E

Calib. Data Modified : 20/02/2008 06:35:06 a.m.

Calculate : External Standard
Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 0.500 %
Abs. Reference Window : 0.100 min
Rel. Non-ref. Window : 0.500 %
Abs. Non-ref. Window : 0.100 min
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks : not reported
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

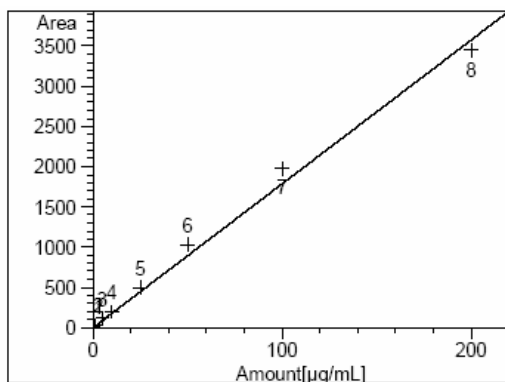
Curve Type : Linear
Origin : Forced
Weight : Equal

Recalibration Settings:
Average Response : Average all calibrations
Average Retention Time: Floating Average New 75%

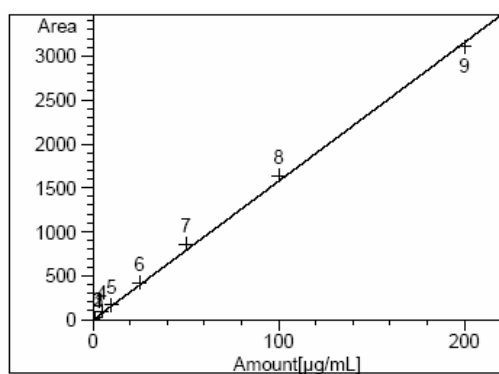
Calibration Report Options :

Printout of recalibrations within a sequence:
Calibration Table after Recalibration
Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
Results of first cycle (ending previous bracket)

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [µg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
2.646	1	5.00000e-1	12.76780	3.91610e-2	Vitamina A (Retinol)
	2	1.00000	26.98880	3.70524e-2	
	3	5.00000	113.45000	4.40723e-2	
	4	10.00000	198.00000	5.05051e-2	
	5	25.00000	495.80800	5.04227e-2	
	6	50.00000	1027.80000	4.86476e-2	
	7	100.00000	1977.41000	5.05712e-2	
	8	200.00000	3449.10000	5.79861e-2	
6.446	1	1.00000e-1	1.96800	5.08130e-2	Vitamina E (a-Tocoferol)
	2	5.00000e-1	11.18320	4.47099e-2	
	3	1.00000	22.78480	4.38889e-2	
	4	5.00000	96.87950	5.16105e-2	
	5	10.00000	167.00000	5.98802e-2	
	6	25.00000	418.23500	5.97750e-2	
	7	50.00000	863.09900	5.79308e-2	
	8	100.00000	1641.63000	6.09151e-2	
	9	200.00000	3105.20000	6.44081e-2	



Vitamina A (Retinol) at exp. RT: 2.646
 FID1 A,
 Correlation: 0.99786
 Residual Std. Dev.: 102.29412
 Formula: $y = mx$
 m: 17.91370
 x: Amount [µg/mL]
 y: Area



Vitamina E (a-Tocoferol) at exp. RT: 6.446
 FID1 A,
 Correlation: 0.99951
 Residual Std. Dev.: 40.53148
 Formula: $y = mx$
 m: 15.79299
 x: Amount [µg/mL]
 y: Area