

## **DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN MÚLTIPLE DE RESTOS VEGETALES, SILICOFITOLITOS, POLEN, PARÁSITOS, ISÓTOPOS ESTABLES Y ADN DE HECES DE LAMA GUANICOE**

### **DESIGN AND EVALUATION OF A MULTIPLE EXTRACTION PROTOCOL FOR PLANT REMAINS, SILICA PHYTOLITHS, POLLEN, PARASITES, STABLE ISOTOPES, AND DNA FROM LAMA GUANICOE FECES**

*Nadia Jimena Velázquez<sup>1</sup>, Romina Petriugh<sup>2</sup>, María Laura Benvenuto<sup>3</sup>, Cecilia Martínez Tosto<sup>4</sup>, Ivana Camiolo<sup>5</sup>, Patricia Palacio<sup>6</sup>, Martín Horacio Fugassa<sup>7</sup>, Luciano Oscar Valenzuela<sup>8</sup>, Lidia Susana Burry<sup>9</sup>*

#### **RESUMEN**

La metodología que ha sido más utilizada para realizar la extracción de diferentes proxies biológicos consiste en dividir los coprolitos en distintas submuestras para el análisis de cada uno. Estudios recientes han reconocido limitaciones en las interpretaciones alcanzadas en base a la utilización de este método. El objetivo de este trabajo fue diseñar un protocolo de análisis *multiproxy* para ser aplicado a una única muestra de heces de camélidos sudamericanos. El diseño se desarrolló con el propósito de minimizar la utilización de compuestos químicos y optimizar la recuperación de los diversos *proxies* a partir del análisis de diferentes consideraciones teóricas y metodológicas. Se realizaron modificaciones al protocolo estándar en función de los requerimientos para el análisis *multiproxy*. Con el fin de comenzar a optimizar este método, se aplicó el protocolo sobre un pool de cuatro heces actuales de guanacos (*Lama guanicoe*) recolectadas en la Patagonia Argentina. Se realizó el análisis de los *proxies* recuperados: fragmentos vegetales, silicofitolitos, polen, restos parasitarios y ADN. Se observó un buen estado de preservación de los indicadores analizados, se logró identificar diferentes fragmentos

1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [nvelazquez@mdp.edu.ar](mailto:nvelazquez@mdp.edu.ar)

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [rpetriugh@gmail.com](mailto:rpetriugh@gmail.com)

3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [mlaurabenvenuto@gmail.com](mailto:mlaurabenvenuto@gmail.com)

4 Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [amtosto@mdp.edu.ar](mailto:amtosto@mdp.edu.ar)

5 Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [ivanasc83@gmail.com](mailto:ivanasc83@gmail.com)

6 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [ppalacio@mdp.edu.ar](mailto:ppalacio@mdp.edu.ar)

7 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [mfugassa@mdp.edu.ar](mailto:mfugassa@mdp.edu.ar)

8 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Laboratorio de Ecología Evolutiva Humana y Núcleo de Estudios Interdisciplinarios sobre Poblaciones Humanas de Patagonia Austral. Facultad de Ciencias Sociales, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Department of Biology, University of Utah. [lucianoovalenzuela@gmail.com](mailto:lucianoovalenzuela@gmail.com)

9 Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. [lburry@mdp.edu.ar](mailto:lburry@mdp.edu.ar)

Velázquez *et al.*, 2019. Diseño y evaluación de un protocolo de extracción múltiple de restos vegetales, silicofitolitos, polen, parásitos, isótopos estables y adn de heces de *Lama guanicoe*. *Anales de Arqueología y Etnología* 74, N°2, 127-145. Mendoza.

vegetales, silicofitolitos, tipos polínicos y restos parasitarios. Además, se logró determinar el origen zoológico mediante extracción de ADN. Se discuten los resultados a partir de las diferentes consideraciones teóricas y metodológicas y se prevé la implementación de este protocolo en análisis de coprolitos.

**Palabras clave:** heces - *multiproxy* - *Lama guanicoe* - protocolo de extracción múltiple

## ABSTRACT

The most commonly-used extraction methods for biological proxies are based on dividing each coprolite to analyze each proxy separately. However, the interpretation of results has limitations. The aim of the present work is to design a new multiproxy protocol for feces of South American camelids. The protocol was based on reducing the use of chemical compounds in order to recover multiple proxies from a single sample. Theoretical and methodological considerations were taken into account to improve the protocol. The standard protocol was modified considering the requirements of multiproxy analysis. The experimental protocol was tested with a set of four guanaco (*Lama guanicoe*) feces from Patagonia, Argentina. After extraction, silica phytoliths, pollen types, and parasite remains were well-preserved and identified. Zoological origin was determined from DNA analysis. The results are discussed in light of various theoretical and methodological considerations. The implementation of this multiproxy extraction protocol in coprolites is an avenue for future research.

**Keywords:** feces - multiproxy - *Lama guanicoe* - multiproxy extraction protocol

Recibido: 15/09/2019

Aceptado: 22/12/2019

## INTRODUCCIÓN

El análisis de coprolitos (heces mineralizadas o deshidratadas) implica el estudio de *proxies* (indicadores) como polen, fragmentos vegetales, silicofitolitos y parásitos, entre otros, que dan información sobre paleodieta, rango de acción, estacionalidad en el uso de cuevas y aleros e infecciones parasitarias de los organismos (Reinhard y Bryant, 1992, 2008). Asimismo permiten complementar las reconstrucciones paleoambientales con información no registrada a través del análisis de sedimentos (Velázquez *et al.*, 2015, 2020). Los coprolitos presentan evidencias directas para reconstruir las paleodietas, ya que representan lo último que consumió el individuo antes de la defecación. Se caracterizan por representar una escala temporal corta (Horrocks *et al.*, 2002) a diferencia de otras evidencias de paleodietas que son consideradas indirectas como los patrones de uso dental y la composición de isótopos estables de carbono y nitrógeno de huesos que representan una escala temporal amplia (Rawlence *et al.*, 2016).

El análisis *multiproxy* (múltiples indicadores) permite sumar información a la obtenida con el análisis de un solo *proxy*, debido a que considera simultáneamente varios niveles de análisis y grados de resolución taxonómica. Para ello, la experiencia desarrollada y los resultados obtenidos en cada una de las disciplinas (microhistología, análisis de silicofitolitos e isótopos estables, palinología, parasitología y biología molecular) generan un contexto óptimo para desarrollar un trabajo interdisciplinario.

En tal sentido, se han llevado a cabo en nuestro grupo de investigación análisis de polen y fragmentos vegetales en coprolitos de camélidos y de fauna extinta hallados en sitios arqueológicos del Parque Nacional Perito Moreno (Santa Cruz, Argentina). Estos análisis permitieron inferir el hábito alimenticio y la estacionalidad en el uso de cuevas y aleros (Velázquez *et al.*, 2014, 2015). Además, se han optimizado las técnicas microhistológicas para la identificación de fragmentos vegetales hallados en coprolitos. Esta optimización permitió obtener información de coprolitos, probablemente humanos, para abordar aspectos culturales como estrategias de subsistencia, uso alimenticio y medicinal (Martínez Tosto *et al.*, 2016). Otros aportes importantes incluyen el estudio de silicofitolitos en coprolitos, en el que se observó una buena conservación de tejidos vegetales silicificados de Monocotiledóneas y Dicotiledóneas. También, se identificaron silicofitolitos de gramíneas (Poaceae) pertenecientes a las subfamilias Pooideae y Stipoideae (Benvenuto *et al.*, 2018). Además, se han analizado los parásitos provenientes del tracto intestinal de animales cuyos resultados han aportado información para reconstruir el contexto arqueológico. El estudio parasitológico de coprolitos de la fauna acompañante de los cazadores-recolectores que ocupaban los refugios rocosos en Patagonia ha permitido identificar restos parasitarios específicos de camélidos (Amalfitano *et al.*, 2017; Fugassa, 2007; Fugassa *et al.*, 2008; Taglioretti *et al.*, 2017, entre otros) cánidos (Fugassa *et al.*, 2006; Fugassa y Petrih, 2017; Fugassa *et al.*, 2018), felinos (Fugassa *et al.*, 2009; Petrih y Fugassa, 2017) y roedores (Beltrame *et al.*, 2012; Sardella y Fugassa, 2009, entre otros). Los resultados contribuyeron a reconstruir la historia biogeográfica de las especies que parasitan a estos mamíferos y aportaron, además, información acerca de los aspectos culturales de poblaciones antiguas.

La identificación del origen zoológico de los coprolitos resulta fundamental para interpretar los resultados de los espectros polínicos, de fragmentos vegetales y de silicofitolitos. Las características morfológicas y las inclusiones de los coprolitos son aspectos que aportan información para determinar su identidad (Jouy-Avantín *et al.*, 2003; Weir y Bonavia, 1985). Sin embargo, la identificación a través de análisis del ADN antiguo (ADNa) posibilita, de manera más precisa, definir cuál fue el animal que originó las heces. En nuestro grupo de investigación se han optimizado los métodos de extracción de ADNa de coprolitos y la amplificación mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, en inglés) de genes mitocondriales específicos de cánidos, felinos y camélidos. Las secuencias obtenidas de estos genes han permitido identificar coprolitos de mamíferos silvestres que acompañaron a los humanos en los refugios rocosos (Petrih y Fugassa, 2017; Fugassa *et al.*, 2018, 2019).

La metodología para la extracción de fragmentos vegetales, silicofitolitos, polen, isótopos estables, parásitos y ADN utilizada habitualmente consiste en la división del coprolito en diferentes submuestras para luego procesar y analizar cada *proxy* de manera particular (Bryant, 1974; Wood y Wilmshurst, 2016). Esta metodología, muchas veces, produce pérdida de material que puede provocar que no se obtenga la información completa que brinda cada uno de los *proxies*. Reinhard *et al.* (2002) analizaron coprolitos humanos desde un enfoque

multidisciplinario, utilizaron 10 g de muestra para analizar fragmentos vegetales, fitolitos y parásitos, y 2 g para el análisis de polen. Este último análisis fue realizado por medio de métodos químicos. Bajo este procedimiento, la división de las muestras puede subestimar la presencia de inclusiones que no estaban distribuidas de manera uniforme en el coprolito.

Los estudios mencionados previamente realizados en coprolitos de sitios arqueológicos de Argentina se han llevado a cabo mediante el análisis de uno o dos *proxies* simultáneamente y reconocen limitaciones en las interpretaciones alcanzadas. En este sentido el estudio de fragmentos vegetales encuentra su limitante cuando los caracteres diagnósticos para la identificación taxonómica a nivel específico no están presentes o los restos vegetales se encuentran muy fragmentados debido a los efectos de digestión. Esto puede producir una subvaloración de especies identificadas. Además, si se produce una digestión diferencial entre las plantas consumidas, las más digeridas serán las menos detectadas aunque su participación en la dieta sea importante (Mc Innis *et al.*, 1983). En los análisis de silicofitolitos uno de los problemas sería la redundancia que implica que una misma morfología pueda ser producida por distintos taxones y otro la multiplicidad, que indica que un solo taxón es capaz de producir diferentes morfologías (Rovner, 1971). Ante esta limitación la identificación de determinados taxones en los coprolitos podría quedar restringida a niveles superiores dentro de la clasificación taxonómica.

Por otra parte, existen granos de polen que poseen exina muy delgada y frágil como el tipo polínico Juncaceae (Faegri *et al.*, 1989). Esta característica no permite una buena conservación y por lo tanto constituye una limitación debido a que estos tipos polínicos podrían estar sub-representados en el registro de los coprolitos. Otra limitación del análisis palinológico es que la identificación, en general, es posible con una resolución taxonómica hasta nivel de familia o género. Por lo tanto, la combinación del análisis de diferentes *proxies* de origen vegetal permite realizar una identificación más precisa de los taxones presentes en los coprolitos.

Asimismo, los huevos y ooquistes de parásitos que se hallan en su mayoría en las heces, también resultan difíciles de identificar por microscopía óptica debido a sus escasos caracteres taxonómicos y/o a la mala preservación de los huevos porque tienen paredes muy frágiles y delgadas. Por lo tanto, en general solo es posible diferenciar estos estadios a nivel de género. Además, algunos huevos u ooquistes poseen paredes más frágiles por lo que se rompen muy fácilmente y no es posible hallarlos, lo que subestima la presencia de ciertos taxones.

En relación con la determinación del origen zoológico de los coprolitos, la combinación de dos *proxies*, ADN<sub>a</sub> y parásitos específicos de ciertos mamíferos, también permite incrementar la precisión en la identificación.

Los estudios de isótopos estables de carbono y nitrógeno en heces y coprolitos permiten obtener información acerca de la dieta y la estacionalidad de la deposición. Por ejemplo, se puede conocer si las plantas consumidas corresponden a especies con mecanismo de fijación de carbono vía C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub>, e inferir la estación del año de ocupación del sitio (Camiolo *et al.*, 2018; Codron *et al.*, 2007; Ehleringer y Cerling, 2001). También,

con estos análisis es posible dilucidar el ambiente de forrajeo de los organismos, si se trata de un bosque cerrado o de un área más abierta como la estepa. Una de las limitaciones de los análisis de isótopos estables en heces es que la identificación de las plantas solo es posible a nivel de grupos funcionales ( $C_3$  o  $C_4$ ) y no a nivel taxonómico.

En relación con las limitaciones que presenta el análisis de cada *proxxy* en forma individual surge la necesidad de desarrollar protocolos que permitan extraer los diferentes *proxies* de una misma muestra para poder realizar interpretaciones más robustas al combinar de manera complementaria la información brindada por todos los *proxies* en conjunto. Es por ello que el objetivo de este trabajo es presentar los resultados del diseño y evaluación de un protocolo de extracción múltiple de *proxies* en heces actuales de guanaco (*Lama guanicoe*, familia Camelidae). Esta optimización resulta necesaria para ser implementada en análisis de coprolitos, de manera que el análisis conjunto de los *proxies* contribuya a responder preguntas paleoambientales, de dieta y de aspectos culturales de los humanos y la fauna acompañante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio y recolección de muestras en el campo

El trabajo se desarrolló en la cuenca del lago Pueyrredón-Posadas-Salitroso (Santa Cruz), donde se encuentra el sitio arqueológico Cueva Milodón Norte 1 (CMN1) (47°00'S 72°15'O) (Figura 1). En este sitio se han encontrado restos arqueofaunísticos y coprolitos atribuibles a camélidos que datan desde el Holoceno medio hasta el tardío.

Frente a CMN1 se recolectaron heces actuales procedentes de un bosteadero de guanaco (Figura 2). Durante la recolección se utilizaron guantes de látex sin polvo y las heces se guardaron en bolsas de papel para evitar la acumulación de humedad y la proliferación de hongos. En el laboratorio, las heces se secaron en estufa a 35°C hasta su completa deshidratación y se almacenaron en oscuridad en frascos estériles rotulados.

### Consideraciones para el diseño del protocolo *multiproxy*

El diseño del protocolo se inició ante la necesidad de responder las siguientes preguntas ¿Las heces recolectadas del bosteadero pertenecen a guanaco? ¿Cómo unificar protocolos particulares para cada *proxxy* sin perder la representatividad de cada uno de ellos? ¿Es necesario fraccionar el residuo para el estudio de cada *proxxy*, de qué manera y en qué paso del protocolo? Por estas razones durante el diseño se consideraron los siguientes aspectos: 1. Definir la muestra mínima a procesar en función de las características morfológicas de las heces y del número y tipos de *proxxy* a evaluar; 2. Identificar la composición química (presencia de sílice) bajo lupa y textural (fracción arcillo-limo-arenosa) de las heces según Folk (1954) para evaluar el tiempo de rehidratación en

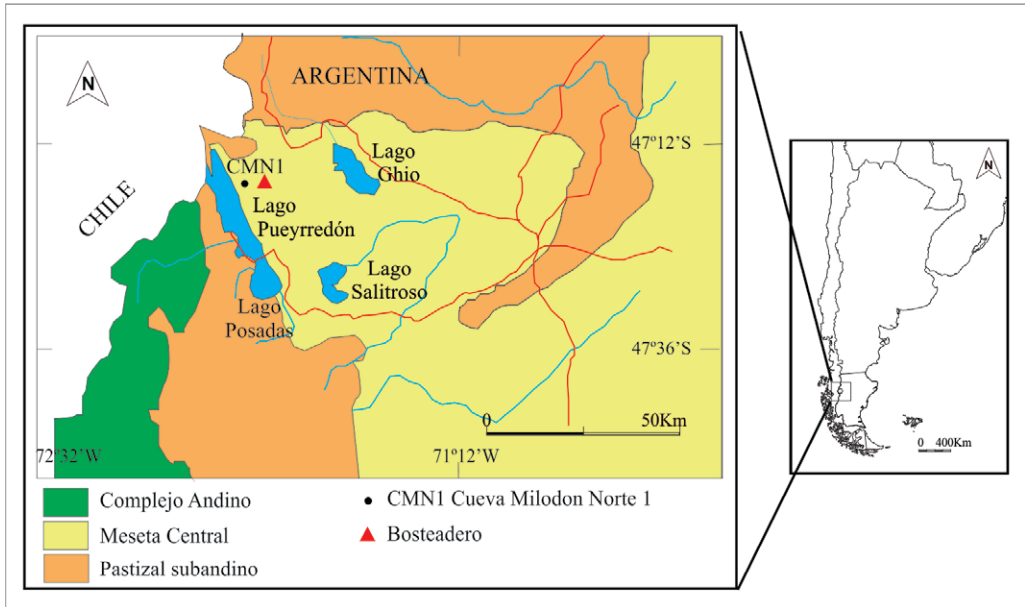


Figura 1. Mapa de las unidades de vegetación de la cuenca Pueyrredón-Posadas Salitroso, provincia de Santa Cruz (modificado de Oliva *et al.* 2001). Ubicación del bosteadero y del sitio arqueológico Cueva Milodón Norte 1. Figura en color en la versión digital.



Figura 2. *Lama guanicoe* (a la izquierda) y bosteadero (a la derecha). Figura en color en la versión digital.

fosfato trisódico y las mallas a utilizar para la filtración; 3. Reconocer propiedades físico-químicas (tamaño, fragilidad, composición química, etc.) de cada uno de los *proxies* y revisar sus protocolos de extracción particular para identificar posibles limitaciones y/o pérdidas en el procesamiento conjunto; 4. Analizar el patrón de distribución de los *proxies* (restos y/o fragmentos vegetales, silicofitolitos, polen, parásitos) dentro de las heces (Beck *et al.*, 2019; Fugassa, 2006); 5. Evaluar la pérdida de *proxies* en cada paso

del procesamiento conjunto; 6. Revisar el índice de refracción de cada *proxy* para la observación microscópica.

## Protocolo estándar de procesamiento de heces

Los primeros pasos del procesamiento estándar de las heces actuales son el registro del peso de las heces en balanza de alta precisión, la medición del diámetro y longitud bajo lupa binocular y la caracterización organoléptica (Jouy- Avantin *et al.*, 2003). Se separó el córtex (aproximadamente 1 mm) (SE: submuestra externa) con bisturí bajo lupa para asegurar que los restos recuperados no sean producto de contaminación (Bryant, 1974; Velázquez *et al.*, 2017). Posteriormente, se diseñó un protocolo basado en el propuesto por Velázquez (2016) y Wood y Wilmshurst (2016) y se realizaron modificaciones en función de los requerimientos establecidos para el análisis *multiproxy* de heces de camélidos.

## Análisis moleculares para la determinación del origen zoológico de las heces

Los estudios moleculares se realizaron extrayendo ADN total de cada uno de los *pellets* a partir de una submuestra de entre 50 y 100 mg. Se utilizó el kit AccuPrep® stool dna extraction (Bioneer) siguiendo las instrucciones del fabricante. La estrategia de identificación seleccionada fue utilizar un par de oligonucleótidos que solo amplifiquen ADN de camélidos, para descartar que las heces no sean originadas por huemules dado que, aunque en baja frecuencia, estos pueden estar presentes en la estepa. En tal sentido, para realizar las reacciones de PCR se utilizó el par de oligonucleótidos CAMCR2F y CAMCR2R que amplifican un fragmento de 118 pb de la región control del ADN mitocondrial (ADNmt) de camélidos del género *Lama* (Weinstock *et al.*, 2009). Se probaron 0.5 µl de una alícuota de la muestra sin diluir y de una dilución 1/10, la mezcla de PCR contenía 0.65 unidades de GoTaq DNA Polymerase (Promega) en 1X de GoTaq Buffer green y 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Thermo Scientific) y 0.4 µM de cada oligonucleótido. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 45 seg (desnaturalización), 50°C por 45 seg (*annealing*), 72°C por 45 seg (extensión) y 72°C por 5 min de extensión final. Se incluyó en todas las amplificaciones un control negativo sin templado. Para determinar los positivos, los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 2% m/v y separados por electroforesis horizontal en buffer Tris-borato-EDTA (TBE) 1X. Para detectar los fragmentos amplificados por PCR, el gel fue teñido con el fluoróforo SYBR™ Gold (Invitrogen).

## RESULTADOS

De acuerdo con las consideraciones que se plantearon para el diseño del protocolo *multiproxy*, se presentan los siguientes pasos para el procedimiento:

- 1. Determinar un número mínimo de *pellets*. En este caso fueron cuatro *pellets* para procesar en conjunto y constituir una sola muestra.
- 2. Dividir la parte interna de cada *pellet* (SI: submuestra interna) en dos secciones: SI1) para la determinación del origen zoológico a través del análisis del ADN, y SI2) para el análisis de fragmentos vegetales, silicofitolitos, polen, isótopos estables de carbono y nitrógeno y restos parasitarios.
- 3. Registrar el peso de las dos secciones de la SI.
- 4. Determinar el origen zoológico por medio del análisis del ADN de la SI1 a partir del ADN aislado de cada uno de los 4 *pellets* por separado, antes de que constituyan una sola muestra, y llevar a cabo la amplificación por PCR de la región control del ADN mitocondrial específica de camélidos (Figura 3).
- 5. Juntar en un vaso de precipitado la SI2 de cada uno de los 4 *pellets* (muestra) (Figura 4).
- 6. Agregar una tableta de esporas de *Lycopodium clavatum* con una concentración de 12542 esporas/tableta que se utiliza como marcador foráneo y para el cálculo de la concentración polínica. Rehidratar con 200 ml de fosfato trisódico acuoso 0.5% a 4°C durante 7 días.
- 7. Agitar con vórtex una vez luego de las primeras 72 hs en heladera.
- 8. Disgregar la muestra con varilla de vidrio durante la filtración, a través de una malla plástica de 250 µm de diámetro de poro, utilizando un Buffer fosfato salino (PBS, siglas en Inglés) 1X.
- 9. Recuperar los restos retenidos en la malla de 250 µm por medio de lavado con PBS 1X, para el análisis de fragmentos vegetales, silicofitolitos e isótopos estables.
- 10. Separar con cuchara estéril una fracción de los restos (aproximadamente 40 mg) para análisis de isótopos estables.
- 11. Secar en estufa a 60°C durante 24 hs la fracción para isótopos. Pulverizar con nitrógeno líquido y almacenar en tubos Eppendorf para análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno.
- 12. Secar en estufa a 25°C el contenido recuperado restante para observar bajo lupa los fragmentos vegetales y los silicofitolitos.
- 13. Realizar 4 preparados histológicos con el material recuperado sobre la malla de 250 µm utilizando como medio de montaje gelatina-glicerina para la observación e identificación de los fragmentos vegetales con microscopio óptico con objetivos de 10X y 40X. Además, realizar 6 preparados utilizando aceite de inmersión como medio de montaje para la observación de los silicofitolitos con el objetivo de 40X.
- 14. Filtrar nuevamente el líquido recuperado del filtrado por la malla de 250 µm (luego del paso 8) a través de mallas plásticas de 10 µm de diámetro de poro.



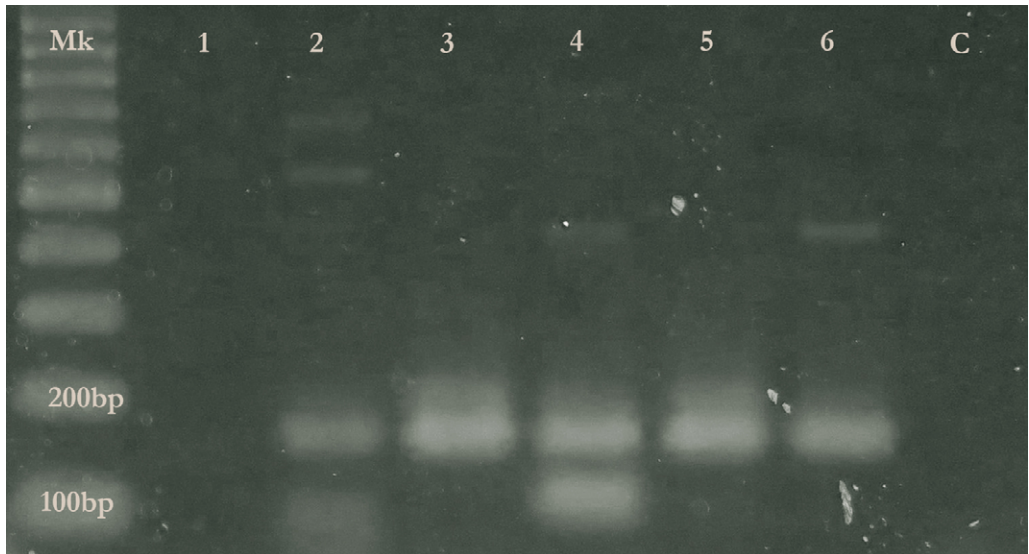


Figura 3. Análisis de ADN, gel de agarosa, 1, 3 y 5: muestra sin diluir, 2, 4 y 6: muestra diluida 10 veces (1/10). Mk: Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific™)

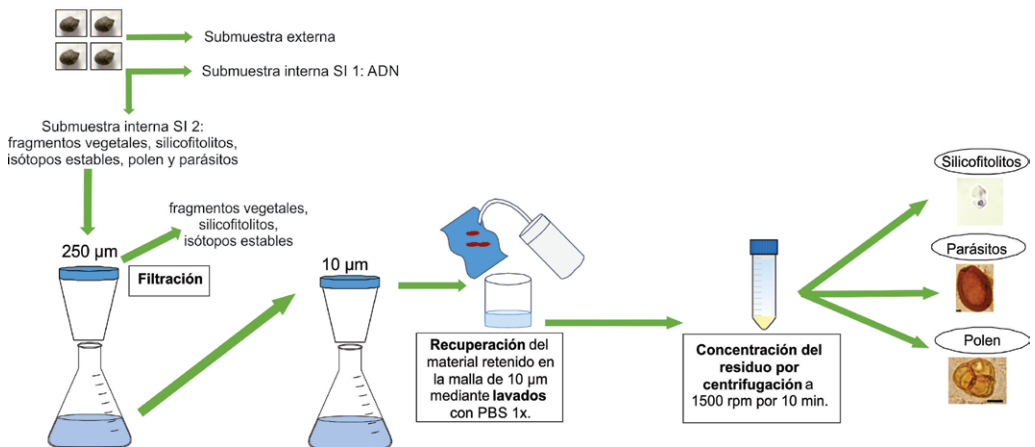


Figura 4. Protocolo implementado para el análisis *multiproxy* de 4 *pellets* juntos. Figura en color en la versión digital.

- 15. Recuperar el material retenido en la malla de 10 µm mediante lavados con PBS 1X y concentrar este material por centrifugación a 1500 rpm por 10 min.
- 16. Realizar 20 preparados utilizando como medio de montaje aceite de inmersión para la observación, identificación y recuento de parásitos y silicofitolitos (en los mismos preparados) en el microscopio óptico con aumentos de 400X.

- 17. Utilizar el residuo restante de la concentración (paso 15) para la extracción polínica mediante acetólisis: adición de ácido acético glacial y mezcla acetolítica (9 anhídrido acético: 1 ácido sulfúrico) por 3 minutos (Faegri *et al*, 1989).
- 18. Concentrar a 2500 rpm por 5 min.
- 19. Adicionar etanol al 70% al residuo obtenido luego de la concentración, en un volumen aproximado al doble de la muestra.
- 20. Realizar cuatro preparados microscópicos tomando una alícuota de la muestra para cada preparado y utilizar glicerina como medio de montaje. Para la identificación y recuento de polen y esporas utilizar aumentos de 400X y 1000X.
- 21. Observar como mínimo 3 preparados por muestra en el microscopio óptico. La suma polínica alcanzada, en general, debe ser mayor a 200 granos de polen por muestra.

El análisis de ADN de cada *pellet* para la determinación del origen zoológico de las heces resultó positivo para camélidos con un rango de peso seco de muestra entre 50 y 100 mg. En este protocolo se pretende analizar la mayor cantidad de *proxies* disminuyendo los tiempos y los costos económicos. Es por eso que para la determinación del origen zoológico de los coprolitos se buscó utilizar un método de identificación específico por PCR. Los resultados positivos para una determinada muestra sumados a los caracteres macroscópicos y microscópicos de las heces permiten, en conjunto, identificarlas. De esta forma, es posible procesar una mayor cantidad de muestras y se obtienen los resultados en un menor periodo de tiempo. Sin embargo, en el caso del análisis de coprolitos, estos fragmentos deberían ser purificados y secuenciados para corroborar que la amplificación no corresponde a un producto inespecífico y, eventualmente, discriminar entre especies de camélidos.

Con respecto a los restos vegetales retenidos en la malla de 250  $\mu\text{m}$ , se observaron bajo lupa binocular restos de hojas, pequeños tallos y semillas. Bajo microscopio óptico se identificaron fragmentos vegetales en buen estado de preservación. Se identificaron fragmentos de gramíneas como *Poa ligularis*, *Nassella tenuis*, *Distichlis* sp. y *Stipa* sp.; y de *Carex* sp., *Empetrum rubrum* y *Mulinum spinosum* (Figura 5).

Se recuperaron silicofitolitos de la malla de 250 y de 10  $\mu\text{m}$  (Figura 6) en buen estado de preservación. Los silicofitolitos recuperados en la malla de 250  $\mu\text{m}$  se encontraron en mayor abundancia articulados. Mientras que en la malla de 10  $\mu\text{m}$  la mayor abundancia correspondió a silicofitolitos aislados. Morfologías silicofitolíticas tales como rondels articulados trapeziformes de bordes lisos o crenados fueron asociadas a células cortas propias del tejido epidérmico de hojas de la familia Poaceae subfam. Pooideae. Silicofitolitos bilobados aislados “tipo *Stipa*” (Fredlund y Tieszen, 1994), probablemente derivados de individuos de *Stipa* sp., fueron también recuperados junto a silicofitolitos elongados, complejos estomáticos y tricomas derivados de células propias de la epidermis de Poaceae. Por último, se observaron silicofitolitos tabulares polilobados y poliédricos articulados que fueron asociados a especies de Dicotiledóneas.

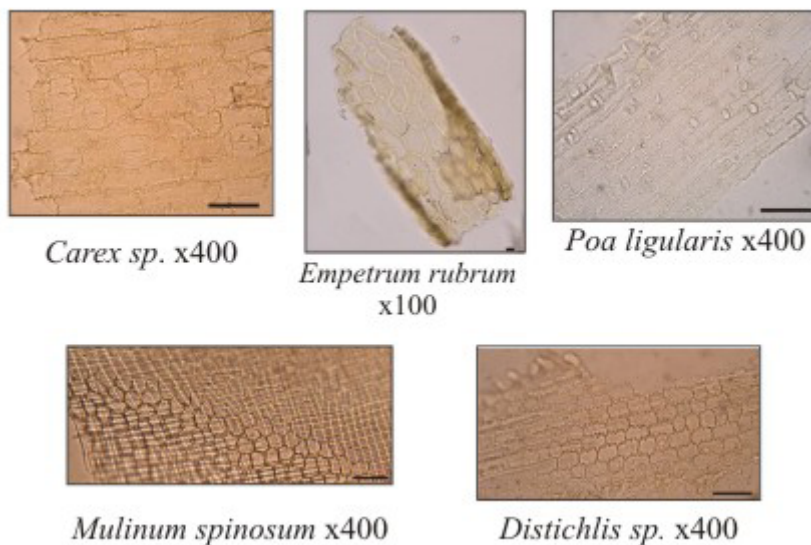


Figura 5. Fragmentos vegetales identificados a partir de los restos retenidos sobre la malla de 250  $\mu$ m. Figura en color en la versión digital.

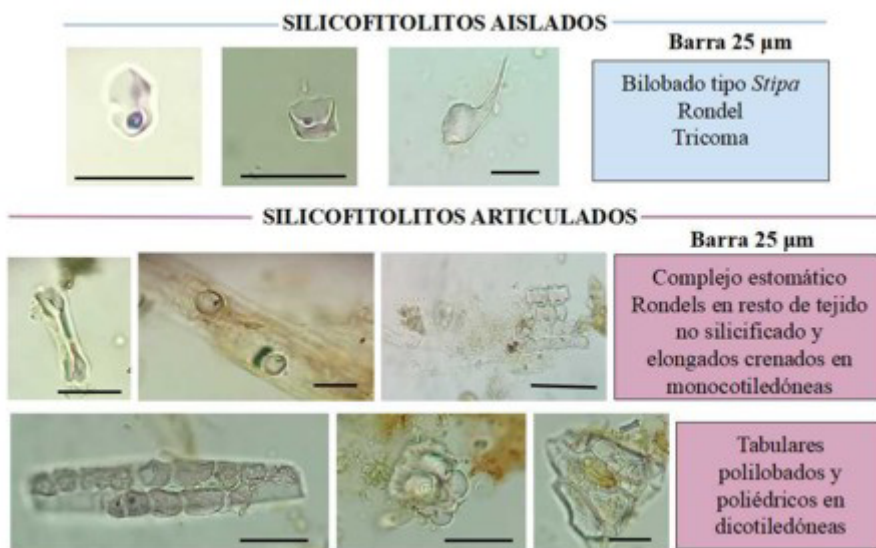


Figura 6. Silicofitolitos aislados y articulados identificados en las muestras obtenidas sobre las mallas de 250  $\mu$ m y 10  $\mu$ m. Figura en color en la versión digital.

Se identificaron granos de polen de Poaceae, *Nothofagus*, Caryophyllaceae, *Empetrum* y *Mulinum* retenidos sobre la malla de 10  $\mu\text{m}$  (Figura 7). No se observaron granos de polen rotos o arrugados y se identificaron las esporas de *Lycopodium clavatum* agregadas en buen estado. Se identificaron restos parasitarios asociados a huevos de nematodos capilláridos (Figura 8, tabla 1)

Las muestras para análisis de isótopos fueron pretratadas con la misma metodología presentada por Camiolo *et al.* (2018) con la que se obtuvieron resultados confiables. Resta realizar las mediciones isotópicas de las muestras de este pool de heces.

La aplicación del protocolo para 4 *pellets* en conjunto mostró un buen estado de conservación de todos los *proxies* y permitió obtener información cualitativa para los fragmentos vegetales y cuantitativa para el resto de los *proxies* estudiados. Sin embargo, en el caso de los parásitos no fue posible recuperar una cantidad comparable a los hallados en trabajos previos, en los cuales se analizaba la totalidad de la muestra únicamente para este *proxy*.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizaron muestras compuestas con un número mínimo de 4 *pellets*, debido a que en instancias previas del diseño del protocolo se analizaron *pellets* en forma individual y no se encontraron restos parasitarios al final del proceso. También, asumiendo que el patrón de distribución de los parásitos dentro de las heces es heterogéneo (Fugassa, 2006), el aumento en el número de *pellets* a analizar incrementaría la probabilidad de hallar una mayor cantidad de parásitos. Del mismo modo, Beck *et al.* (2019) reportan un estudio palinológico de coprolitos que demuestra que la distribución del polen en las heces es heterogénea. Estos autores sostienen que la falta de homogeneidad en la distribución de los *proxies* en la muestra puede producir diferentes interpretaciones en la reconstrucción de paleodietas y paleoambientes.

*Lama guanicoe* es un herbívoro pseudo-rumiante con una alta eficiencia digestiva en comparación con otros rumiantes (Muñoz, 2008; Puig *et al.*, 1996). Las heces observadas bajo lupa se caracterizaron por poseer una matriz orgánica de numerosos fragmentos vegetales compactados, producto de la fisiología digestiva. Por lo tanto, debido a que las heces no se disgregaron completamente se decidió modificar el tiempo de rehidratación requerido en fosfato trisódico (Callen y Cameron, 1960). La disgregación completa se produjo a los 7 días de rehidratación, luego de haberse agitado con vórtex a las 72 hs.

Por otra parte, en el protocolo fueron utilizadas mallas plásticas de 250  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. La primera malla permitió separar los restos vegetales y los silicofitolitos articulados de mayor tamaño de los de menor tamaño, tales como silicofitolitos aislados, polen y parásitos que quedaron retenidos en la malla de 10  $\mu\text{m}$ . La malla de 10  $\mu\text{m}$  se utilizó para separar los residuos menores que podrían interferir en la calidad de la observación microscópica (Velázquez, 2016). Las desventajas de su utilización fueron el largo tiempo de filtración debido a que los poros de la malla plástica

	mallá de 250 µm	mallá de 10 µm
<b>Morfologías articuladas</b>		
Papillae articuladas	2	1
Tejido epidérmico propio de Monocotiledóneas	73	24
Tejido epidérmico propio de Dicotiledóneas	3	4
Tejido vascular	13	4
Tejidos varios articulados	16	0
Complejo estomático		2
<b>Morfologías aisladas</b>		
Bilobado tipo <i>Stipa</i>	0	2
Elongado echinado	0	4
Elongado crenado	3	7
Elongado liso	5	29
Rondel	2	73
Trapeziforme crenado	1	9
Trapeziforme liso	2	10
Tricoma	1	48
Morfología no Identificada	42	
<b>N° total silicofitolitos</b>	<b>163</b>	<b>217</b>
<b>Polen</b>		
Poaceae		8
<i>Mulinum</i>		16
Asteraceae subfam. Asteroideae		7
Cyperaceae		4
Asteraceae subfam. Cichoroideae		25
<i>Rumex</i>		7
<i>Podocarpus</i>		3
Caryophyllaceae tipo <i>Cerastium</i>		5
Caryophyllaceae tipo <i>Silene</i>		1
<i>Adesmia</i>		11
<i>Nothofagus</i>		3
Indeterminados		4
<b>n° total tipos polínicos</b>		<b>94</b>
<b>Parásitos</b>		
Nematodes Capilláridos		2
<b>n° total restos de parásitos</b>		<b>2</b>

Tabla 1. Número de silicofitolitos, tipos polínicos y parásitos identificados en el material retenido sobre la mallá de 250 µm y 10 µm.

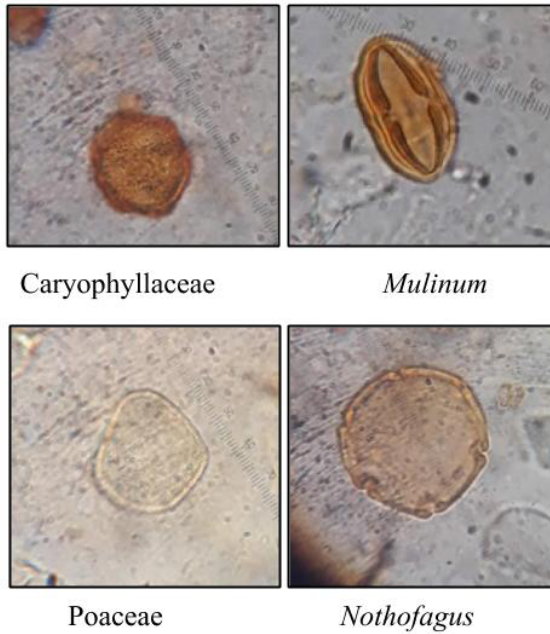


Figura 7. Tipos polínicos identificados en la muestra obtenida sobre la malla de 10  $\mu\text{m}$ .

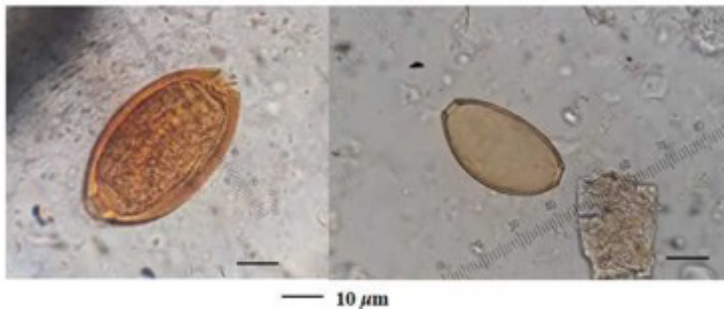


Figura 8. Restos parasitarios asociados a huevos de nematodos capiláridos.

se tapaban. Se intentó reducir los tiempos utilizando una bomba de vacío con kitasato para acelerar la filtración por la malla de 10  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, no resultó una buena práctica debido a que luego del filtrado se observaron fragmentos vegetales mayores a 10  $\mu\text{m}$  y larvas de parásitos en el sobrenadante que podrían haber pasado a través de los poros de la malla de manera vertical. Por estas razones no se recomienda la utilización de bomba de vacío con kitasato para acelerar el proceso de filtración.

Durante el desarrollo del diseño del protocolo, luego de la filtración por la malla de 250  $\mu\text{m}$ , el material retenido en la malla de 10  $\mu\text{m}$  se lavó, se concentró y luego se dividió en tres submuestras para el análisis de polen, parásitos y silicofitolitos según Warnock y

Reinhard (1992). Sin embargo, esta metodología no asegura una distribución homogénea del polen, silicofitolitos y parásitos en las submuestras. La imposibilidad de recuperar una cantidad comparable de parásitos a los hallados en estudios previos podría deberse a la distribución azarosa de los restos parasitarios o a una baja carga parasitaria. Dado que no se encontraron parásitos en los preparados observados, se decidió diseñar otra forma para minimizar el fraccionamiento de la muestra retenida en la malla de 10  $\mu\text{m}$ . Entonces, se consideraron las similitudes en las propiedades físicas de los *proxies* (índices de refracción). En tal sentido, para la separación e identificación de los restos parasitarios y silicofitolitos se decidió utilizar una misma fracción de la muestra, la cual permitió realizar preparados únicos en aceite de inmersión (índice de refracción entre 1,55 y 1,60) para la observación de los dos *proxies* en el microscopio óptico. Mientras que para la identificación de los tipos polínicos fue necesario tomar otra fracción independiente que permitiera llevar a cabo la acetólisis y el montaje en glicerina (índice de refracción de 1,47).

La acetólisis de la muestra resulta indispensable para eliminar la intina (pared interna del polen) y el contenido celular, que oscurece la exina (pared externa del polen), y dificulta la identificación de caracteres diagnósticos que se encuentran en la superficie de los granos de polen (Gray, 1965). La baja suma polínica alcanzada podría estar asociada a que durante el otoño (cuando se recolectaron las heces) la mayoría de las plantas no se encuentran en su período de polinización.

Por otra parte, en el procesamiento se utilizaron compuestos químicos que no presentaron carbono para no interferir en el análisis de isótopos estables de carbono. Por este motivo, el material retenido en las mallas fue lavado con buffer fosfato salino (PBS) 1X que no interfiere en el análisis de ninguno de los *proxies*.

Como perspectiva, a corto plazo se llevará a cabo la medición de isótopos estables de carbono y nitrógeno de las heces a partir de la fracción obtenida de la malla de 250  $\mu\text{m}$ . Trabajos previos realizados en heces actuales de *Lama guanicoe* (Camiolo *et al.*, 2018) demuestran que la aplicación de los primeros pasos del protocolo aquí descrito permitió obtener resultados confiables e indican que el procesamiento no afectaría la composición isotópica de la muestra.

Por último, consideramos importante resaltar la importancia de implementar, en un futuro inmediato, el presente diseño sobre muestras antiguas (coprolitos) con el objetivo de optimizar algunas de las consideraciones previamente mencionadas. La determinación de la muestra mínima, por ejemplo, podría tener que ser redefinida en función del estado de preservación y de la cantidad de coprolitos que se encuentren en el sitio arqueológico. Si bien la optimización de este protocolo en heces actuales puede resultar útil para el procesamiento de los coprolitos, se debe considerar la posibilidad de tener que separar una fracción antes de rehidratar el coprolito para realizar dataciones radiocarbónicas, dado que estos son muestras antiguas.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El protocolo presentado brindó resultados positivos para ADN específico de camélidos. Un peso seco entre 50-100 mg fue eficiente para extraer ADN.

Los fragmentos vegetales, silicofitolitos, polen y parásitos se encontraron en buen estado de preservación para los análisis.

Se continuará con el análisis de un mayor número de réplicas para evaluar los resultados de este protocolo en términos de degradación, recuperación y cuantificación de los distintos *proxies* y de la calidad de las observaciones microscópicas.

Se analizará la composición de isótopos estables de carbono y nitrógeno del material retenido en la malla de 250  $\mu\text{m}$ .

La optimización de este protocolo es necesaria para obtener información de los distintos *proxies* incluidos en las heces que podrá ser utilizada como referencia para interpretar los resultados del análisis de coprolitos.

## AGRADECIMIENTOS

A Teresa Civalero, Carlos Aschero, Damián Bozutto. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT Investigador Joven 2017 N° 3239, PICT 2017 N° 0455 “Estudios paleoecológicos de camélidos de Patagonia mediante análisis *multiproxy* de coprolitos del Holoceno”.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amalfitano, G., R. S. Petrih, J. Loos y M. H. Fugassa.  
2017. Ampliación de los estudios parasitológicos en camélidos del sitio arqueológico CCP7, Santa Cruz, Argentina. *Anales del Instituto de Patagonia* 45 (2): 101–108.
- Beck, C. W., V. M. Bryant y K. M. McDonough.  
2019. Evidence for non-random distribution of pollen in human coprolites. *Archaeological and Anthropological Sciences* 11: 5983–5998. <https://doi.org/10.1007/s12520-019-00839-y>
- Beltrame, M. O., N. H. Sardella, M. H. Fugassa y R. Barberena.  
2012. Paleoparasitological analysis of rodent coprolites in Pleistocenic and Holocenic samples from the archaeological site Cueva Huenul 1, Patagonia (Argentina). *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 107 (5): 604–608.
- Benvenuto, M. L., N. J. Velázquez, L. S. Burry y M. L. Osterrieth.  
2018. Análisis de silicofitolitos y polen en coprolitos de *Lama guanicoe*: su potencialidad en estudios paleobotánicos y paleoambientales. En *Actas XVII Simposio Argentino de Paleobotánica y Palinología: rumbo a nuevos desafíos*, M. Quetglas, J. Bodnar y M. Di Pasquo (eds.), Número 18: 98. Entre Ríos.



- Bryant, V. M. Jr.  
1974. Pollen analysis of prehistoric human faeces from Mammoth Cave. En Watson, P. J. (ed.) *Archeology of the mammoth cave area*: 203-209. Academic Press. New York.
- Callen, E. O. y T. W. M. Cameron.  
1960. A prehistory diet revealed in coprolitos. *New Scientist* 90: 35-40.
- Camiolo I., N. J. Velázquez, L. S. Burry y L. Valenzuela.  
2018. Modelo palinológico e isotópico estacional de heces actuales de *Lama guanicoe* del área de la Cueva Grande del Arroyo Feo, Argentina. *Resúmenes de la XXVIII Reunión Argentina de Ecología*, P. Daleo y J. Alberti (eds.): 626. Mar del Plata.
- Codron, D., J. Codron, J. A. Lee-Thorp, M. Sponheimer, D. de Ruiter, J. Sealy, R. Grant y N. Fourie.  
2007. Diets of savanna ungulates from stable carbon isotope composition of faeces. *Journal of Zoology* 273: 21-22.
- Ehleringer, J. R. y T. E. Cerling.  
2001. C3 and C4 photosynthesis. En H. A. Mooney y J. Canadell (eds.) *Encyclopedia of Global Environmental Change*, II: 186-190. John Wiley and Sons. New York
- Fægri, K., Kaland, P. E. y Krzywinski, K.  
1989. *Textbook of Pollen Analysis*. 4th Edition. John Wiley and Sons. Chichester.
- Folk, R. L.  
1954. The distinction between grain size and mineral composition in sedimentary rock nomenclature. *The Journal of Geology* 62: 344-359.
- Fredlund, G. y L.T. Tieszen.  
1994. Modern phytolith assemblages from the North American Great Plains. *Journal of Biogeography* 21: 312-335.
- Fugassa, M. H.  
2006. *Enteroparasitosis en poblaciones cazadoras-recolectoras de Patagonia Austral*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Inédita.
- Fugassa, M. H.  
2007. Camélidos, parásitos y ocupaciones humanas: registros paleoparasitológicos en Cerro Casa de Piedra 7 (Parque Nacional Perito Moreno, Santa Cruz, Argentina). *Intersecciones en Antropología* 8: 265-269.
- Fugassa, M. H. y R. S. Petrih.  
2017. Apex predators, rockshelters, and zoonoses in the Patagonian Holocene. *Journal of Parasitology* 103 (6): 791-794.
- Fugassa, M. H., G. M. Denegri, N. H. Sardella, A. Araujo, R. A. Guichon, P. A. Martinez, M. T. Civalero y C. Aschero.  
2006. Paleoparasitological records in a canid coprolite from Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology* 92 (5): 1110-1113.
- Fugassa, M. H., N. H. Sardella, V. Taglioretti, K. J. Reinhard y A. Araujo.  
2008. Eimeriid oocysts from archaeological samples in Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology* 94: 1418-1420.
- Fugassa, M. H., M. O. Beltrame, M. S. Bayer y N. H. Sardella.  
2009. Zoonotic parasites associated with felines from the Patagonian Holocene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (8): 1177-1180.
- Fugassa, M. H., R. S. Petrih, P. M. Fernandez, M. Carballido Catalayud y C. Belleli.  
2018. Fox parasites in pre-columbian times: Evidence from the past to understand the current helminth assemblages. *Acta Tropica* 185: 380-384.

- Gray, J.  
1965. Techniques in palynology: extraction techniques. En Kummel, B. y D. Raup (eds.). *Handbook of paleontological techniques*: 530-587. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Jouy-Avantin, F., A. Debenath, A. M. Moigne y H. Mone.  
2003. A standardized method for the description and the study of coprolites. *Journal of Archaeological Science* 30 (3): 367-372.
- Horrocks, M., M. D. Jones, R. E. Beever y D. G. Sutton.  
2002. Analysis of plant microfossils in prehistoric coprolites from Harataonga Bay, Great Barrier Island, New Zealand. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 32: 617-628.
- Martinez Tosto, A. C., L. S. Burry, M. O. Arriaga, y M. T. Civalero.  
2016. Archaeobotanical study of Patagonian Holocene coprolites, indicators of diet, cultural practices and space use. *Journal of Archaeological Science. Reports* 10: 204-211. doi:10.1016/j.jasrep.2016.09.017.
- Mc Innis, M. L., M. Vavra y W. C. Kueger.  
1983. A comparison of four methods used to determine the diets of large herbivores. *Journal of Range Manage* 36 (3): 302-306.
- Muñoz, A.  
2008. *Guanaco (Lama guanicoe) browsing on lenga (Nothofagus pumilio) regeneration in Tierra del Fuego*. Tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biológicas, con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Universidad de Chile. Inédita.
- Oliva, G., L. González y P. Rial.  
2001. El ambiente en la Patagonia Austral. En Borrelli, P. y G. Oliva (eds.) *Ganadería ovina sustentable en la Patagonia Austral*: 17-80. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Santa Cruz.
- Pettrigh, R. S. y M. H. Fugassa.  
2017. Improved coprolite identification in Patagonian archaeological contexts. *Quaternary International* 438 (B): 90-93.
- Pettrigh, R. S., J. G. Martínez, M. Mondini y M. H. Fugassa.  
2019. Ancient parasitic DNA reveals *Toxascaris leonina* presence in Final Pleistocene of South America. *Parasitology* 146 (10): 1284-1288.
- Puig, S., F. Videla, S. Monge y V. Roig.  
1996. Seasonal variations in guanaco diet (*Lama guanicoe* Müller 1776) and food availability in Northern Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environment* 34: 215-224.
- Rawlence, N. J., J. R. Wood, H. Bocherens y K. M. Rogers.  
2016. Dietary interpretations for extinct megafauna using coprolites, intestinal contents and stable isotopes: Complimentary or contradictory? *Quaternary Science Reviews* 142: 173-178. doi:10.1016/j.quascirev.2016.05.017
- Reinhard, K. J. y V. M. J. Bryant.  
1992. Coprolite analysis: a biological perspective on archaeology. En Shiffer, M. (ed.) *Advances in Archaeological Method and Theory* 4: 245-288. University of Arizona Press. Tucson.
- Reinhard, K. J. y V. M. J. Bryant.  
2008. Pathoecology and the future of coprolite studies in Bioarchaeology. En Stodder, A. L. W. (ed.) *Reanalysis and reinterpretation in Southwestern bioarchaeology. Arizona State University Anthropological Research Papers* 59: 199-216.

- Reinhard, K., D. R. Danielson, M. Daniels, S. A. Chaves, M. Daniels y D. R. Danielson.  
2002. Multidisciplinary coprolite analysis. En P. Geib y D. Keller (eds.) Bighorn cave: Test excavation of a stratified dry shelter Mohave County, Arizona. *Bilby research center occasional papers* 1: 135-209.
- Rovner, I.  
1971. Potential of opal phytolith for use in paleoecological reconstruction. *Quaternary Research* 1: 343-359.
- Sardella, N. H. y M. H. Fugassa.  
2009. Parásitos como indicadores en arqueología. *Desde la Patagonia, Difundiendo Saberes* 6: 26-31.
- Taglioretti, V., M. H. Fugassa, D. Rindel, N. H. Sardella.  
2017. New parasitological findings for pre-Hispanic camelids. *Parasitology* 144: 1763-1768. doi:10.1017/S0031182017000932
- Velázquez, N. J.  
2016. *Análisis palinológico de coprolitos de mamíferos herbívoros del Holoceno de Patagonia centro-meridional*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Inédita.
- Velázquez, N. J., L. S. Burry, M. H. Fugassa, M. T. Civalero y C. A. Aschero.  
2014. Palynological analysis of camelid coprolites: seasonality in the use of the site Cerro Casa de Piedra 7 (Santa Cruz, Argentina). *Quaternary Science Reviews* 83: 143-156. doi:10.1016/j.quascirev.2013.11.006.
- Velázquez, N. J., L. S. Burry y M. H. Fugassa.  
2015. Palynological analysis of extinct herbivore dung from Patagonia, Argentina. *Quaternary International* 377: 140-147. doi:10.1016/j.quaint.2015.05.012
- Velázquez, N. J., L. S. Burry y M. H. Fugassa.  
2017. A methodology for the determination of pollen sources in studies of Patagonian camelid coprolites. *Journal of Archaeological Science, Reports* 11: 743-749. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.01.007
- Velázquez, N. J., L. S. Burry, M. V. Mancini y M. Fugassa.  
2020. Palynological analysis of the outer parts of camelid coprolites: implications for vegetation reconstruction. *Archaeological and Anthropological Science* 12 (2), 58. 10.1007/s12520-019-00969-3
- Warnock, P. J. y K. J. Reinhard.  
1992. Methods for Extracting Pollen and Parasite Eggs from Latrine Soils. *Journal of Archaeological Science* 19: 261-264.
- Weinstock, J., B. Shapiro, A. Prieto, J. C. Marín, B. A. Gonzalez, M. T. P. Gilbert y E. Willerslev.  
2009. The Late Pleistocene distribution of vicuñas (*Vicugna vicugna*) and the “extinction” of the gracile llama (“*Lama gracilis*”): New molecular data. *Quaternary Science Reviews* 28 (15-16): 1369-1373.
- Weir, G. H. y D. Bonavia.  
1985. Coprolitos y dieta del precerámico tardío de la costa peruana. *Bulletin de l'Institut Francais d' Etudes Andines* 14 (1-2): 85-140.
- Wood, J. R. y J. M. Wilmshurst.  
2016. A protocol for subsampling late quaternary coprolites for multi-proxy analysis. *Quaternary Science Reviews* 138:1-5.