

Arqueoproteómica como complemento de estudios paleopatológicos en restos óseos humanos de la Cueva de Plaza, Chubut, Argentina: alcances y limitaciones

Archaeoproteomics as a complement of paleopathological studies in human skeletal remains of Cueva de Plaza, Chubut, Argentina: scope and limitations

 Ricardo Martín Neme Tauil^{1,2,3} |  Denise Evans^{4,5} |  Paula Miranda De Zela⁶ |  Silvia Moreno^{1,2,3} |  Fabián Crespo⁷ |  Vivian Scheinsohn^{1,3,5*}

1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). **2)** Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM), Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUBICEN). **3)** Universidad de Buenos Aires (UBA). **4)** Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación. **5)** Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano (INAPL). **6)** Banco Nacional de Datos Genéticos (BNDG). **7)** Department of Anthropology, Center of Archaeology and Cultural Heritage, University of Louisville, KY, EEUU

REVISTA ARGENTINA DE ANTROPOLOGÍA BIOLÓGICA

Volumen 25, Número 1
Enero-Junio 2023

Financiamiento: PIP CONICET 2014-2016 N°599, ANPCYT PICT 2016 N°0991 y fondos propios del CEQUIBIEM

*Correspondencia a: Vivian Scheinsohn.
3 de Febrero 1370 (1425) CABA,
Argentina.
E-mail: vscheinsohn@yahoo.com

RECIBIDO: 2 de Mayo de 2022

ACEPTADO: 14 de Octubre de 2022

<https://doi.org/10.24215/18536387e062>

e-ISSN 1853-6387

<https://revistas.unlp.edu.ar/raab>

Entidad Editora
Asociación de Antropología Biológica
Argentina

Resumen

En este trabajo se propone realizar por primera vez en Argentina un análisis proteómico por espectrometría de masas de una falange humana con una alteración macroscópica proveniente de un conjunto arqueológico recuperado en el sitio Cueva de Plaza (Chubut, Argentina). Se presentan dos métodos de extracción de proteínas de restos óseos arqueológicos para ser analizadas con un espectrómetro de masas. Ambos métodos permitieron obtener resultados no excluyentes con información parcialmente redundante y complementaria. Se identificaron proteínas como colágenos, fibronectina, proteínas de cartílago, de hueso, de músculo y de sangre y conjuntos de proteínas asociadas al sistema inmune y a otras vías metabólicas, en menor cantidad. Las proteínas identificadas son consistentes con la existencia de un trauma en proceso de reparación en el elemento óseo analizado. Rev Arg Antrop Biol 25 (1), 2023. <https://doi.org/10.24215/18536387e062>

Palabras Clave: proteómica; bioarqueología; paleopatología; Patagonia

Abstract

In this work a proteomic analysis by mass spectrometry of a human phalanx with a macroscopic alteration found in Cueva de Plaza archaeological site (Chubut, Argentina) is proposed, representing the first time that such analysis has been carried out on archaeological materials in Argentina. Two methods of protein extraction from archaeological bone remains are presented and their results were analyzed with a mass spectrometer. Both methods yielded non-exclusive, partially redundant and complementary results. Collagens, fibronectin, proteins from cartilage, bone, muscle and blood and, to a lesser extent, proteins associated with the immune system and other metabolic pathways were identified. These proteins are consistent with the existence of a healing trauma process in the analyzed bone element. *Rev Arg Antrop Biol* 25 (1), 2023. <https://doi.org/10.24215/18536387e062>

Keywords: proteomics; bioarchaeology; paleopathology; Patagonia

El sitio arqueológico Cueva de Plaza (CdP) está ubicado en el Valle del Genoa, en el oeste de la provincia del Chubut, Argentina (Fig. 1). Se trata de uno de los pocos sitios del área que presenta inhumaciones datadas en tiempos recientes (siglos XVIII y XIX). Dimos con este sitio a raíz de la denuncia de un vecino del área que descubrió la existencia de estos restos y nos manifestó su preocupación por su preservación. Por ello, realizamos un trabajo de rescate que comprendió la recolección de materiales superficiales y la excavación de ocho cuadrículas (4m²). Esta intervención se realizó en virtud del convenio establecido con la Secretaría de Cultura de la Provincia del Chubut por el cual se nos autorizó a desarrollar investigaciones arqueológicas en este sector. Se informó de esta acción y de los resultados a los integrantes de la comunidad



FIGURA 1. Izquierda: mapa de Patagonia Central y su ubicación en el territorio de Argentina. Derecha: Detalle de la ubicación de Cueva de Plaza, a 30km. lineales de la localidad más cercana, José de San Martín.

Mapuche-Tehuelche Valentín Sayhueque de la vecina localidad de Gobernador Costa con quienes se acordarán los pasos futuros. En este trabajo se siguió lo indicado en el *Código Deontológico de la Asociación de Antropología Biológica Argentina para el estudio de poblaciones humanas actuales* y en el *Código de Ética Profesional* de la Asociación de Arqueólogos Profesionales de la República Argentina.

En el sitio se recuperaron restos faunísticos, artefactos líticos, cuentas vítreas y restos óseos humanos. Todos estos materiales fueron encontrados dispersos, mezclados y sin conformar ninguna estructura (Scheinsohn *et al.*, 2022). En el conjunto de restos óseos humanos presentes en el sitio se registraron al menos dos elementos óseos con alteraciones macroscópicas, una de carácter congénito y una compatible con una lesión traumática (Scheinsohn *et al.*, 2022). En este trabajo presentaremos el análisis arqueoproteómico de esta última con el fin de aportar a su diagnóstico diferencial.

Paleoproteómica ósea

La matriz proteica del hueso varía tanto entre taxones como entre individuos de una misma especie. El hueso de los mamíferos es un material compuesto, altamente complejo, de múltiples fases, heterogéneo, viscoelástico y anisotrópico. Se trata de un tejido conjuntivo, mineralizado y estructurado en laminillas en el que coexisten células especializadas en una matriz orgánica y una fase mineral (Currey, 1984; Johnson, 1985; Wheeler *et al.*, 1987). El componente mineral del hueso está formado por calcio, fosfatos y carbonatos fijados a la materia orgánica bajo la forma de microcristales de hidroxiapatita, que rodean las fibras de colágeno (Currey, 1984). La matriz orgánica está formada principalmente por proteínas, en su mayoría colágenos, que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo (Young, 2003). Se encuentran además otras proteínas como proteoglicanos, proteínas con ácido carboxiglutámico, glucoproteínas, proteínas del plasma y factores de crecimiento (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006). La historia de vida de cada individuo y las patologías o lesiones que ha experimentado también suman diversidad respecto de las proteínas que pueden encontrarse en un determinado hueso. Además, intervienen los cambios físicos y químicos que ocurren en los restos óseos luego de la muerte de un individuo (ver p. ej. Lyman, 1994).

Como las proteínas tienen un alto potencial de preservación (Hendy *et al.*, 2018; Sawafuji *et al.*, 2017; Schmidt-Schultz y Schultz, 2004, entre otros) han sido utilizadas para rastrear las historias evolutivas de ciertas especies (Cappellini *et al.*, 2018; Lanigan *et al.*, 2020; Welker *et al.*, 2015, Welker *et al.*, 2020) y para identificar los *taxa* de ciertos especímenes óseos a través de espectrometría de masas (Zooarcheology by Mass Spectrometry, ZooMS) que fue aplicada tanto a instrumentos (McGrath *et al.*, 2019) como a fragmentos óseos arqueológicos (Hill *et al.*, 2015). En el caso de los restos óseos humanos arqueológicos, las proteínas han permitido tanto la identificación de sexo (Buonasera *et al.*, 2020) como el diagnóstico de enfermedades (Bona *et al.*, 2014; Warinner *et al.*, 2014, entre otros).

Así, dado que ciertos estados metabólicos influyen la presencia y distribución de proteínas en restos óseos humanos (Hasegawa e Ishii, 2020) su identificación en muestras arqueológicas permite asociar sus perfiles proteicos con alteraciones óseas observadas macroscópicamente. En el caso que aquí presentamos, consideramos realizar esta determinación en tanto podemos garantizar que la colección de restos óseos

humanos del sitio Cueva de Plaza (CdP) no presenta contaminantes atribuibles a su manejo museológico (Hendy *et al.*, 2018). Asimismo, la datación de la que se dispone (225 ± 33 años AP -AA113831, realizada sobre una primera falange proximal de la mano de un individuo adulto, Scheinsohn *et al.* 2022), la asociación de los restos óseos con materiales modernos (como cuentas vítreas) y la presencia de materiales que normalmente no se conservan en estos contextos (como fragmentos de cuero, restos de caña colihue o partes blandas adheridas a los huesos ver Scheinsohn *et al.*, 2022), indican que estos restos se depositaron a fines del siglo XVIII o principios del XIX, por lo que se puede suponer, en principio, una preservación ósea que permitiría obtener un perfil proteico y correlacionarlo con lesiones óseas visibles macroscópicamente. Para este trabajo, decidimos analizar una falange humana, que presentaba alteraciones atribuibles a una fractura traumática (Appleby *et al.*, 2015; Mays, 2018), ya que en este caso, la respuesta inflamatoria que ocurre desencadena la producción local de proteínas (Bue *et al.*, 2020, Epsley *et al.*, 2021). Así, el perfil proteico de esta muestra puede ser contrastado con las proteínas esperables a partir de esa condición y de esta forma complementar el diagnóstico diferencial efectuado por medios tradicionales (Scheinsohn *et al.*, 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del contexto y de la muestra

El conjunto óseo de Cueva de Plaza exhibe una representación diferencial de restos en donde predominan elementos de tamaño pequeño, como falanges, costillas y vértebras, y los cráneos enteros están ausentes: sólo se recuperaron algunos fragmentos de bóveda craneana, una mandíbula entera y un fragmento de maxilar (ver en Scheinsohn *et al.*, 2022). Se identificó un número mínimo de 9 individuos que se distribuyen en un perfil etario con predominio de subadultos (N=7; 77,8% del total distribuidos entre un individuo de 6-14,5 años, dos de 7-9 años, uno de 13-14,5 años, uno de 13-15,5 años, uno >16 años y uno entre 2-6 años). Los individuos adultos son jóvenes (N=2), dentro del rango de 20-35 años. No se pudo determinar sexo en ninguno de los individuos debido a la ausencia de elementos diagnósticos. A nivel general se detectaron bajas frecuencias de indicadores de estrés metabólico-sistémico, ausencia de caries, desgaste y cálculo dental en niveles leves/moderados y ausencia de evidencias macroscópicas de enfermedades crónicas o infecciosas (Scheinsohn *et al.*, 2022).

La falange seleccionada para el análisis arqueoproteómico corresponde al pie de un individuo subadulto de 4-13 años con una alteración en el sector distal (área articular y borde lateral). Presenta una ausencia focal de un 10% de la pieza en la epífisis proximal, a la izquierda del área articular y la zona inmediatamente inferior (Fig. 2). La lesión exhibe bordes definidos, sin presencia de espículas, fisuras o astillas de hueso cortical o exposición de tejido esponjoso. El borde correspondiente a la cara plantar se observa más definido que el borde de la vista posterior. En el área afectada por la lesión se observa formación de hueso nuevo por lo cual se trataría de una lesión activa al momento del deceso, pero no presenta signos de formación de callos óseos o remodelación. No se evidencia presencia de cloaca ni de invasión en la cavidad de la médula por lo que no se habría originado allí. La reacción de tipo perióstica en la superficie del hueso permite considerarla como *antemortem*. Sobre esta base, se

propuso atribuir esta alteración a una fractura, producto de un traumatismo directo o indirecto, originado probablemente de manera accidental por aplastamiento o por fuerza axial.

Análisis arqueoproteómico

Se tomaron dos muestras del elemento óseo, una en la zona lesionada y la otra en un área próxima (CDP01 y CDP02 respectivamente, ver Fig. 2). Se tomaron en consideración dos controles: uno que evalúe factores diagenéticos implicados en el tiempo de depositación (CDP03) y otro que considere diferencias de preservación entre muestras del mismo sitio (CDP04). CDP03 es una falange primera del pie de una muestra osteológica subactual de *Homo sapiens* de la colección del INAPL (control diagenético) y CDP04 se obtuvo de un quinto metatarsiano de un adulto procedente del mismo conjunto óseo de CdP. En este último caso se seleccionó un adulto para garantizar que no se trata del mismo individuo que el de CDP01 y CDP02 (que es un subadulto) y, ante la ausencia de falanges, se optó por un metatarsiano para mantener la misma porción anatómica.

Para la identificación de proteínas en la muestra se eligió una estrategia de tipo

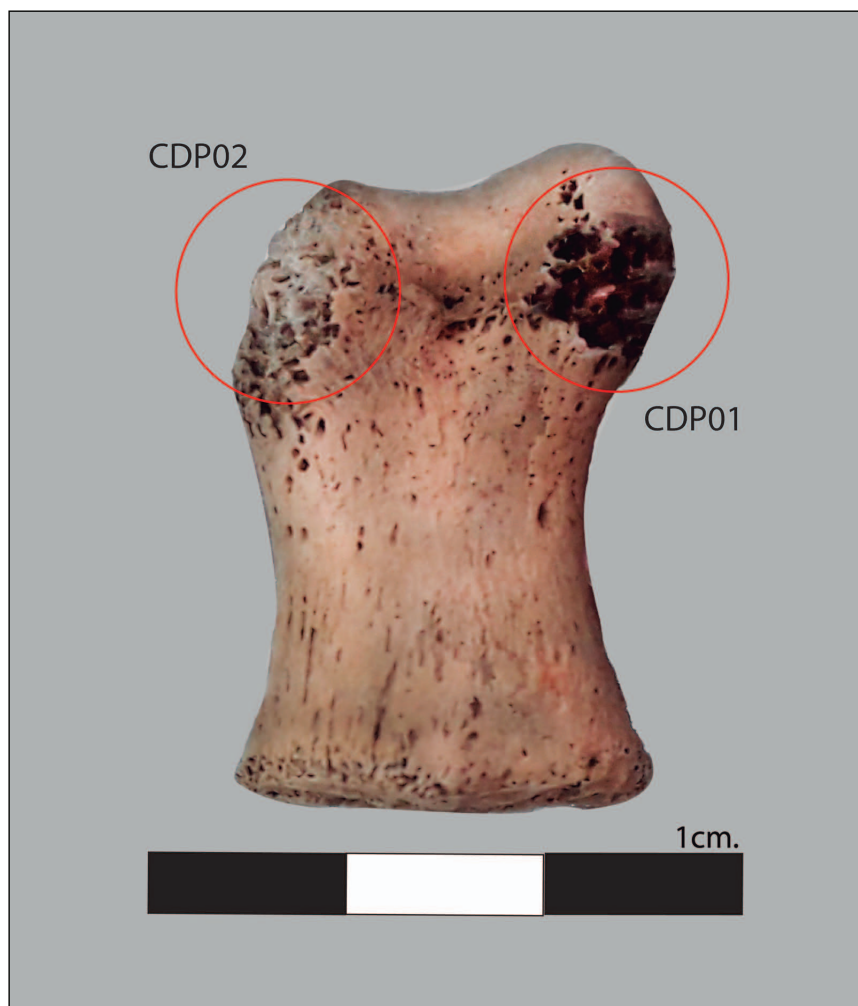


FIGURA 2. Primera falange proximal del pie de uno de los individuos subadultos. El círculo de la izquierda señala el sitio de toma de muestra de CDP02, mientras que el de la derecha corresponde a CDP01.

shotgun (Alves *et al.*, 2007; Nesvizhski, 2007) que apunta a la identificación de la mayor cantidad de proteínas posibles en una mezcla compleja. Este método consiste en la digestión de las proteínas con tripsina, la separación de los péptidos por nano HPLC, y su posterior análisis *on line* en el espectrómetro de masas ESI-Orbitrap por fragmentación MSMS. Los espectros de fragmentación en tándem (MSMS) permiten su identificación por comparación contra determinadas bases de datos y posterior inferencia de las proteínas que dieron origen a los mismos. Las muestras fueron procesadas bajo dos protocolos de extracción diferentes para evaluar su efectividad relativa dado el carácter exploratorio de este trabajo (HCl y Mix, ver [Información Suplementaria, Sección S1](#)). Los datos crudos del análisis de espectrometría de masas fueron procesados con el *software* Proteome Discoverer, versión 2.1.1.21 y versión 2.2.0.388 (Thermo Scientific) para la identificación de proteínas en bases de datos con el algoritmo de búsqueda SEQUEST. Las búsquedas se realizaron contra la base de datos de Uniprot de *Homo sapiens* (UP000005640, versión de diciembre de 2019) digerida *in silico* con tripsina. También se realizaron otras búsquedas contra bases de datos de Uniprot correspondientes a mamíferos y a posibles patógenos humanos. Esta forma de búsqueda permite descartar los contaminantes del entorno, como proteínas del sedimento o microbiota asociada para que no afecten el resultado (ver también [Tabla Suplementaria S1](#)). La tolerancia de masa del precursor se estableció en 10 ppm y la de los fragmentos derivados en 0,05 Da. Se estableció como modificación fija la carbamidometilación de cisteínas, como dinámicas la oxidación de metioninas y de prolinas, y la deamidación de arginina como modificación postraduccional diagenética más abundante. Las proteínas reportadas corresponden a aquellas identificadas con péptidos de alta confianza, tomando en consideración una tasa máxima de falsos positivos del 1% calculada mediante el empleo de una estrategia de base de datos inversa.

Generación de datos para el análisis proteómico. Se realizaron modificaciones en las búsquedas que normalmente se hacen sobre muestras modernas, en vista de que no se esperaba obtener el mismo número de proteínas y considerando que se trata de muestras vecinas a tejido muscular y cartilaginoso (Colgrave *et al.*, 2019) y parcialmente degradadas por el paso del tiempo (Leo *et al.*, 2011). El criterio frecuentemente consensuado en la literatura, y que se utilizó en este trabajo, fue tomar como mínimo dos péptidos de alta confianza para identificar a una proteína (*hit*). En aquellos casos en donde el resultado se sostenía con un único péptido de alta confianza se hizo una detallada inspección manual de los espectros de MSMS para evaluar su calidad; en caso de tener una serie de fragmentos de alta calidad, la identificación fue considerada válida. Para evitar contaminantes modernos, se tomó la decisión de dejar de lado las queratinas y la dermicidina debido a que al estar presentes en la piel y en el cabello humanos (Hodges y Raines, 2003) su presencia suele considerarse como contaminante (para más detalles ver [Información Suplementaria, Sección S1](#)).

Herramientas bioinformáticas

El análisis arqueoproteómico en hueso refleja solo una pequeña fracción de la totalidad de los procesos metabólicos que tuvieron lugar en las lesiones. Las herramientas bioinformáticas permiten reconstruir esos pasajes metabólicos a partir de listados incompletos de proteínas. Para ello se utilizó el Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER, versión 17.0 disponible en <http://pantherdb.org/>; Thomas *et al.*, 2022), base de datos curada de familias de genes y proteínas y de sus subfamilias

relacionadas por su función. De acceso libre en línea y de amplio uso en bioinformática, forma parte del *Gene Ontology Reference Genome Project*. Para este caso, de sus múltiples posibilidades, se utilizaron las listas de proteínas de cada muestra (sumando los dos protocolos) bajo las categorías *protein class* y *pathways*, a partir de las cuales se obtuvieron, para cada listado, sugerencias sobre los procesos biológicos en los que podrían haber estado involucradas, así como las vías en las que se insertan (Mi y Thomas, 2009). También se utilizó Reactome (<https://reactome.org>), base de datos de vías biológicas que contiene múltiples referencias cruzadas con otras bases de datos (Fabregat *et al.*, 2018; Sidiropoulos *et al.*, 2017) y que proporciona detalles moleculares de la transducción de señales de vías metabólicas y otros procesos celulares, en forma de una red ordenada de transformaciones moleculares. Esta herramienta permite reconstruir las rutas metabólicas sin tener todos los componentes, con la ventaja de contar con una representación gráfica. Cada conjunto de reacciones forma un reactoma propio de cada especie; para este caso se utilizó el de *Homo sapiens*.

RESULTADOS

Análisis arqueoproteómico

Como se detalló previamente, se partió del diagnóstico de la alteración presente en la falange como una fractura en proceso de reparación. En la [Información Suplementaria, Sección S2](#) se propone, a partir de la bibliografía, una revisión de lo que sucede a nivel molecular y celular ante una fractura, para identificar las proteínas intervinientes. Sin embargo, hay que destacar que esta lesión no habría llegado a completar el proceso de reparación.

Análisis de datos. La [Tabla 1](#) muestra la distribución de las proteínas colágenas y no colágenas obtenidas por los dos métodos practicados (HCl y Mix) para cada una de las cuatro muestras. El índice emPAI% es una estimación de la abundancia relativa de una proteína en una mezcla compleja. Esta estimación tiene en cuenta el número de péptidos identificados para cada proteína respecto al número de péptidos teóricos que podrían haberse identificado bajo las mismas condiciones de búsqueda (Ishihama *et al.*, 2005). Se observa que los colágenos representan entre el 83 y 99% de las proteínas identificadas mientras que, una vez eliminadas queratinas y dermicidina, las proteínas no colágenas (PNC en adelante) representan alrededor del 1 o 2%. La preponderancia de los colágenos se explica por el tipo de tejido analizado; sin embargo, la sensibilidad analítica de los procedimientos permite trabajar con estos pequeños porcentajes de PNC. Las muestras CDP02 con Mix y la CDP03 con HCl no arrojaron resultados significativos, probablemente por pérdida de las mismas en alguna etapa del procesamiento ([Tabla 1](#)).

Ambos métodos, con las excepciones mencionadas, fueron capaces de extraer proteínas. La [Tabla 2](#) muestra el listado de PNC y colágenos que obtuvimos en la muestra CDP01. El método de HCl arrojó 27 PNC y el de Mix, 31 ([Tabla 1](#)). Ambos métodos identificaron 13 PNC en común, entre ellas fibronectina, proteínas de cartílago, de hueso, de músculo y de sangre. Por el método HCl se pudieron identificar 14 PNC no identificadas por el método Mix. A la inversa con el método Mix se identificaron 18 PNC que no se encontraron con el HCl. Así, los métodos funcionaron de manera complementaria en términos de poder determinar la mayor cantidad de proteínas. Las tablas correspondientes a las otras muestras se encuentran como [Tabla Suplementaria S2](#) y

TABLA 1. Resultados agrupados para las cuatro muestras separados por cada método

Muestra	Método HCl		Método Mix	
	Colágenos	PNCs	Colágenos	PNCs
#1 emPAI%	97,5	0,6	85	1,6
#1 Hits	16	27	14	31
#1 Hits %	31%	52%	24%	53%
#2 emPAI%	83	1,7	Nd	Nd
#2 Hits	9	20	Nd	Nd
#2 Hits %	20%	45%	Nd	Nd
#3 emPAI%	Nd	Nd	99	0,4
#3 Hits	Nd	Nd	12	25
#3 Hits %	Nd	Nd	25%	52%
#4 emPAI%	97	2,3	95	0,5
#4 Hits	5	7	8	10
#4 Hits %	38%	54%	30%	37%

No se muestran queratinas y dermicidina (contaminantes). emPAI% refiere a una medida de la abundancia relativa de cada proteína en las muestras (véase la explicación en el texto). "Hit" refiere a cada proteína identificada. Todas las búsquedas con las que está elaborada esta planilla se hicieron en batch, *versus Homo sapiens* (diciembre 2019), con tripsina full, con O en prolina como modificación variable, deamidación de asparaginas y glutaminas, con un péptido de alta confianza como mínimo. Nd: datos no disponibles.

puede observarse algo similar a lo que se describe aquí. Las tablas con los péptidos que justifican cada identificación se encuentran en la [Tabla Suplementaria S3](#).

Al comparar el total de proteínas colágenas y PNC obtenidas por ambos procedimientos ([Tabla Suplementaria S4](#)) se puede observar un conjunto de proteínas común a las distintas muestras (en su mayoría relacionadas con el hecho de que se está analizando hueso humano) y proteínas específicas a cada muestra. Las dos PNC que se repiten en las cuatro muestras son la subunidad beta de la ATP sintasa mitocondrial (proteína del metabolismo basal) y el biglicano. Luego, presentes en tres muestras (CDP01, CDP02 y CDP03), están la subunidad alfa de la ATP sintasa mitocondrial, el factor derivado del epitelio pigmentario, la dermopontina y la vitronectina. Las muestras que más proteínas comparten son la CDP01 y la CDP03 con 10, seguidas por CDP01 y CDP02 y por CDP02 y CDP03 con 9 y CDP02 y CDP04 que comparten 4.

A pesar de no hallar un patrón claro de distribución de proteínas en las muestras, la hipótesis original de considerar la lesión como traumática se ve apoyada por la presencia de fibronectina en CDP01 y reforzado en algún grado por la presencia de protrombina, aunque ésta también está presente en las otras muestras. Ambas proteínas están asociadas a lo que sucede a nivel molecular y celular ante una fractura y su reparación ([Información Suplementaria, Sección S2](#)).

Herramientas bioinformáticas: PANTHER y Reactome. El análisis de datos con PANTHER muestra diferencias al incluir o excluir los colágenos ([Tabla 3](#)). De los seis criterios que ofrece PANTHER para agrupar las proteínas seleccionamos dos de nuestro interés (Clases de Proteínas y Vías de Señalización) que indicamos en esta tabla.

TABLA 2. Listas de proteínas no colágenas y colágenos obtenidos con los dos métodos de extracción para la muestra CDP01

Identificador	Método HCl	
	Nombre	emPAI%
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	65,6140
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	30,5584
P02458	Collagen alpha-1(II) chain	1,1059
Q07507	Dermatopontin	0,1465
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	0,0858
O15335	Chondroadherin	0,0735
P08493	Matrix Gla protein	0,0625
Q99983	Osteomodulin	0,0500
P00734	Prothrombin	0,0416
P05997	Collagen alpha-2(V) chain	0,0384
P36955	Pigment epithelium-derived factor	0,0357
C9JB04	WAS/WASL-interacting protein 1	0,0312
Q14055	Collagen alpha-2(IX) chain	0,0262
P20908	Collagen alpha-1(V) chain	0,0214
P51884	Lumican	0,0166
P35713	Transcription factor SOX-18	0,0145
P20849	Collagen alpha-1(IX) chain	0,0138
A0A0A0MT20	EMILIN-1 (Fragment)	0,0138
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0,0138
Q15063	Periostin	0,0112
P04004	Vitronectin OX=9606 GN=VTN PE=1 SV=1	0,0112
P07996	Thrombospondin-1	0,0108
Q9NRN5	Olfactomedin-like protein 3	0,0108
E7END6	Vitamin K-dependent protein C	0,0103
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	0,0092
H0YMF1	Aggrecan core protein	0,0089
G3V2W1	Protein Z-dependent protease inhibitor	0,0082
P02748	Complement component C9	0,0082
P00740	Coagulation factor IX	0,0082
K7EPJ4	Cartilage intermediate layer protein 2	0,0075
P12107	Collagen alpha-1(XI) chain	0,0072
P02751	Fibronectin OX=9606	0,0068
P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	0,0068
P02768	Albumin	0,0060
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	0,0041
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	0,0041
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	0,0040
Q8NFW1	Collagen alpha-1(XXII) chain	0,0027
P25940	Collagen alpha-3(V) chain	0,0026
A7KAX9	Rho GTPase-activating protein 32	0,0022
P24821	Tenascin	0,0021
Q02388	Collagen alpha-1(VII) chain	0,0014
P15924	Desmoplakin	0,0012

Se destacan en negrita las 26 proteínas identificadas por ambos métodos. Los nombres de las proteínas se mantienen en inglés tal cual se encuentran en la base de datos de Uniprot, asociadas a sus respectivos identificadores. No se incluyen contaminantes.

TABLA 2. Continuación

Identificador	Método Mix	
	Nombre	emPAI%
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	54,9089
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	26,6250
P02458	Collagen alpha-1(II) chain	3,1099
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	0,3479
P62805	Histone H4	0,3192
P21810	Biglycan	0,1142
A6NCN2	Putative keratin-87 protein	0,1142
O15335	Chondroadherin	0,1021
Q07507	Dermatopontin	0,0924
P06702	Protein S100-A9	0,0924
P00734	Prothrombin	0,0833
C9JB04	WAS/WASL-interacting protein 1	0,0808
P61626	Lysozyme C	0,0644
P05997	Collagen alpha-2(V) chain	0,0542
Q14050	Collagen alpha-3(IX) chain	0,0523
Q14055	Collagen alpha-2(IX) chain	0,0495
P20849	Collagen alpha-1(IX) chain	0,0484
P09486	SPARC	0,0459
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	0,0443
P78381	UDP-galactose translocator	0,0429
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0,0368
P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	0,0368
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0,0357
P60709	Actin, cytoplasmic 1	0,0290
Q14240	Eukaryotic initiation factor 4A-II	0,0279
P02751	Fibronectin	0,0238
O15232	Matrilin-3	0,0221
P02748	Complement component C9	0,0213
Q9UEW3	Macrophage receptor MARCO	0,0207
P20908	Collagen alpha-1(V) chain	0,0196
P07996	Thrombospondin-1	0,0183
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	0,0169
P01042	Kininogen-1	0,0169
Q15063	Periostin	0,0141
A0A0C4DFS1	COL11A2	0,0127
Q08554	Desmocollin-1	0,0127
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	0,0116
H0YMF1	Aggrecan core protein	0,0111
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	0,0105
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	0,0105
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	0,0102
K7EPJ4	Cartilage intermediate layer protein 2	0,0094
P24821	Tenascin	0,0055
Q02388	Collagen alpha-1(VII) chain	0,0036
Q5FWF4	DNA annealing helicase and endonuclease ZRANB3	0,0000

Se destacan en negrita las 26 proteínas identificadas por ambos métodos. Los nombres de las proteínas se mantienen en inglés tal cual se encuentran en la base de datos de Uniprot, asociadas a sus respectivos identificadores. No se incluyen contaminantes.

TABLA 3. Funciones y vías metabólicas de las proteínas halladas con *PANTHER*. Se indican las categorías mayoritarias y relevantes para este estudio

	CDP01 (%)	CDP01 solo PNC (%)	CDP02 (%)	CDP02 solo PNC (%)	CDP03 (%)	CDP03 solo PNC (%)	CDP04 (%)	CDP04 solo PNC (%)
Clase de Proteína	Matriz extracelular	44,90	15,60	45,88	13,30	39,30	42,10	0,00
	Adhesión celular	10,20	15,60	4,20	6,70	3,60	0,00	0,00
	Síntesis de ATP	5,00	10,00	8,30	13,30	4,30	15,40	33,30
	Alzheimer	2,50	5,00	4,20	6,70	4,30	0,00	0,00
	Apoptosis	2,50	5,00	8,30	13,30	0,00	7,70	16,70
	Cascada de coagulación	7,50	15,00	4,20	6,70	13,00	7,70	16,70
	Cadherina	2,50	5,00	4,20	6,70	4,30	0,00	0,00
	Regulación del citoesqueleto por GTPasa (Rho)	2,50	5,00	4,20	6,70	4,30	0,00	0,00
	Huntington	2,50	5,00	4,20	6,70	4,30	0,00	0,00
	Inflamación mediada por citoquinas y quemoquinas	15,00	5,00	8,30	6,70	13,00	8,30	7,70
Vías de señalización	Señalización de integrina	42,50	10,00	37,50	6,70	43,50	46,20	0,00
	Parkinson	2,50	5,00	12,50	20,00	0,00	7,70	16,70
	Vía de p53	2,50	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Vía de TGFbeta	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,70	16,70

Si se toman en cuenta los colágenos, entre 39,30% y 45,88% de las proteínas halladas en todas las muestras corresponden a la matriz extracelular, lo que es coherente con el tipo de tejido que analizamos. Las proteínas de la vía de la coagulación se mantuvieron por debajo del 10%, salvo en CDP03 en donde representa un porcentaje un poco mayor. De todas maneras, la vía predominante en todos los casos, alrededor de un 40%, es la de la señalización por integrina, una superfamilia de glucoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular. Al comparar los resultados totales con aquellos limitados a proteínas no colágenas en las cuatro muestras queda claro que los colágenos aparecen involucrados en una gran variedad de funciones más allá de las típicamente estructurales. La matriz extracelular no es un tejido inerte y, en ella, la familia de los colágenos tiene diferentes funciones (Csapo *et al.*, 2020, Ricard-Blum, 2011). En este caso participa, además, en la cascada de coagulación y en la regulación de la inflamación.

Poniendo el foco en las muestras asociadas a la lesión, CDP01 tiene un 15% de *hits* correspondientes a la vía de inflamación mediada por citoquinas y quemoquinas a diferencia de CDP02, donde esta vía está menos activa y donde la vía de la apoptosis tiene más peso relativo. Las proteínas que apoyan cada una de estas vías, según PANTHER, están en la [Tabla 4](#).

En cuanto a los controles, fueron diseñados principalmente para evaluar la calidad de los métodos ante factores diagenéticos diferenciales. Por lo tanto, no serían relevantes para este análisis en tanto desconocemos la historia de vida y causa de muerte de los individuos de los cuales proceden. Sin embargo, notamos que en CDP03 la vía de las citoquinas y quemoquinas se presenta en una proporción similar que en CDP01 y en la muestra CDP04 destaca el aumento en el peso relativo de la vía de síntesis de ATP.

Las diferencias entre las vías activadas en cada muestra se tornan algo más evidentes si miramos exclusivamente a las PNC. En CDP01 y CDP02 las proteínas de matriz extracelular no colágenas tienen un peso relativo en torno al 15%. En CDP01, en porcentajes similares están las proteínas de adhesión celular. Es notorio que en CDP03 y CDP04, a diferencia de CDP01 y CDP02, no se presentan PNC de matriz extracelular.

Reactome en modo *Reacfoam* permite una visualización rápida y general de los grupos de proteínas en función de las vías biológicas en las cuales están involucradas ([Fig. Suplementaria S1](#)). De todas las muestras es destacable que en CDP02 se sugiere la activación y agregación de plaquetas, asociadas a una degranulación de neutrófilos y a la activación de la vía del complemento, hecho que podría estar vinculado a la proximidad de un trauma, como se propuso más arriba, coherente a su vez con el incremento de la respiración en los eritrocitos. El reclutamiento de neutrófilos y su acción en la inflamación que sigue al trauma es fundamental para gatillar las respuestas -quimioquinesis, fagocitosis, liberación de quimioquinas, estallido respiratorio y otras- que conducen tanto a la regeneración ósea como a la reparación de otros tejidos adyacentes (Kovtun *et al.*, 2018, Kovtun *et al.*, 2016). Las cascadas de complemento y de coagulación, cuyas señales se afectan y amplifican mutuamente, son mediadores centrales en la respuesta aguda al daño tisular (Satyam *et al.*, 2019). La degranulación de neutrófilos y la inflamación mediada por quimoquinas y citoquinas también se presentan en CDP03, pero como se trata de un control que hace a factores diagenéticos, estos resultados (que pueden relacionarse con la historia de vida y causa de muerte del individuo en cuestión, ambas desconocidas) no son relevantes a los fines de este trabajo.

TABLA 4. Detalle de las proteínas implicadas en las vías de señalización seleccionadas de la Tabla 3 como las mayoritarias y relevantes para CDP01 y CDP02

		CDP01		CDP02
Vía de señalización de la integrina	Colágenos	P05997, P12111, P02452, P02458, P20908, Q14055, P12109, Q14050, P12110, Q99715, P12107, P25940, P20849, P08123, P02461	Colágenos	P05997, P02452, P02458, P20908, P25940, P20849, P08123, P02461
	Fibronectina	P02751	POTE	A5A3E0
	Actina citoplasmática	P60709		
Vía de señalización de inflamación mediada por quimocinas y citoquinas	Colágenos	P12111, P02452, P12109, P12110, Q99715	Colágeno	P02452
	Actina citoplasmática	P60709	POTE	A5A3E0
Cascada de coagulación	Protrombina	P00734		
	Quininógeno	P01042		
	Factor de coagulación IX	P00740		
Apoptosis			<i>Heat-shock</i>	P11142, P17066

DISCUSIÓN

Los dos protocolos de extracción seguidos en este trabajo nos permitieron obtener una cierta cantidad de proteínas a partir de las muestras, pero es difícil evaluar su eficiencia relativa. Por un lado, la serie de intercambios bioestratinómicos y diagénéticos que sufrió el elemento óseo bajo análisis, con el entorno y la matriz en la que fue depositado, lleva a esperar una menor cantidad de proteínas de las que se podrían obtener en un contexto *perimortem*. Pero por otro lado cada sitio arqueológico tiene una historia tafonómica particular por lo que es difícil saber cuántas proteínas esperar de una muestra ósea como para evaluar las obtenidas en este trabajo. A modo de ejemplo, Sawafuji *et al.* (2017) presentaron entre 127 y 175 proteínas por muestra, cada una de ellas obtenida de 8 costillas de sendos individuos procedentes de un cementerio japonés fechado entre 1657-1683. Pero ese trabajo presenta diferencias metodológicas con el nuestro. También los contextos de procedencia son muy distintos, por lo que los factores diagenéticos intervinientes pudieron afectar diferencialmente a las proteínas (Procopio *et al.*, 2018). También son diferentes los contextos culturales en el cual transcurrieron las historias de vida y los procesos de salud y enfermedad de cada individuo. Además, es sabido que existen diferencias en cuanto a presencia de proteínas entre los distintos elementos óseos bajo análisis en un mismo individuo (Mickleburgh *et al.*, 2021 señalaron, por ejemplo,

diferencias entre la cresta ilíaca y la tibia humana) y también podrían existir diferencias relacionadas con la parte del elemento (distal, proximal, etc.) considerada para la extracción. Todas estas variables deberán ser consideradas a futuro antes de poder avanzar una conclusión respecto de la eficiencia de los dos protocolos empleados.

Otro factor a considerar son los controles llevados a cabo en este trabajo. CDP04 (control diagenético) presenta un panorama diferencial respecto de CDP01 y CDP02, como esperábamos, pero no es posible evaluar si esas diferencias solo se explican por estar estos huesos en distintos sectores del sitio o hay otros factores implicados ya que se trata de un individuo correspondiente a un grupo etario distinto. Un caso similar ocurre con CDP03 que presenta menos proteínas de las esperables en una situación subactual pero esto podría deberse a la historia de vida de este individuo, que desconocemos, como a la historia formacional del contexto en donde fue obtenido, que también es desconocida. Todo nos lleva a pensar, entonces, en qué debemos precisar e incrementar la variabilidad de controles en trabajos futuros.

Ahora bien, en lo que hace a la evaluación del diagnóstico de fractura para la lesión presente en el elemento óseo analizado, los resultados obtenidos permiten apoyar dicha hipótesis. Esto surge a partir de la diátesis inflamatoria de CDP01, que está muy exacerbada respecto de la contraparte sin lesión y la importancia de la apoptosis en CDP02. En este último caso, como fue observado en ciertos mecanismos de defensa contra patógenos y en procesos inflamatorios en hueso (Behar, 2011; Liu y Pope, 2003) las proteínas asociadas a la apoptosis encontradas en la muestra adyacente a la lesión, obedecerían a mecanismos celulares para evitar la expansión de la lesión o el proceso inflamatorio asociado. Finalmente, los resultados de *Reactome*, al reagrupar los procesos metabólicos de otra manera, destacan la degranulación de neutrófilos en CDP02, lo que la vincularía con la regeneración tisular.

CONCLUSIONES

En este trabajo exploratorio se desarrollaron, por primera vez en Argentina, dos métodos de extracción de proteínas de restos óseos arqueológicos para ser analizadas por espectrometría de masas (nHPLC-ESI-Orbitrap) que demostraron ser efectivos. Ambos métodos permitieron obtener resultados no excluyentes entre sí, en tanto arrojaron información parcialmente redundante y complementaria. Se identificaron proteínas tales como colágenos, fibronectina, proteínas de cartílago, de hueso, de músculo y de sangre, todas coherentes con el tipo de muestra. En menor cantidad fueron identificados otros conjuntos de proteínas asociadas al sistema inmune y a otras vías metabólicas. No se obtuvieron resultados que permitieran afirmar la presencia de algún patógeno en las muestras.

Las herramientas bioinformáticas utilizadas, PANTHER y *Reactome*, permitieron proponer de manera preliminar, en tanto nuestro N es pequeño, algunas hipótesis en torno al estado metabólico del individuo muestreado lo cual refuerza la utilidad del análisis proteómico para apoyar el diagnóstico diferencial de alteraciones óseas. Respecto de la comparación entre el análisis paleopatológico y el arqueoproteómico, las proteínas encontradas en CDP01 y CDP02 son consistentes con la existencia de un trauma en proceso de reparación, mientras que las ausencias se explicarían por la degradación sufrida por tratarse de muestras arqueológicas. De los resultados en CDP02 surge que podría existir un gradiente de proteínas asociadas a estrés o inflamación en zonas próximas a la lesión. En muestreos futuros la estrategia será tomar muestras en puntos múltiples cada vez más

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Horacio Plaza, al Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano (INAPL) y a la Secretaría de Cultura de la Provincia de Chubut. A Florencia Gordón y Tyler O'Brien por responder tan amablemente a las consultas realizadas. A Mariana Selva por ayudarnos con el diagnóstico de trauma.

alejados de la lesión como para someter a prueba esta hipótesis. Para mejorar las posibilidades diagnósticas, consideramos a futuro hacer estudios de simple ciego, en donde la persona que haga los análisis arqueoproteómicos solo identifique patologías a través del perfil de proteínas desconociendo cuáles son las muestras problema y las muestras control.

Así proponemos re muestrear los elementos óseos aquí analizados incluyendo nuevos criterios de toma de muestras, además de incrementar la cantidad de controles e incluir muestras de otros sitios arqueológicos con condiciones diferentes. Uno de los elementos centrales de estos futuros análisis será la normalización de la cantidad de proteínas, cuya masa se estimará con geles de poliacrilamida. Además, para poder evaluar la efectividad de los protocolos de extracción implementados será necesario pesar las muestras obtenidas. Este factor también llevó a la falta de definición de los controles. Por otro lado, los controles también debieran ser elegidos reduciendo a un mínimo los factores desconocidos, lo cual implica poder determinar situaciones excepcionales a nivel diagenético, en donde todos los factores intervinientes sean conocidos o tener que trabajar directamente con muestras subactuales o actuales. Se contempla además ampliar la toma de muestras para controlar variaciones dentro de un mismo elemento óseo y entre distintos huesos. Con estos nuevos controles y la puesta a punto de esta metodología, se considera que estos nuevos análisis arqueoproteómicos permitirán expandir y completar el estudio de patologías que fueron determinadas macroscópicamente para llegar a un diagnóstico más preciso a través de líneas de evidencia múltiples.

LITERATURA CITADA

- Alves, P., Arnold, R. J., Novotny, M. V., Radivojac, P., Reilly, J. P., y Tang, H. (2007). Advancement in protein inference from shotgun proteomics using peptide detectability. *Pacific Symposium of Biocomputing*, 409-420. https://doi.org/10.1142/9789812772435_0039
- Appleby, J., Thomas, R., y Buikstra, J. (2015). Increasing confidence in paleopathological diagnosis—Application of the Istanbul terminological framework. *International Journal of Paleopathology*, 8, 19-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2014.07.003>
- Behar, S. M., Martin, C. J., Booty, M. G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H. X., Divangahi, M., y Remold, H. G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal immunology*, 4(3), 279-287. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.3>
- Bona, A., Papai, Z., Maasz, G., Toth, G. A., Jambor, E., Schmidt, J., Toth, C., Farkas, C., y Mark, L. (2014). Mass Spectrometric Identification of Ancient Proteins as Potential Molecular Biomarkers for a 2000-Year-Old Osteogenic Sarcoma. *Plos One* 9(1), e87215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087215>
- Bue, M., Bergholt, N., Kruse Jensen, L., Jensen, H., Søballe, H., Stilling, M., y Hanberg, P. (2020) Inflammatory proteins in infected bone tissue – An explorative porcine study, *Bone Reports*, 13, 100292. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2020.100292>
- Buonasera, T., Eerkens, J., de Flamingh, A., Engbring, L., Yip, J., Li, H., Haas, R., DiGiuseppe, D., Grant, D., Salemi, M., Nijmeh, C., Arellano, M., Leventhal, A., Phinney, B., Byrd, B., Malhi, R., y Parker, G. (2020). A comparison of proteomic, genomic, and osteological methods of archaeological sex estimation. *Scientific reports*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68550-w>
- Cappellini, E., Prohaska, A., Racimo, F., Welker, F., Pedersen, W., Allentoft, E., Damgaard, P., Gutenbrunner, P., Dunne, J., Hammann, S., Roffet-Salque, M., Ilardo, M., J. Moreno-Mayar, V., Wang, Y., Sikora, M., Vinner, L., Cox, J., Evershed, R., y Willerslev, E. (2018). Ancient biomolecules and evolutionary inference. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 1029-1060. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012002>

- Colgrave, M. L., Allingham, P. G., Tyrrell, K., y Jones, A. (2019). Multiple Reaction Monitoring for the Accurate Quantification of Amino Acids: Using Hydroxyproline to Estimate Collagen Content. *Molecular Biology*, 2030, 33-45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-445-2_23
- Currey, J. D. (1984). *The Mechanical Adaptation of Bone*. Princeton: University Press.
- Csapo, R., Gumpfenberger, M., y Wessner, B. (2020). Skeletal Muscle Extracellular Matrix - What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Frontiers in physiology*, 11, 253, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00253>
- Epsley, S., Tadros, S., Farid, A., Kargilis, D., Mehta, S., y Rajapakse, C. S. (2021). The effect of inflammation on bone. *Frontiers in physiology*, 1695. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.511799>
- Fabregat, A., Jupe, S., Matthews, L., Sidiropoulos, K., Gillespie, M., Garapati, P., Haw, R., Jassal, B., Korninger, F., May, B., Milacic, M., Duenas Roca, C., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorser, S., Varusai, T., Viteri, G., Weiser, J., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., y D'Eustachio, P. (2018). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D649-D655. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1132>
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., del Canto Pingarrón, M., y Blanco Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11, E47-51. <http://hdl.handle.net/10550/63573>
- Hasegawa, T., y Ishii, M. (2020). Visualizing bone tissue in homeostatic and pathological conditions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 96(2), 43-49. <https://doi.org/10.2183/pjab.96.004>
- Hendy, J., Welker, F., Demarchi, B., Speller, C., Warinner, C., y Collins, M. J. (2018). A guide to ancient protein studies. *Nature Ecology & Evolution*, 2(5), 791-799. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0510-x>
- Hill, R. C., Wither, M. J., Nemkov, T., Barrett, A., D'Alessandro, A., Dzieciatkowska, M., y Hansen, K. C. (2015). Preserved proteins from extinct Bison latifrons identified by tandem mass spectrometry; hydroxylysine glycosides are a common feature of ancient collagen. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(7), 1946-1958. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.047787>
- Hodges, J. A., y Raines, R. T. (2003). Stereoelectronic effects on collagen stability: the dichotomy of 4-fluoroproline diastereomers. *Journal of the American Chemical Society*, 125(31), 9262-9263. <https://doi.org/10.1021/ja035881z>
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., y Mann, M. (2005). Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(9), 1265-1272
- Johnson, E. (1985). Current Developments in Bone Technology. *Advances in Archaeological Method and Theory*, 8, 157-235. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>
- Kovtun, A., Messerer, D., Scharffetter-Kochanek, K., Huber-Lang, M., e Ignatius, A. (2018). Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. *Journal of immunology research*, 8173983, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/8173983>
- Kovtun A., Bergdolt, S., Wiegner, R., Radermacher, P., Huber-Lang, M., e Ignatius, A. (2016) The crucial role of neutrophil granulocytes in bone fracture healing. *European Cells & Materials*, 25(32), 15262. https://www.researchgate.net/profile/AnnaVikman/publication/305634678_The_crucial_role_of_neutrophil_granulocytes_in_bone_fracture_healing/links/57baa5e108ae14f440bd9330/The-crucial-role-of-neutrophil-granulocytes-in-bone-fracture-healing.pdf
- Lanigan, T., Mackie, M., Feine, S., Hublin, J. J., Schmitz, R., Wilcke, A., Collins, M., Cappellini, E., Olsen, J., Taurozzi, A., y Welker, F. (2020). Multi-protease analysis of Pleistocene bone proteomes. *Journal of Proteomics*, 228, 103889. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103889>
- Leo, G., Bonaduce, I., Andreotti, A., Marino, G., Pucci, P., Colombini, M. P., y Birolo, L. (2011). Dea-

- midation at asparagine and glutamine as a major modification upon deterioration/aging of proteinaceous binders in mural paintings. *Analytical Chemistry*, 83(6), 2056-2064. <https://doi.org/10.1021/ac1027275>
- Liu, H., y Pope, R. M. (2003). The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Current opinion in pharmacology*, 3(3), 317-322. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(03\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(03)00037-7)
- Lyman, R. (1994). *Vertebrate Taphonomy*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mays, S. (2018). How should we diagnose disease in palaeopathology? Some epistemological considerations. *International Journal of Paleopathology*, 20, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2017.10.006>
- McGrath, K., Rowsell, K., St-Pierre, C. G., Tedder, A., Foody, G., Roberts, C., Speller, C., y Collins, M. (2019). Identifying archaeological bone via non-destructive ZooMS and the materiality of symbolic expression: examples from Iroquoian bone points. *Scientific reports*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47299-x>
- Mi, H., y Thomas, P. (2009). PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Protein Networks and Pathway Analysis*, 563, 123-140. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-175-2_7
- Mickleburgh, H. L., Schwalbe, E. C., Bonicelli, A., Mizukami, H., Sellitto, F., Starace, S., Wescott, D., Carter, D., y Procopio, N. (2021). Human Bone Proteomes before and after Decomposition: Investigating the Effects of Biological Variation and Taphonomic Alteration on Bone Protein Profiles and the Implications for Forensic Proteomics. *Journal of proteome research*, 20(5), 2533-2546. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00992>
- Nesvizhskii, A. I. (2007). Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods in Molecular Biology*, 367, 87-119. <https://doi.org/10.1385/1-59745-275-0:87>
- Procopio, N., Chamberlain, A. T., y Buckley, M. (2018). Exploring biological and geological age-related changes through variations in intra-and intertooth proteomes of ancient dentine. *Journal of proteome research*, 17(3), 1000-1013. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00648>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978, 1-19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Satyam, A., Graef, E. R., Lapchak, P. H., Tsokos, M. G., Dalle Lucca, J. J., y Tsokos, G. C. (2019). Complement and coagulation cascades in trauma. *Acute medicine & surgery*, 6(4), 329-335. <https://doi.org/10.1002/ams2.426>
- Sawafuji, R., Cappellini, E., Nagaoka, T., Fotakis, A. K., Jersie-Christensen, R. R., Olsen, J. V., Hirata, K., y Ueda, S. (2017). Proteomic profiling of archaeological human bone. *Royal Society open science*, 4(6), 161004. <https://doi.org/10.1098/rsos.161004>
- Scheinsohn, V., Leonardt, S., Rizzo, F., Evans, D., Fernández, M., Hammond, H., Miranda P, Zilio, L., Tchilinguirían, P., Maksemchuck S., Kuperszmit N., y Plaza, H. (2022). Prácticas funerarias en el valle del Genoa (Chubut, Argentina) en el Holoceno Tardío final. Un abordaje del sitio Cueva de Plaza a partir de múltiples líneas de evidencias. *Intersecciones en Antropología* 23(1), 21-35. <https://doi.org/10.37176/iea.23.1.2022.655>
- Schmidt-Schultz, T. H., y Schultz, M. (2004). Bone protects proteins over thousands of years: extraction, analysis, and interpretation of extracellular matrix proteins in archeological skeletal remains. *American Journal of Physical Anthropology*, 123(1), 30-39. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10308>
- Sidiropoulos, K., Viteri, G., Sevilla, C., Jupe, S., Webber, M., Orlic-Milacic, M., Jassal, B., May, B., Shomovskiy, V., Duenas, C., Rothfels, K., Matthews, L., Song, H., Stein, L., Haw, R., D'Eustachio, P., Ping, P., Hermjakob, H., y Fabregat, A. (2017). Reactome enhanced pathway visualization. *Bioinformatics*, 33(21), 3461-3467. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx441>

- Thomas, Paul D., Ebert, D., Muruganujan, A. M., Mushayahama, T., Albou, L.-P., y Mi, H. (2022) PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Society* 31(1), 8-22. <https://doi.org/10.1002/pro.4218>
- Warinner, C., Rodrigues, J. F. M., Vyas, R., Trachsel, C., Shved, N., Grossmann, J., Radini, A., Hancock, Y., Tito, R., Fiddyment, S., Speller, C., Hendy, J., Charlton, S., Luder, H., Salazar-García, D., Eppler, E., Seiler, R., Hansen, H., y Cappellini, E. (2014). Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature genetics*, 46(4), 336-344. <https://doi.org/10.1038/ng.2906>
- Welker, F., Collins, M. J., Thomas, J. A., Wadsley, M., Brace, S., Cappellini, E., Turvey, S., Reguero, M., Gelfo, J., Kramarz, A., Burger, J., Thomas-Oates, J., Ashford, D., Ashton, P., Rowsell, P., Porter, D., Kessler, B., Fischer, R., Baessmann, C., y MacPhee, R. D. (2015). Ancient proteins resolve the evolutionary history of Darwin's South American ungulates. *Nature*, 522(7554), 81-84. <https://doi.org/10.1038/nature14249>
- Welker, F., Ramos-Madrigo, J., Gutenbrunner, P., Mackie, M., Tiwary, S., Rakownikow, Jersie-Christensen, R., Chiva, C., Dickinson, M., Kuhlwilm, M., de Manuel, M., Gelabert, P., Martín-Torres, M., Margvelashvili, A., Arsuaga, J., Carbonell, E., Marques-Bonet, T., Penkman, K., Sabidó, E., Cox, J., y Cappellini, E. (2020). The dental proteome of Homo antecessor. *Nature*, 580(7802), 235-238. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2153-8>
- Wheater, P. R., Burkitt, H. G., y Daniels, V. G. (1987). *Functional Histology*. New York: Churchill Livingstone.
- Young, M. F. (2003). Bone matrix proteins: more than markers. *Calcified Tissue International*, 72(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s00223-002-1017-6>