

El análisis de huella peptídica del colágeno mediante espectrometría de masas (ZooMS) para la identificación taxonómica en fauna arqueológica: desarrollo y retos actuales

L'anàlisi de la petjada peptídica del col·lagen mitjançant espectrometria de masses (ZooMS) per a la identificació taxonòmica de fauna arqueològica: desenvolupament i reptes actuals

Collagen peptide fingerprint analysis using mass spectrometry (ZooMS) for taxonomic identification in archaeological fauna: development and current challenges

AURORA GRANDAL-D'ANGLADE

Universidade da Coruña. Instituto Universitario de Xeoloxía

ESCI, Campus de Elviña, E-15008 A Coruña

aurora.grandal@udc.es

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2087-4034>

El colágeno es una proteína que forma fibras que proporcionan elasticidad y resistencia al hueso. Protegido por la fracción mineral del hueso, el colágeno puede permanecer prácticamente inalterado durante miles de años en los huesos fósiles. Como todas las proteínas, está formado por secuencias de aminoácidos en un orden concreto dictado por el ADN de cada organismo. Esta característica permite identificar la especie a la que pertenece un resto óseo mediante el análisis de huella peptídica, que en esta aplicación se conoce como zooarqueología mediante espectrometría de masas o ZooMS. Para ello es necesario extraer el colágeno del hueso y comprobar, mediante ciertos parámetros, su buena preservación. A continuación, se digiere con una enzima que rompe la molécula por sitios específicos para obtener mediante espectrometría de masas un espectro de fragmentos o péptidos de peso molecular variado. Dada la secuencia de aminoácidos altamente conservada del colágeno, la mayoría de los péptidos obtenidos por digestión trípica son idénticos en todos los taxones, pero algunos difieren y, por lo tanto, son útiles en taxonomía. La identificación se basa en la comparación

de la presencia/ausencia de ciertos péptidos marcadores con bases de datos ya disponibles. La aplicación del ZooMS a la identificación de restos antiguos comenzó a principios del siglo XXI y aún está en fase de desarrollo. Los avances de esta técnica permiten identificar fragmentos óseos de mamíferos y otros vertebrados, en muchos casos hasta el rango de género. Sin embargo, en determinados taxones no es posible hasta ahora diferenciar géneros dentro de una misma familia. Actualmente se trabaja en ampliar el número de taxones bien caracterizados, mejorar la definición de los péptidos para los diversos grupos taxonómicos y homogeneizar el tratamiento técnico y las bases de datos. En este trabajo presentamos como ejemplo la identificación de cinco fragmentos de hueso del Pleistoceno superior de Cova Eirós (Lugo, Galicia) y comentamos las aplicaciones, las limitaciones y los avances de esta nueva técnica zooarqueológica.

PALABRAS CLAVE

COLÁGENO, HUESOS FÓSILES, ZOOARQUEOLOGÍA, ESPECTROMETRÍA DE MASAS, ANÁLISIS DE HUELLAS PEPTÍDICAS, TAXONOMÍA, DESARROLLO DE ZOOMS

El col·lagen és una proteïna que forma fibres que proporcionen elasticitat i resistència als ossos. Protegit per la fracció mineral de l'os, el col·lagen pot romandre pràcticament inalterat durant milers d'anys en els ossos fòssils. Com qualsevol proteïna, està formada per seqüències d'aminoàcids en un ordre determinat pel DNA de cada organisme. Aquesta característica permet identificar les espècies a la qual pertany una resta òssia mitjançant l'anàlisi de la petjada peptídica, que en aquesta aplicació es coneix com zooarqueologia mitjançant espectrometria de masses o ZooMS. És necessari extreure el col·lagen de l'os i comprovar, mitjançant diversos paràmetres, la seva bona preservació. Després, es digereix amb un enzim que trenca la molècula per llocs específics per tal d'obtenir amb l'espectrometria de masses un espectre de fragments o pèptids de pes molecular divers. Donada la seqüència d'aminoàcids altament conservada del col·lagen, la majoria dels pèptids obtinguts per digestió tríplica són idèntics en tots els tàxons, tot i que alguns difereixen i, per tant, són útils en taxonomia. La identificació es basa en la comparació de la presència o absència de determinats marcadors pèptids amb bases de dades ja disponibles. L'aplicació del ZooMS en la identificació de restes antigues va iniciar-se a començaments del segle XXI i encara està en fase de desenvolupament. Els avenços d'aquesta tècnica permeten identificar ossos de mamífer i d'altres vertebrats, en alguns casos fins a nivell de gènere. No obstant això, en determinats tàxons no és possible, fins ara, diferenciar gèneres dins de la mateixa família. Actualment es treballa en l'ampliació del nombre de tàxons ben caracteritzats, millorar la definició dels pèptids per als diferents grups taxonòmics i homogeneïtzar el tractament tècnic i les bases de dades. En aquest treball presentem com a exemple la identificació de cinc fragments ossis del Plistocè superior de Cova Eirós (Lugo, Galícia) i comentem les aplicacions, les limitacions i els avenços d'aquesta nova tècnica zooarqueològica.

PARAULES CLAU

COL-LAGEN, OSSOS FÒSSILS, ZOOARQUEOLOGIA, ESPECTROMETRIA DE MASSES, ANÀLISI DE PETJA PEPTÍDICA, TAXONOMIA, DESENVOLUPAMENT DE ZOOMS

Collagen is a protein that forms fibres that give elasticity and strength to bone. Protected by the mineral fraction of bone, collagen can remain virtually unchanged in fossil bones for thousands of years. Like all proteins, it is made up of amino acid sequences in a specific order dictated by the DNA of each organism. This property makes it possible to identify the species to which a bone fragment belongs using peptide fingerprint analysis, known in this application as zooarchaeology by mass spectrometry or ZooMS. This involves extracting the collagen from the bone and using certain parameters to check whether it is well preserved. It is then digested with an enzyme that splits the molecule at certain

points to obtain a spectrum of fragments or peptides with different molecular weights by mass spectrometry. Given the highly conserved amino acid sequence of collagen, most of the peptides obtained by tryptic digestion are identical in all taxa, but some differ and are therefore useful for taxonomy. Identification is based on comparing the presence/absence of certain marker peptides with already available databases. The application of ZooMS for the identification of ancient remains started at the beginning of the 21st century and it is still under development. Advances in the development of this technique allow the identification of bone fragments from mammals and other vertebrates, in many cases down to the genus level. However, for certain taxa it is not yet possible to distinguish genera within the same family. Work is currently underway to expand the number of well-characterised taxa, improve the definition of peptides for the different taxonomic groups, and standardise technical processing and databases. In this paper, we present as an example the identification of five Upper Pleistocene bone fragments from Cova Eirós (Lugo, Galicia) and discuss the applications, limitations and progress of this new zooarchaeological technique.

KEY WORDS

COLLAGEN, FOSSIL BONES, ZOOARCHAEOLOGY, MASS SPECTROMETRY, PEPTIDE FINGERPRINT ANALYSIS, TAXONOMY, ZOOMS DEVELOPMENT

1. Introducción

1.1. Interés y objeto de la investigación en paleontología molecular

La zoología y la zooarqueología se diferencian, entre otras cosas, en que la primera estudia los seres vivos que desempeñan todas sus funciones vitales y la segunda estudia los vestigios de seres vivos actualmente integrados en el registro arqueológico. Sin embargo, existe un campo intermedio relativo a aquellos seres que, aunque ya no están vivos, conservan inalterados algunos de sus componentes orgánicos. Aparte de la conservación excepcional que se produce en ambientes con condiciones especiales (congelación, momificación...), las partes de los animales que permanecen inalteradas durante más tiempo tras la muerte son principalmente los tejidos mineralizados, como el hueso o la dentina.

Dentro de esta envoltura mineralizada, biomoléculas como el ADN o ciertas proteínas normalmente lábiles pueden sobrevivir durante miles de años (Buckley y Collins, 2011). El colágeno es una de estas proteínas, y en las últimas décadas ha sido objeto de la paleontología molecular, la rama de la paleontología que estudia las moléculas contenidas en los fósiles para reconstruir diversos aspectos biológicos de los organismos del pasado.

En este trabajo vamos a repasar la estructura y composición del colágeno óseo de los mamíferos, y cómo la aplicación de una técnica propia de la biología molecular como es el análisis de la huella peptídica, puede ser aplicada a la zooarqueología con el fin de identificar taxonómicamente los restos óseos que, de otra manera, serían clasificados como inidentificables, perdiéndose toda información que de ellos pudiera extraerse. El análisis de huella

peptídica del colágeno de restos óseos arqueológicos, conocida como ZooMS por las siglas en inglés de «zooarqueología por espectrometría de masas», es una técnica en desarrollo a la que cada vez se suman más posibilidades y aplicaciones que veremos a continuación.

1.2. El colágeno óseo: estructura, composición y síntesis

El hueso es un tejido vivo formado por células y matriz extracelular. También posee vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas (fig. 1). El tejido óseo compacto se organiza en paquetes llamados *osteonas*, formados por lamelas concéntricas alrededor de un canal vascularizado (canal de Havers). Las lamelas constituyen la matriz extracelular ósea, formada por dos fracciones principales: la fracción mineral, principalmente fosfato cálcico o hidroxiapatito, y la matriz orgánica, que representa un tercio del peso óseo. Está compuesta fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90 %) y otras proteínas no colágenas como la osteocalcina o la osteonectina, que suponen entre el 3 y 5 % de la composición del hueso. Las células (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) se encuentran en unos espacios entre las lamelas llamados *lagunas* y se encargan de secretar los componentes del hueso, de mantenerlo y de remodelarlo (Davies y Hosseini, 2000).

El colágeno es la principal proteína fibrosa insoluble de la matriz orgánica (Henriksen y Karsdal, 2019). De hecho, es la proteína más abundante en el reino animal, constituyendo aproximadamente el 25 % de toda la proteína de un organismo. El colágeno se puede subdividir en diferentes tipos según su estructura. Se han descubierto 28 tipos diferentes de colágeno, pero, sin duda, los más comunes son los tipos I, II, III y IV, siendo el tipo I el que conforma más del 95 % del colágeno del cuerpo humano. El colágeno de tipo I se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos y de sostén: piel, tendones, huesos, ligamentos, dentina, etc. (Henriksen y Karsdal, 2019).

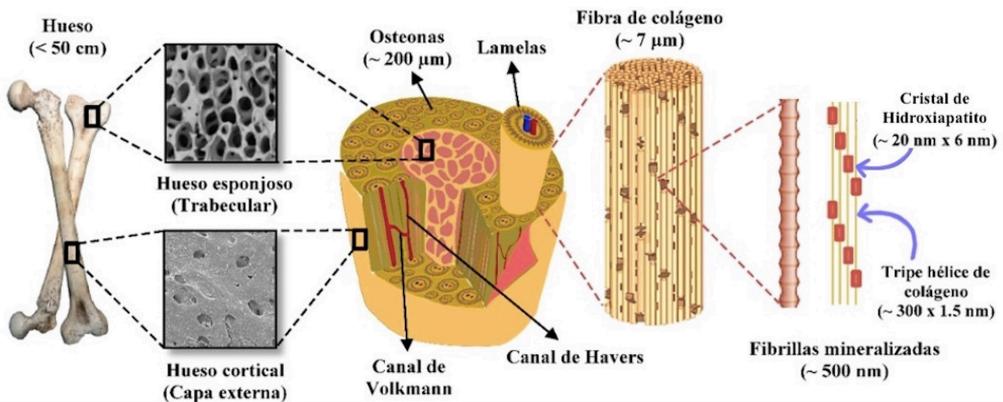


Figura 1. Estructura y ultraestructura del hueso. Imagen de: DGDC-UNAM. <<https://tinyurl.com/wjxyfdpc>>.

Tabla 1. Proporción de aminoácidos del colágeno óseo humano, expresados en gramos por cada 100 gramos de proteína seca. Cisteína y triptófano son prácticamente indetectables (Eastoe, 1955). Asparagina y glutamina se encuentran en proporción inferior a 0,1 % (Robinson y Rudd, 1974). Hidroxiprolina e hidroxilisina, en cursiva, son variantes hidroxiladas de la prolina y la lisina, respectivamente

Esenciales	Porcentaje	No esenciales	Porcentaje
Glicina	25,8	Valina	3
Prolina	15,3	Leucina	3,8
Hidroxiprolina	14,1	Isoleucina	1,9
Ácido glutámico	11,4	Treonina	2,4
Alanina	10,9	Metionina	0,8
Arginina	8,8	Lisina	4,4
Serina	4,1	Hidroxilisina	0,6
Ácido aspártico	6,7	Histidina	1
Tirosina	0,9	Fenilalanina	2,5

Al ser una proteína, el colágeno está formado por largas cadenas de aminoácidos. En los seres vivos existen 20 aminoácidos (fig. 2), pero no todos están presentes en el colágeno, ni en la misma proporción. La secuencia primaria de aminoácidos del colágeno es muy particular: se basa en una repetición de la secuencia glicina-X-Y donde X e Y pueden ser cualquiera de los otros aminoácidos presentes en el colágeno, como se muestra en la tabla 1. Frecuentemente, el aminoácido en la tercera posición es la hidroxiprolina (Eastoe, 1955). Cada aminoácido tiene una fórmula diferente que podemos ver desarrollada en la tabla 2, donde además se calcula el peso molecular de cada uno de ellos (la suma de los pesos atómicos de cada átomo que los constituye). Los aminoácidos se agrupan en cadenas llamadas *péptidos*. En el colágeno, la longitud de cada cadena es de aproximadamente 1300 aminoácidos. El colágeno maduro o tropocolágeno está compuesto por tres cadenas de péptidos enrolladas en una triple hélice, con un peso molecular de unos 100.000 Dalton. Como la glicina es el más pequeño de todos los aminoácidos, permite que la triple hélice forme una configuración apretada, capaz de soportar mucha tensión (Henriksen y Karsdal, 2019).

En los tetrápodos, las tres cadenas de la triple hélice del colágeno tipo I no son iguales. En los mamíferos existen dos cadenas de tipo $\alpha 1$ y una de tipo $\alpha 2$. La primera se produce por la expresión del gen COL1A1 (o COL1 $\alpha 1$), que en los humanos se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17, mientras que la segunda procede de la expresión del gen COL1A2 (o COL1 $\alpha 2$), situado en el brazo largo del cromosoma 7 (Shoulders y Raines, 2009).

La síntesis de colágeno se realiza principalmente en las células del tejido óseo, especializadas en la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (Henriksen y Karsdal, 2019). Dentro de las células se sintetizan las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ por separado, mediante el conocido proceso de síntesis proteica a partir de la secuencia de bases nitrogenadas en el gen correspondiente, mediada por el ARN mensajero (fig. 3). En este proceso, la información contenida en el gen es copiada o transcrita a una molécula de ARN

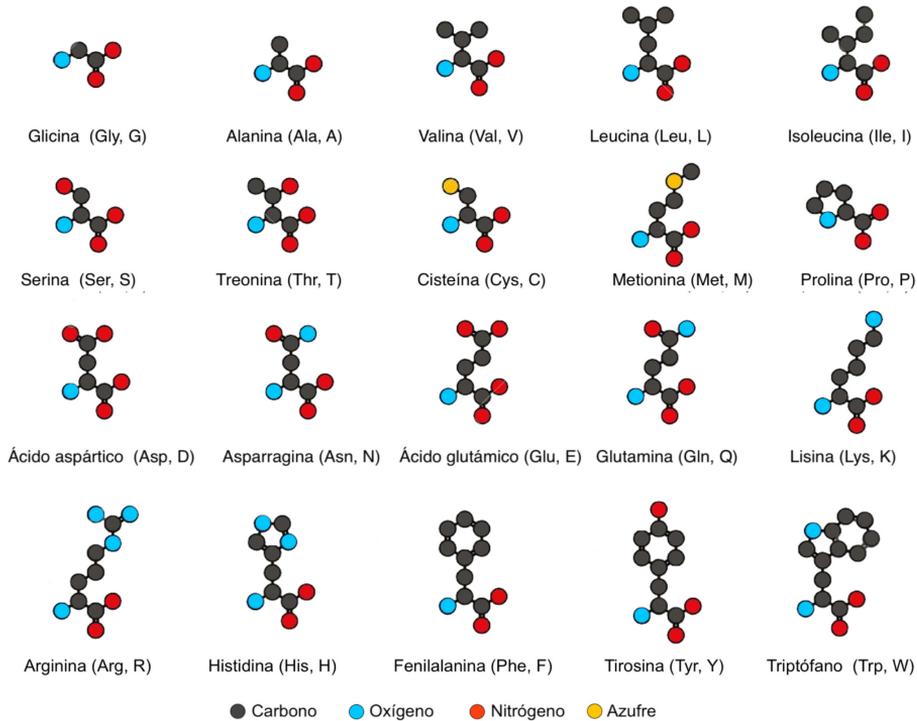


Figura 2. Fórmula desarrollada de cada aminoácido y cálculo de su peso molecular en Da (Dalton) como suma de los pesos de cada uno de los átomos que lo componen. En negro, aminoácidos no esenciales en la mayoría de los mamíferos. En rojo, aminoácidos esenciales. En gris, aminoácidos no detectados en el colágeno I. En cursiva, las variedades hidroxiladas existentes en el colágeno I (colores en versión digital del artículo).

mensajero, que sale del núcleo y se dirige al citoplasma de la célula, donde tiene lugar la síntesis de las proteínas gracias a la presencia de los orgánulos llamados *ribosomas* y a la contribución del ARN de transferencia, que es la molécula que porta el aminoácido y que se colocará en un orden concreto, dictado por el ARN mensajero, para formar la proteína.

Cada tres bases nitrogenadas en el ADN (triplete), y sus complementarias en el ARN mensajero (codón) y el ARN de transferencia (anticodón) determinan un aminoácido concreto en la proteína. La correspondencia entre tripletes de bases y aminoácidos es lo que se conoce con el nombre de *código genético*, que es universal (fig. 4). Igualmente universal es el proceso de transcripción (de ADN a ARN mensajero) y de traducción (de ARN mensajero a proteína), lo que se considera el dogma principal de la biología (Lodish *et al.*, 2000).

Algunas mutaciones en los genes COL1 α 1 o COL1 α 2 pueden resultar dañinas (por ejemplo, causando la osteogénesis imperfecta, o enfermedad de los huesos frágiles) o incluso letales. Las mutaciones son variaciones puntuales en una de las bases nitrogenadas del

Tabla 2. Fórmula desarrollada de cada aminoácido y cálculo de su peso molecular en Da (Dalton) como suma de los pesos de cada uno de los átomos que lo componen. En negro, aminoácidos no esenciales en la mayoría de los mamíferos. En rojo, aminoácidos esenciales. En gris, aminoácidos no detectados en el colágeno I. En cursiva, las variedades hidroxiladas existentes en el colágeno I (colores en versión digital del artículo).

Aminoácido	Símbolo	Fórmula	C (*12)	H (*1)	O (*16)	N (*14)	S (*32)	Da
Glicina	G	C ₂ H ₅ NO ₂	2	9	2	1		79
Alanina	A	C ₃ H ₇ NO ₂	3	7	2	1		89
Serina	S	C ₃ H ₇ NO ₃	3	7	3	1		105
Prolina	P	C ₅ H ₉ NO ₂	5	9	2	1		115
Hidroxiprolina	P	C ₅ H ₉ NO ₃	5	9	3	1		131
Valina	V	C ₅ H ₁₁ NO ₂	5	11	2	1		117
Treonina	T	C ₄ H ₉ NO ₃	4	9	3	1		119
Cisteína	C	C ₃ H ₇ NO ₂ S	3	7	2	1	1	121
Isoleucina	I	C ₆ H ₁₃ NO ₂	6	13	2	1		131
Leucina	L	C ₆ H ₁₃ NO ₂	6	13	2	1		131
Asparagina	N	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	4	8	3	2		132
Ácido aspártico	D	C ₄ H ₇ NO ₄	4	7	4	1		133
Lisina	K	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	6	14	2	2		146
Hidroxilisina	K	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	6	14	3	2		162
Glutamina	Q	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	5	10	3	2		146
Ácido glutámico	E	C ₅ H ₉ NO ₄	5	9	4	1		147
Metionina	M	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	5	11	2	1	1	149
Histidina	H	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	6	9	2	3		155
Fenilalanina	F	C ₉ H ₁₁ NO ₂	9	11	2	1		165
Arginina	R	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	6	14	2	4		174
Tirosina	Y	C ₉ H ₁₁ NO ₃	9	11	3	1		181
Triptófano	W	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	11	12	2	2		204

ADN, o en una de las bases del ARN mensajero. Debido a que el código genético tiene la particularidad de que varios tripletes pueden codificar para un mismo aminoácido, muchas mutaciones no tienen consecuencia visible, principalmente las que afectan a la tercera base del codón o incluso en algunos casos a la segunda base (mutaciones silenciosas). Sin embargo, cuando la mutación afecta a la primera base, la proteína resultante muestra la sustitución de un aminoácido por otro (Kuhn, 1987).

Además de las mutaciones en el ADN, se puede producir un fallo en la transcripción o síntesis del ARN mensajero, que puede dar lugar a la sustitución de un aminoácido por otro. Estas sustituciones pueden tener distintas consecuencias. Si afectan a un aminoácido vital para la configuración tridimensional de la molécula de colágeno, la sustitución resulta letal. En el caso contrario, la sustitución no tendrá mayores consecuencias y simplemen-

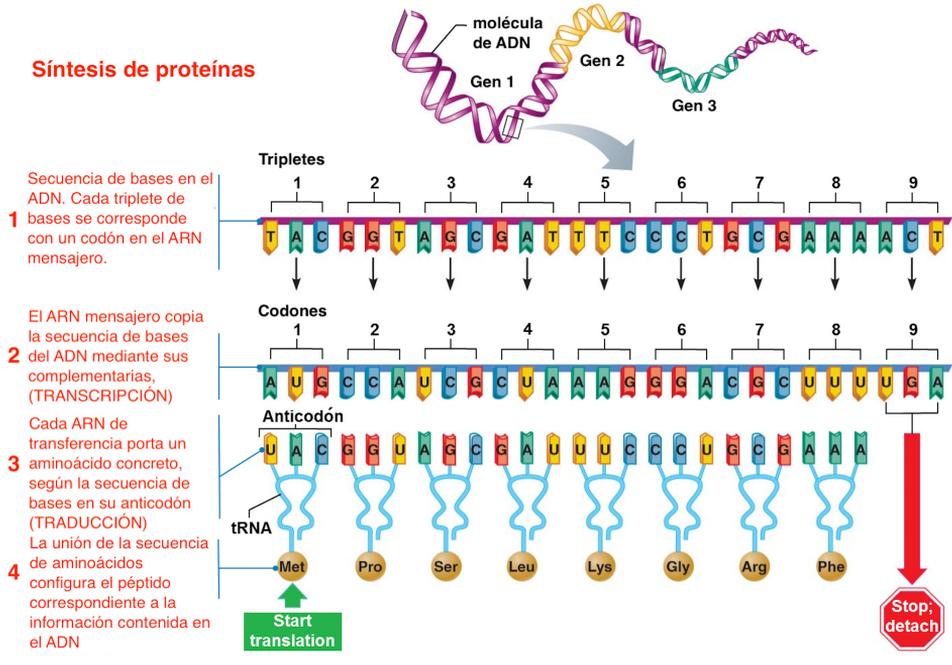


Figura 3. Las sucesivas fases de la síntesis de proteínas, desde la transcripción del ADN a ARN mensajero y la traducción de este a un péptido por mediación del ARN de transferencia.

te reflejará la variabilidad genética entre unos taxones y otros. Como cada molécula de colágeno de tipo I contiene dos cadenas $\alpha 1$ y una $\alpha 2$, un fallo en la transcripción del ARN que va a codificar una cadena $\alpha 2$ resulta menos dañino que para las cadenas $\alpha 1$. Por ello, estas cadenas $\alpha 1$ presentan una menor variabilidad que las $\alpha 2$. Este detalle va a ser importante a la hora de utilizar la molécula de colágeno con fines taxonómicos, como se explicará más adelante.

Ambos tipos de cadenas maduran gradualmente mediante una serie de modificaciones postraduccionales, que finalmente les permitirán envolverse entre sí para formar la triple hélice característica del tropocolágeno, que posteriormente es secretado hacia la matriz (Shoulders y Raines, 2009). Entre las diversas modificaciones, es necesario que los aminoácidos prolina y lisina se hidroxilen. La hidroxilación es una reacción química en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH) reemplazando un átomo de H. La hidroxilación de prolina y lisina se realiza gracias a enzimas específicas, que dependen de la presencia de vitamina C. En las células privadas de vitamina C, como ocurre en la enfermedad del escorbuto, las cadenas de procolágeno no se hidroxilan lo suficiente como para formar triples hélices estables ni pueden formar fibrillas normales (Kuhn, 1987). En el colágeno de tipo I,

		segunda base									
		U		C		A		G			
primera base	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C	
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	stop	UGA	stop	A	
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	stop	UGG	Try	G	
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Ard	G	
	A	AUU	Iso	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	
		AUC	Iso	ACC	Thr	AAC	Asn	CGC	Ser	C	
		AUA	Iso	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	CGG	Arg	G	
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

Figura 4. El código genético, representado en una tabla que identifica el aminoácido codificado por cada codón. Hay 64 codones posibles, de los cuales 61 codifican aminoácidos (uno de ellos es el codón de inicio, AUG, codificando el aminoácido metionina) y los tres restantes codones indican la parada (UAA, UAG, UGA). Solo hay 20 aminoácidos, por lo tanto, la mayoría de ellos pueden ser codificados por varios codones. Por lo general la tercera base es la menos específica, seguida por la segunda base en algunos casos. Esto ayuda a silenciar posibles mutaciones en esas posiciones.

aproximadamente un 50 % de los residuos de prolina están hidroxilados, mientras que esta modificación es más variable en la lisina, entre 15 y 90 % de los residuos (Yamauchi y Sricholpech, 2012).

1.3. Particularidades del colágeno en los huesos y dientes fósiles

Los huesos de un vertebrado actual contienen aproximadamente un 22 % de colágeno (Crockett *et al.*, 2011); en los fósiles, la proporción va disminuyendo, según la antigüedad del resto y las condiciones de pH, humedad y temperatura a las que se encuentre sometido.

La degradación diagenética del hueso puede seguir diversas trayectorias. La disolución de la fracción mineral del hueso, debida a la acidez del suelo, conduce a la pérdida acelerada de colágeno al hacerse accesible al ataque microbiano. La degradación química del colágeno depende de la humedad y la temperatura, pero se ha calculado que, bajo las condiciones climáticas europeas y sin otros factores que afecten al hueso, podría sobrevivir durante más de un millón de años (Buckley y Collins, 2011). Estas condiciones ideales no suelen darse en la naturaleza; aun así, es posible recuperar colágeno suficientemente preservado en restos óseos de decenas de miles o hasta varios cientos de miles de años (Buckley *et al.*, 2011; Britton *et al.*, 2012). En casos muy excepcionales se encontraron vestigios de colágeno en huesos de dinosaurios de cerca de cien millones de años de antigüedad (Schweitzer *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2017). Estudios experimentales demostraron que la composición del colágeno se mantiene prácticamente inalterada hasta que solo permanece en el hueso un 1 % de la cantidad inicial, es decir aproximadamente un 0,2 % del peso total de la muestra (Dobberstein *et al.*, 2009). La dentina también contiene colágeno, pues su composición es similar a la del hueso. Además, la mayor mineralización del diente y la cubierta de esmalte (formado solamente por cristales de apatito) suele permitir una mejor preservación a lo largo del tiempo.

Esta larga preservación del colágeno en huesos y dientes permite la obtención de datos biológicos y evolutivos de organismos que dejaron de vivir hace tiempo. Los análisis biomoleculares del colágeno son cada vez más utilizados cuando se desea reconstruir la vida del pasado, ya sea en humanos o en animales. Los análisis de isótopos estables de colágeno óseo fósil empezaron a aplicarse en el último cuarto del siglo xx, si bien en principio solamente de manera puntual y exploratoria. Sin embargo, su empleo ha crecido exponencialmente hasta la actualidad (Katzenberg y Waters-Rist, 2019). En cuanto a la taxonomía mediante espectrometría de masas (Zooms), o estudio de la huella peptídica, es una técnica de implantación muy reciente (Buckley *et al.*, 2009) y que todavía está en pleno desarrollo.

1.4. Aplicación de la huella peptídica del colágeno a la zooarqueología

En los yacimientos pleistocenos, y más aún si son de origen antrópico, la identificación taxonómica de los restos faunísticos no siempre es sencilla debido al alto grado de fragmentación que suelen presentar los huesos. Para identificar estos pequeños restos, una posibilidad sería hacer una secuenciación de su ADN. Sin embargo, esta es una técnica costosa y muy laboriosa, que no siempre da buenos resultados porque el ADN de un resto antiguo suele estar degradado y contaminado.

Recientemente se ha desarrollado el estudio de la huella peptídica del colágeno por espectrometría de masas, una técnica propia de la biología molecular para la identificación de proteínas. La ventaja de esta técnica sobre el estudio de ADN es que el colágeno es

mucho más abundante en los restos óseos que el ADN, se conserva mejor y se extrae con más facilidad. La desventaja es que el colágeno es menos específico.

Todos los vertebrados poseen en su ADN genes similares a partir de los cuales se sintetizan las cadenas $\alpha 1$ o $\alpha 2$ que formarán la molécula de colágeno óseo. Dentro de cada gran grupo taxonómico (por ejemplo, los mamíferos), las proteínas que cumplen una misma función suelen ser muy similares, aunque presentan pequeñas diferencias relacionadas con la evolución de los distintos linajes por separado y la acumulación de mutaciones con el paso del tiempo. Algunas proteínas muy específicas, como el colágeno, no pueden acumular demasiadas mutaciones porque perderían su estructura y su función. Aun así, entre las moléculas de colágeno de diferentes taxones se producen pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos que permiten diferenciar esos taxones. De las dos cadenas que forman el colágeno, la secuencia de la cadena $\alpha 1$ muestra menos diferencias entre taxones, siendo su secuencia más conservativa que la cadena $\alpha 2$. Entre mamíferos de diversos órdenes (primates, roedores, carnívoros, rumiantes...) la cadena $\alpha 1$ puede presentar hasta un 5 % de diferencias, mientras que la cadena $\alpha 2$ llega a acumular hasta un 10 % de diferencias (Buckley, 2018).

Para poder identificar el taxón del que procede el resto óseo del que se obtiene el colágeno sería necesario hacer una secuenciación de la proteína completa, es decir, identificar toda la secuencia de aminoácidos que lo componen. Esta es una técnica compleja que solo representa una pequeña ventaja sobre la secuenciación de ADN, que es la mayor facilidad de extracción de colágeno frente al ADN, debido a su abundancia. Sin embargo, existe otra técnica de identificación de las proteínas que no requiere su secuenciación y se basa simplemente en las diferencias en el peso molecular de los distintos componentes de estas. Como cada aminoácido tiene un peso molecular determinado, debido a su composición química (ver la tabla 2), pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos producirán proteínas de peso molecular diferente. Si consideramos la molécula entera de colágeno, que contiene más de 1.000 aminoácidos, la diferencia en peso molecular será muy pequeña y no es posible saber en qué posición están la o las sustituciones. Por ello se desarrolló un método llamado *de huella peptídica*, (James *et al.*, 1993; Pappin *et al.*, 1993). El fundamento de la técnica es relativamente sencillo. Consiste en romper la proteína por lugares específicos mediante su digestión enzimática. Se obtienen así una serie de péptidos de diferentes tamaños, cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos concreta y, por tanto, una masa característica. De esta manera es más fácil saber en qué puntos de la secuencia (en cuáles de los péptidos) se encuentran las sustituciones.

La tripsina es una enzima que se produce en el páncreas y actúa en la digestión de las proteínas, rompiéndolas en fragmentos más pequeños llamados *péptidos*. Esa rotura es específica, pues solo actúa rompiendo los enlaces peptídicos que se hallan en el extremo C terminal de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando el residuo siguiente es una prolina (Olsen *et al.*, 2004). La digestión *in vitro* de una proteína con tripsina produce el mismo efecto de rotura en la proteína objeto de estudio. De esta manera se obtiene una

serie de péptidos (que, por obtenerse gracias a la tripsina, se llaman *péptidos trípticos*) que siempre van a terminar en una lisina (Lys, K) o una arginina (Arg, R).

Así, los diferentes péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina tendrán un peso molecular que es la suma del de los aminoácidos que lo componen. La sustitución de un solo aminoácido produce un péptido de diferente peso molecular. Esas pequeñas diferencias determinan que los péptidos homólogos en dos taxones diferentes puedan tener masas distintas. Midiendo estas masas es posible reconocer los distintos taxones sin necesidad de realizar una secuenciación o lectura de la secuencia de aminoácidos. Esta técnica se emplea extensamente en el campo de la biomedicina para identificar proteínas, denominándose *huella peptídica* (*peptide mass fingerprinting*).

La aplicación de esta técnica para identificar colágeno de restos antiguos comenzó a desarrollarse a comienzos del siglo XXI (Ostrom *et al.*, 2000) y actualmente aún está en desarrollo. En zooarqueología se ha denominado específicamente «zooarqueología por espectrometría de masas», o ZooMS, por sus siglas en inglés (Buckley *et al.*, 2009).

Dada la alta conservación de la secuencia de aminoácidos del colágeno, la mayoría de los péptidos que se obtienen con la digestión tríptica son idénticos en los diferentes taxones, y solo algunos de ellos son útiles para diferenciar a nivel taxonómico. También se descartan los péptidos más pequeños, que suelen ser poco específicos, y solo se contemplan los que tienen un peso molecular mayor que 1.000 Da.

Las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del colágeno no se pueden separar por métodos convencionales, por lo que los péptidos que se utilizan como marcadores pertenecen a las dos moléculas. El colágeno tipo $\alpha 1$ es más conservativo entre los taxones (Buckley, 2018) y solo dos marcadores se pueden utilizar con este fin. Los restantes péptidos se encuentran en la cadena $\alpha 2$.

Inicialmente los péptidos fueron identificados mediante una letra del alfabeto (A, B, C, etc.) por el orden ascendente de su masa/carga. A ellos, se añadieron posteriormente nuevos marcadores que se denominaron P1 y P2. Existen tres péptidos (A', F' y G') que son similares a sus homólogos A, F o G, pero con una hidroxilación más de la prolina, que añade 16 Da al peso molecular. Una propuesta reciente de estandarización de la nomenclatura de los péptidos (Brown *et al.*, 2021a) indica de qué cadena proceden y cuál es el orden en el que se encuentra cada uno en la molécula, con dos modalidades: en una se indica solamente en qué aminoácido comienza la secuencia; en la segunda, la longitud total de la misma. Esta nomenclatura es mucho más precisa, pero también más engorrosa para su utilización práctica. En este trabajo vamos a utilizar la nomenclatura tradicional, más simple. La tabla 3 muestra las correspondencias en la nomenclatura de los péptidos según los diversos autores.

Dado que la técnica se emplea con fines taxonómicos desde tiempos relativamente recientes, muchos marcadores peptídicos están todavía en estudio. La propuesta más completa es la de Welker *et al.* (2016), que recoge los marcadores publicados hasta el momento para un gran número de taxones. Aun así, carece de resolución en algunos grupos taxonómicos (tabla 4).

Tabla 3. Correspondencia en la nomenclatura de los péptidos utilizados en la identificación de taxones por huella peptídica del colágeno óseo

Welker <i>et al.</i> , 2016	Brown <i>et al.</i> , 2021a largo	Brown <i>et al.</i> , 2021a breve
P1	COL1 α 1 508 - 519	α 1 508
A	COL1 α 2 978 - 990	α 2 978
A'	COL1 α 2 978 - 990	α 2 978 (+16)
B	COL1 α 2 484 - 498	α 2 484
C	COL1 α 2 502 - 519	α 2 502
P2	COL1 α 2 292 - 309	α 2 292
D	COL1 α 2 793 - 816	α 2 793
E	COL1 α 2 454 - 483	α 2 454
F	COL1 α 1 586 - 618	α 1 586
F'	COL1 α 1 586 - 618	α 1 586 (+16)
G	COL1 α 2 757 - 789	α 2 757

Tabla 4. Marcadores peptídicos en una selección de taxones (Welker *et al.*, 2016)

Especies	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'
<i>Palaeoloxodon antiquus</i>	1105,6	1145,6	1161,6	1453,7	1579,8	1556,7	2115,1	2808,3	2853,4	2869,4	2999,5	3015,5
<i>Loxodonta africana</i>	1105,6	1145,6	1161,6	1453,7	1579,8	1556,7	2115,1	2808,3	2853,4	2869,4	2999,5	3015,5
<i>Mammuthus primigenius</i>	1105,6	1145,6	1161,6	1453,7	1579,8	1556,7	2115,1	2808,3	2853,4	2869,4	2999,5	3015,5
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1105,6	1221,6	1237,6	1453,7	(?)	(?)	2129,1	(?)	2883,4	2899,4	2957,5	2973,5
<i>Lepus europaeus</i>	1105,6	1221,6	1235,6	1453,7	(?)	(?)	2129,1	(?)	2883,4	2899,4	2957,4	2973,5
<i>Lepus arcticus</i>	1105,6	1221,6	1235,6	1453,7	(?)	(?)	2129,1	(?)	2883,4	2899,4	2957,4	2973,5
<i>Mus musculus</i>	1105,6	1178,6	1194,6	1453,7	(?)	(?)	2159,1	(?)	2879,4	2895,4	2931,5	2947,5
<i>Rattus norvegicus</i>	1105,6	1187,6	1203,6	1453,7	(?)	(?)	2142,1	(?)	2883,4	2899,4	2987,5	3003,5
<i>Castor fiber</i>	1105,6	1177,6	1193,6	1427,7	(?)	(?)	2129,1	(?)	2883,4	2899,4	2983,5	2999,5
<i>Macaca mulatta</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1427,7	1580,8	1647,8	2143,2	2832,4	2883,4	2899,4	2957,5	2973,5
<i>Gorilla gorilla</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1477,8	1580,8	1619,8	2105,1	2832,4	2869,4	2885,4	2957,5	2973,5
<i>Pan troglodytes</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1477,8	1580,8	1619,8	2115,1	2832,4	2869,4	2885,4	2957,5	2973,5
<i>Pongo pygmaeus</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1477,8	1580,8	1619,8	2115,1	2832,4	2883,4	2899,4	2957,5	2973,5
<i>Homo sapiens</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1477,8	1580,8	1619,8	2115,1	2832,4	2869,4	2885,4	2957,5	2973,5
<i>Canis lupus</i>	1105,6	1210,7	1226,7	1453,7	1566,8	1649,8	2131,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Canis latrans</i>	1105,6	1210,7	1226,7	1453,7	(?)	1609,8	2131,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Vulpes vulpes</i>	1105,6	1210,7	1226,7	1437,7	1566,8	1609,8	2131,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Vulpes lagopus</i>	1105,6	1210,7	1226,7	1453,7	1566,8	1609,8	2131,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Cuon alpinus</i>	1105,6	1210,7	1226,7	1453,7	1566,8	(?)	2131,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Mustela putorius</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1453,7	1566,8	(?)	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Mustela lutreola</i>	1105,6	1219,6	1235,6	1453,7	1566,8	1609,8	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Gulo gulo</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1453,7	1566,8	1609,8	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Meles meles</i>	1105,6	1219,6	1235,6	1453,7	1566,8	1609,8	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2957,4	2973,5
<i>Martes martes</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1453,7	1566,8	1609,8	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Lutra lutra</i>	1105,6	1219,7	1235,6	1453,7	1566,8	(?)	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Odobenus rosmarus</i>	1105,6	1205,6	1221,6	1453,7	1566,8	1639,8	2121,1		2853,4	2869,4	3003,5	3019,5

Tabla 4. Marcadores peptídicos en una selección de taxones (Welker *et al.*, 2016) (continuación)

Especies	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'
<i>Leptonychotes weddellii</i>	1105,6	1205,6	1221,6	1457,7	1566,8	(?)	2171,1		2853,4	2869,4	2957,5	2973,5
<i>Ursus americanus</i>	1105,6	1217,7	1233,7	1453,7	1566,8	1609,8	2163,1	(?)	2853,4	2869,4	2957,5	2973,5
<i>Ursus maritimus</i>	1105,6	1217,7	1233,7	1453,7	1566,8	1609,8	2163,1	2808,3	2853,4	2869,4	2957,5	2973,5
<i>Ursus arctos</i>	1105,6	1217,7	1233,7	1453,7	1566,8	1609,8	2163,1	(?)	2853,4	2869,4	2957,5	2973,5
<i>Felis catus</i>	1105,6	1207,6	1223,6	1453,7	1566,8	1609,8	2163,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Lynx Lynx</i>	1105,6	1207,6	1223,6	1453,7	1566,8	1609,8	2163,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Panthera tigris</i>	1105,6	1207,6	1223,6	1453,7	1566,8	1609,8	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Panthera leo</i>	1105,6	1207,6	1223,6	1453,7	1566,8	(?)	2147,1	2820,4	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Crocota crocuta</i>	1105,6	1207,6	1223,6	1453,7	1566,8	1639,8	2147,1	2808,3	2853,4	2869,4	2983,5	2999,5
<i>Balaenoptera acurostrata</i>	1079,6	1189,6	1205,6	1441,7	1566,8	1652,8	2135,1		2883,4	2899,4	3007,5	3023,5
<i>Orcinus orca</i>	1079,6	1189,6	1205,6	1453,7	1566,8	1652,8	2119,1		2883,4	2899,4	3007,5	3023,5
<i>Tursiops truncatus</i>	1079,6	1189,6	1205,6	1453,7	1566,8	1638,8	2119,1		2883,4	2899,4	3007,5	3023,5
<i>Physeter catodon</i>	1079,6	1189,6	1205,6	1453,7	1550,8	1652,8	2133,1		2883,4	2899,4	3023,5	3039,5
<i>Hippopotamus amphibius</i>	1105,6	1189,6	1205,6	1453,7	1580,8	1648,8	2147,1	2792,3	2869,4	2885,4	3017,5	3033,5
<i>Saiga tatarica</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1550,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Gazella sp.</i>	(?)	1180,6	1196,6	1427,7	1550,8	(?)	2131,1	(?)	(?)	(?)	3017,5	3033,5
<i>Bison bison</i>	1105,6	1192,7	1208,7	1427,7	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2853,4	2869,4	3017,5	3033,5
<i>Bubalus bubalis</i>	1105,6	1192,7	1208,7	1455,8	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2853,4	2869,4	3059,5	3075,5
<i>Bos primigenius</i>	1105,6	1192,7	1208,7	1427,7	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2853,4	2869,4	3017,5	3033,5
<i>Ovis aries</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Capra Ibex</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3077,5	3093,5
<i>Rupicapra rupicapra</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Ovibos moschatus</i>	1105,6	1192,7	1208,7	1427,7	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Cervus elaphus</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1550,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Dama dama</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1550,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Megaloceros giganteus</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1550,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Rangifer tarandus</i>	1105,6	1150,6	1166,6	1427,7	1580,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3077,5	3093,5
<i>Alces alces</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1550,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Capreolus capreolus</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1427,7	1550,8	1648,8	2131,1	2792,3	2883,4	2899,4	3043,4	3059,4
<i>Sus scrofa</i>	1105,6	1180,6	1196,6	1453,7	1550,8	1647,8	2131,1	2820,4	2883,4	2899,4	3017,5	3033,5
<i>Camelus bactrianus</i>	1105,6	1221,6	1235,6	1443,7	1550,8	1634,8	2131,1	2820,4	2883,4	2899,4	2975,5	2991,5
<i>Camelus dromedarius</i>	1105,6	1221,6	1235,6	1453,7	1550,8	(?)	2131,1	(?)	2883,4	2899,4	2975,5	2991,5
<i>Equus caballus</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1427,7	1550,8	1649,8	2145,1	2820,4	2883,4	2899,4	2983,5	2999,5
<i>Equus asinus</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1427,7	1550,8	1649,8	2145,1	2820,4	2883,4	2899,4	2983,5	2999,5
<i>Equus grevyi</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1427,7	1550,8	1649,8	2145,1	2820,4	2883,4	2899,4	2983,5	2999,5
<i>Equus hydruntinus</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1427,7	1550,8	1649,8	2145,1	2820,4	2883,4	2899,4	2983,5	2999,5
<i>Equus przewalski</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1427,7	1550,8	1649,8	2145,1	2820,4	2883,4	2899,4	2983,5	2999,5
<i>Equus hemionus</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1427,7	1550,8	1649,8	2145,1	2820,4	2883,4	2899,4	2983,5	2999,5
<i>Diceros bicornis</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1453,7	1550,8	(?)	2145,1	(?)	2869,4	2885,4	2983,5	2999,5
<i>Rhinoceros unicornis</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1453,7	1550,8	(?)	2145,1	(?)	2869,4	2885,4	2983,5	2999,5
<i>Coelodonta antiquitatis</i>	1105,6	1182,6	1198,6	1453,7	1550,8	1623,8	2145,1	(?)	2869,4	2885,4	2983,5	2999,5

2. Análisis de un caso: restos óseos no identificados de Cova Eirós (Triacastela, Lugo)

2.1. El yacimiento y las muestras óseas

Cova Eirós está situada en la aldea de Cancelo, del término municipal de Triacastela (Lugo) en las estribaciones de la Serra do Ouribio. La boca de la cavidad ($42^{\circ} 45' 59''$ N, $7^{\circ} 12' 18''$ O) se abre en la ladera noroeste del Monte Penedo, en la Serra do Ouribio, a 785 metros de altura s. n. m. y a unos 25 metros sobre el arroyo de Bezcas. El sistema kárstico se desarrolla en las calizas de la Serie de Cándana (Cámbrico inferior) del dominio del Manto de Mondoñedo, incluidas en la Zona Asturoccidental-leonesa del Macizo Hercínico (Grandal-d'Anglade, 1993). Es una cavidad de morfología prácticamente horizontal (fig. 5). La entrada actual tiene unos 2 metros de altura y 3,5 metros de anchura. Se estrecha tras los siete primeros metros de recorrido, dando paso a una gatera de aproximadamente 15 metros de longitud que se abre a una gran sala a partir de la cual se produce una bifurcación, con dos galerías subparalelas de recorrido principalmente lineal, con dirección aproximada NO-SE, coincidente con la dirección de las capas de caliza y planos de falla. Ambas galerías se reúnen en una sala más pequeña a partir de la que se desarrolla una última galería, al fondo de la cual se encuentra un yacimiento muy rico en restos de oso cavernario (*Ursus spelaeus*) excavado

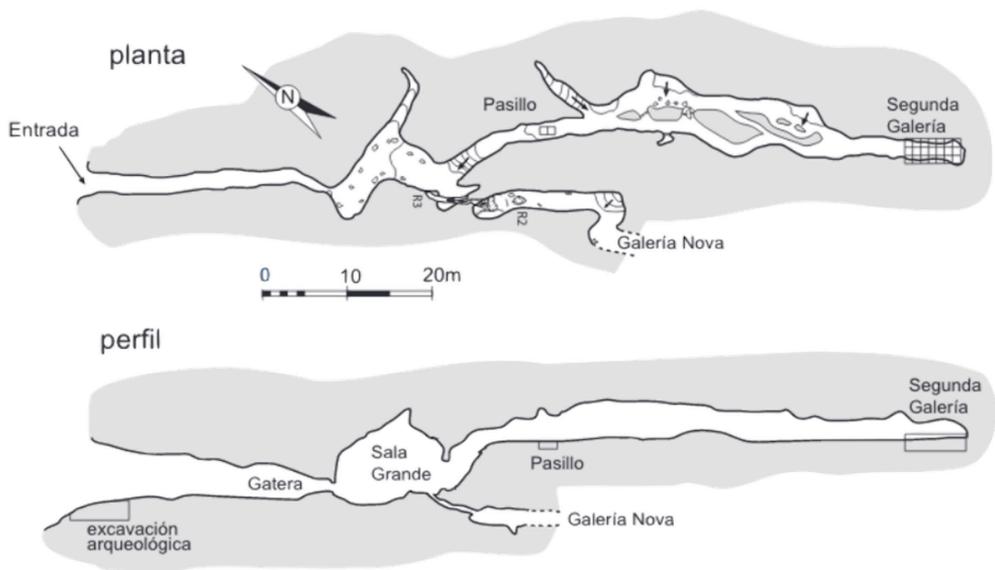


Figura 5. Planta y perfil de Cova Eirós, mostrando las distintas zonas de excavación. Las muestras incluidas en este trabajo proceden de la excavación arqueológica cercana a la entrada, y una de ellas de la zona llamada «pasillo» (Grandal-d'Anglade *et al.*, 2011).

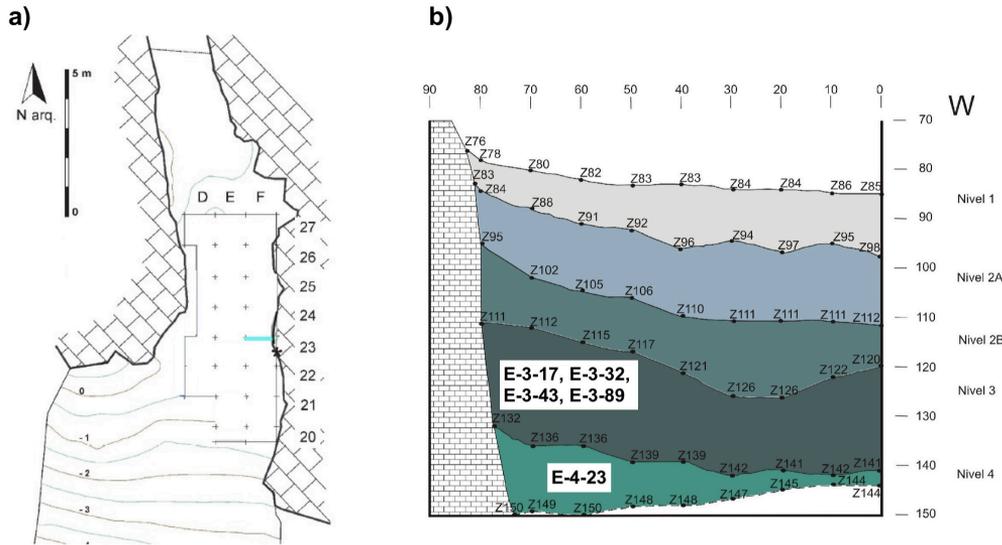


Figura 6. a) Planimetría de la excavación en la entrada de Cova Eirós (modificado de De Lombera-Hermida *et al.*, 2021). b) Sección sur de la cuadrícula F24 mostrando los niveles arqueológicos excavados hasta el 2020 (De Lombera-Hermida *et al.*, 2020).

por paleontólogos de la Universidade da Coruña entre los años 1989 y 1994 (Grandal-d'Anglade y Vidal, 1997).

En 1993, en la zona de la entrada, un equipo de la Universidad de Santiago de Compostela dirigido por el doctor. Juan Cano Pan, en el marco del «Proyecto Arqueológico Val do Sarria-Val do Mao», realizó una cata de 1 m², identificando hasta cinco niveles arqueológicos en los que se recuperaron 550 artefactos líticos, que permitieron asignar una cronología del Paleolítico superior inicial para los niveles II y III y del Paleolítico medio para el V (Cano y Nogueira, 1993).

A partir del 2008 y dentro del Proyecto de Investigación «Ocupaciones humanas durante el Pleistoceno de la cuenca Media del Miño», liderado desde la Universidad de Santiago de Compostela por el doctor Ramón Fábregas, junto al Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social (IPHES, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona), con el doctor Xosé Pedro Rodríguez, se realizan excavaciones en la zona de la entrada (fig. 6), donde se llegaron a reconocer diversos niveles arqueológicos. Los niveles 1 y 2 corresponden al Paleolítico superior, con industria auriñaciense con abundancia de hojitas. Diversas dataciones por OSL y ¹⁴C encuadran el nivel 2 en los últimos momentos del estadio Isotópico MIS 3. Los niveles 3 y 4 se encuadran en el Paleolítico medio, conteniendo industria de talla Levallois y discoide. Diversas dataciones ¹⁴C de restos óseos sitúan el nivel 3 en unos 41.000 años cal. BP, por lo tanto, sugiriendo una presencia tardía del Neandertal con respecto a otros yacimientos cantábricos (De Lombera-Hermida *et al.*, 2021).



Figura 7. Muestras de Cova Eirós sin identificación taxonómica incluidas en este estudio.

Las muestras seleccionadas para el estudio son cinco fragmentos de hueso que fueron objeto de datación por ^{14}C . Cuatro de las muestras proceden del nivel 3 y la última, del nivel 4. Estas muestras carecían de identificación taxonómica (fig. 7), y su colágeno fue objeto de estudio de huella peptídica para tratar de lograr su identificación. Las edades ^{14}C de las muestras y su calibración mediante el programa OxCal 4.4 (Bronk Ramsey, 2009) y la curva IntCal20 (Reimer *et al.*, 2020) a nivel sigma 95,4 se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Dataciones ^{14}C AMS de las muestras estudiadas procedentes de Cova Eirós y en edades ^{14}C BP y calibradas mediante OxCal 4.4 (Bronk Ramsey, 2009) con la curva IntCal 20 (Reimer *et al.*, 2020). ¿Ce?, posible *Cervus elaphus*. GM, gran mamífero. Referencias: 1, inédita. 2, Grandal-d'Anglade *et al.*, (2019). 3, De Lombera-Hermida (2020)

Muestra	Taxón	Edad ^{14}C	Referencia laboratorio	Edad cal. BP, desde	Edad cal. BP, hasta	Referencia
E-F25-N4-23	GM	35937±1195	Ua-39516	42720	38860	1
E-F24-N3-43	Ce?	29065±509	Ua-39515	34495	32030	2
E-F23-N3-17	GM	39100±1000	OxA-33343	44472	41988	3
E-F23-N3-32	GM	40500±1200	OxA-33341	45812	42384	3
E-F23-N3-89	GM	44000±1900	OxA-33342	54596	43952	3

2.2. Metodología

2.2.1. Pretratamiento de las muestras

De cada hueso se extrajo una muestra de aproximadamente 1 g con una herramienta manual equipada con disco de diamante. Se retiró mecánicamente el tejido esponjoso y concreciones superficiales, si había. El fragmento se enjuagó repetidamente en baño de ultrasonidos, sucesivamente en agua desionizada y acetona (un mínimo de cinco lavados en acetona y seis en agua, o más si fue necesario, hasta no observar turbidez), y luego se dejó secar en placas de Petri de vidrio que lo protegen de polvo y otras posibles contaminaciones, a temperatura ambiente y durante al menos 48 h. Para cada espécimen estudiado, se pulverizaron manualmente los fragmentos de hueso (alrededor de 500 mg) con mortero y mano de ágata (fig. 8). El polvo de hueso se tamizó para obtener la fracción menor o igual que 0,5 mm.

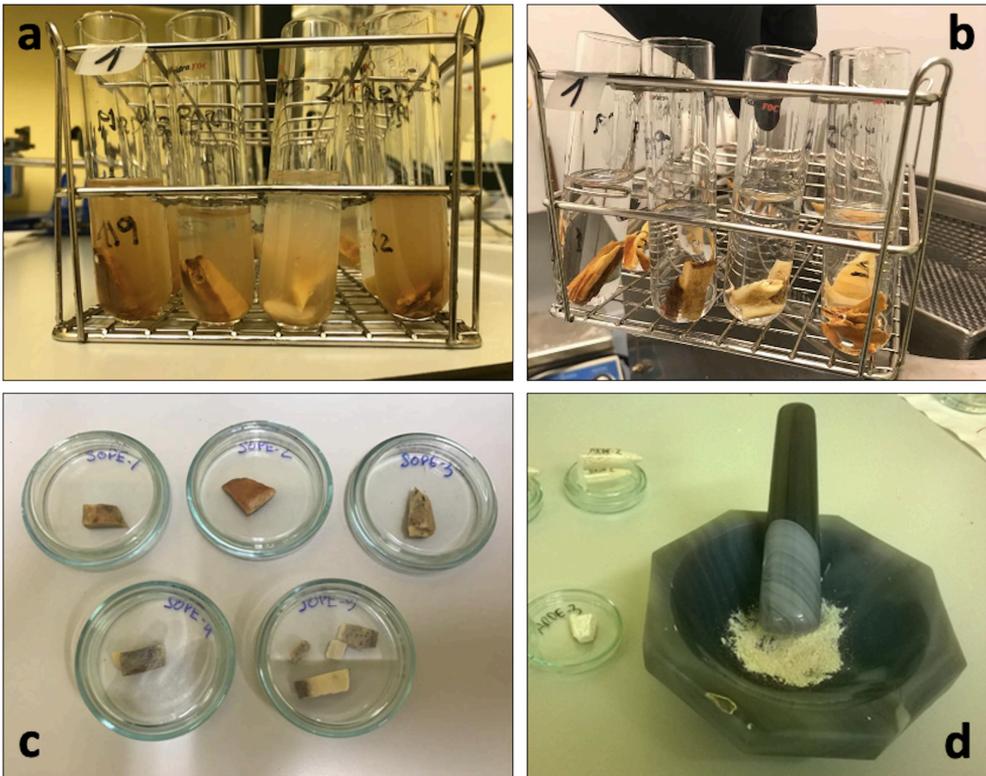


Figura 8. Pretratamiento de las muestras óseas: a) primer lavado en cubeta de ultrasonidos mostrando turbidez; b) aspecto de las muestras tras el último lavado; c) secado de las muestras en placas de Petri; d) pulverización manual en mortero de ágata.

2.2.2. Extracción de colágeno óseo

El protocolo de extracción de colágeno sigue un método modificado de Longin (1971), descrito en Bocherens *et al.* (1997), con modificaciones propias del Laboratorio de Paleontología Molecular del Instituto Universitario de Xeología de la Universidade da Coruña, laboratorio donde se realizó el tratamiento (fig. 9).

De cada muestra a estudiar se tomó una porción de entre 250 y 300 mg de polvo óseo, se desmineralizó en unos 30 ml de ácido clorhídrico 1 M durante 20 minutos, se lavó en agua desionizada hasta alcanzar un pH neutro y se filtró a través de filtros de nitrocelulosa (Sartorius Stedim®) de 5 μ de tamaño de poro.

El residuo sólido se digirió durante 21 horas a temperatura ambiente en 30 mL de hidróxido de sodio 0,125N para eliminar posibles contaminantes orgánicos, como grasas o ácidos húmicos. Tras el lavado a pH neutro y una nueva separación por filtración, la fracción sólida que contenía colágeno se solubilizó en 20 mL de ácido clorhídrico 0,1 M durante 17 horas a 90°, se filtró por tercera vez para eliminar partículas minerales insolubles, se congeló a -80 °C, se liofilizó y se pesó para calcular el rendimiento de la extracción.



Figura 9. Extracción del colágeno óseo: a) digestión ácida de polvo de hueso; b) filtración; c) solubilización del colágeno en estufa.

2.2.3. Control de la diagénesis

El colágeno de un resto arqueológico puede sufrir un deterioro de tipo diagenético, debido al paso del tiempo en que permanece enterrado y sometido a las condiciones sedimentarias, pero también puede deteriorarse, como proteína que es, debido a cambios en temperatura y humedad que ocurren tras su extracción del yacimiento. El deterioro puede ser por simple rotura de la molécula, por pérdidas de aminoácidos o átomos de sus moléculas en las zonas de rotura, o por adición de componentes ajenos al colágeno.

Todos estos procesos pueden influir en la composición isotópica del colágeno (Nelson *et al.*, 1986) o en su integridad, necesaria para la correcta realización del análisis de huella peptídica. Por ello es necesario comprobar la calidad del colágeno que se extrae del hueso fósil y tener en cuenta los posibles problemas en su preservación.

La calidad del colágeno extraído se mide mediante tres parámetros (Ambrose, 1991): el rendimiento de la extracción, medido en porcentaje de colágeno en hueso, debe superar 1,5 %. Además, los porcentajes de carbono y nitrógeno en el colágeno no deben ser inferiores a 13 % y 5 %, respectivamente (Van Klinken, 1999), e idealmente superar el 30 % de carbono y 11 % de nitrógeno (Bocherens *et al.*, 2005). Finalmente, la relación atómica C:N debe estar comprendida entre 2,9 y 3,6 (DeNiro, 1985) e idealmente entre 3,0 y 3,2 (Schwarcz y Nahal, 2021). Este dato se calcula mediante un análisis elemental de los elementos en cuestión (C y N) en el colágeno ya liofilizado.

2.2.4. ZooMS: Espectrometría de masas mediante MALDI-Tof

Para el análisis de huella peptídica o ZooMS, una alícuota de aproximadamente 1 mg del colágeno aislado de cada hueso se digirió con tripsina, que rompe los enlaces moleculares entre aminoácidos específicos (después de una lisina o una arginina, si no va seguida de prolina). De este modo, se obtuvo un conjunto de péptidos de diferente masa y carga (m/z), identificados por MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz, tiempo de vuelo). Este análisis se realizó en la Unidad de Espectrometría de Masas e Proteómica de la Rede de Infraestructuras de Apoio á Investigación e Desenvolvemento Tecnolóxico (RIAIDT) de la Universidade de Santiago de Compostela.

Para cada muestra, se disolvió una alícuota de 1 a 5 mg de colágeno liofilizado en un tampón de hidrogenocarbonato de amonio. Tras añadir tripsina, las muestras se digirieron a 37° C durante la noche. La solución de la muestra se mezcló con una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, aplicando 1 μ l de la mezcla sobre la placa MALDI.

Para llevar a cabo las mediciones de la huella peptídica, se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Bruker Ultraflex® III equipado con un láser smartbeam. El principio de este tipo de analizador es sencillo (fig. 10). Una vez introducida la mezcla colágeno-matriz en la fuente, se realizan disparos de láser que provocan la ionización suave de la mezcla. La ionización consiste en añadir protones desde la matriz, para que las molé-

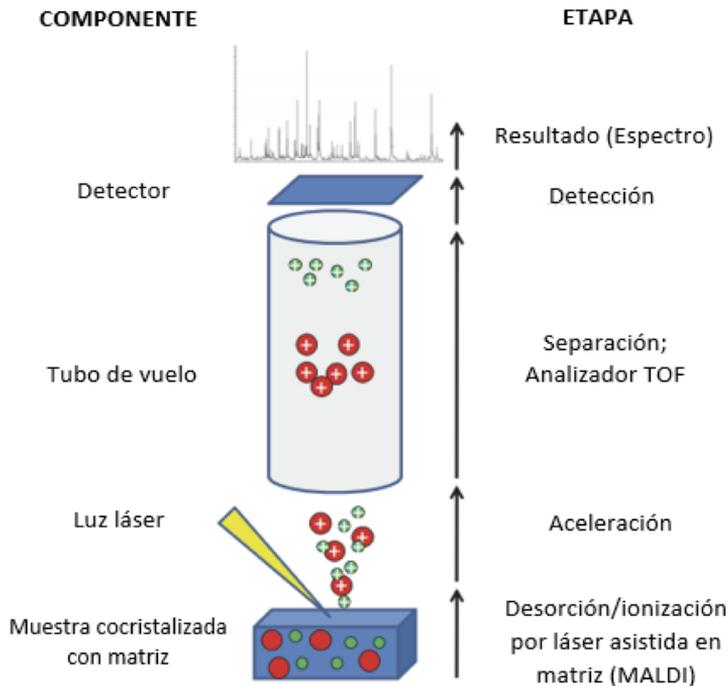


Figura 10. Esquema de funcionamiento del equipamiento MALDI-TOF.

culas adquieran una ligera carga positiva. Se usa una fuente de ionización suave mediante breves pulsos de láser, pues las moléculas grandes como los péptidos colagénicos tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

A continuación, una tensión de extracción induce la movilización de todos los péptidos simultáneamente. Estos pasarán a través de un campo electrostático acelerador, adquiriendo una alta energía cinética que los impulsa en la dirección del tubo de vuelo orientado hacia el detector. El tiempo de recorrido de la longitud del tubo de vuelo será directamente proporcional a la relación masa/carga (m/z) de los péptidos ionizados.

El espectro producido sirve para diferenciar los taxones, ya que algunos péptidos difieren en la relación m/z entre los taxones, funcionando como marcadores taxonómicos. Por lo general, se necesita una combinación de varios marcadores para identificar un taxón concreto.

2.3. Calidad del colágeno

La validez del estudio isotópico o la posibilidad de realizar la identificación taxonómica por huella peptídica depende de la calidad del colágeno extraído. Por ello, los datos de

Tabla 6. Datos relativos a la calidad del colágeno de las muestras de Cova Eirós: rendimiento expresado en porcentaje de colágeno en hueso, porcentajes de C y N en colágeno, y relación atómica entre C y N en el colágeno extraído. Las mediciones se hicieron por duplicado: en negrita se presenta el valor medio de ambas

Sigla	Taxón	% col.	% C col.	% N col.	C:N at.
E-F24-N3-43	<i>Cervus elaphus?</i>	10,0	40,1	14,6	3,2
			40,0	14,5	3,2
			40,1	14,6	3,2
E-F23-N3-89	mamífero talla grande	11,7	36,6	13,3	3,2
			36,7	13,3	3,2
			36,5	13,3	3,2
EF23-N3-17	mamífero talla grande	8,3	34,6	12,6	3,2
			34,3	12,4	3,2
			34,9	12,7	3,2
E-F23-N3-32	mamífero talla grande	12,1	34,6	12,6	3,2
			34,6	12,6	3,2
			34,6	12,6	3,2
E-F25-N4-23	mamífero talla muy grande	10,9	41,0	15,0	3,2
			40,4	14,8	3,2
			41,5	15,1	3,2
promedio		10,6	37,4	13,6	3,2
desv. típica		1,5	2,8	1,0	0,0
mínimo		8,3	34,3	12,4	3,2
máximo		12,1	41,5	15,1	3,2

rendimiento y la composición elemental del colágeno son parámetros de interés crucial. En la tabla 6 se muestran los resultados del rendimiento de la extracción de colágeno (en porcentaje de colágeno en hueso) y del análisis elemental del colágeno, además del cálculo de la relación C:N atómica en las muestras de Cova Eirós. Todas las muestras se analizaron por duplicado, y se ha calculado la media de ambas medidas.

Los valores alcanzados por todas las muestras indican una buena preservación del colágeno. El rendimiento supera en todos los casos el necesario para considerar que hay suficiente colágeno, con un promedio de 10,6 %. Los porcentajes de carbono y nitrógeno en el colágeno también superan el umbral mínimo en todos los casos, y la relación atómica C:N se encuentra dentro de los límites permitidos.

2.4. Análisis de huella peptídica

Los espectros de masa/carga (m/z) de los péptidos trípticos obtenidos de cada muestra se presentan en la tabla 7 y la fig. 11. En la tabla se listan solamente los péptidos con masa a partir de 1.000 Da, ya que los péptidos más pequeños no se consideran informativos. Se observa que algunas muestras presentan un número mayor de péptidos que otras. Para

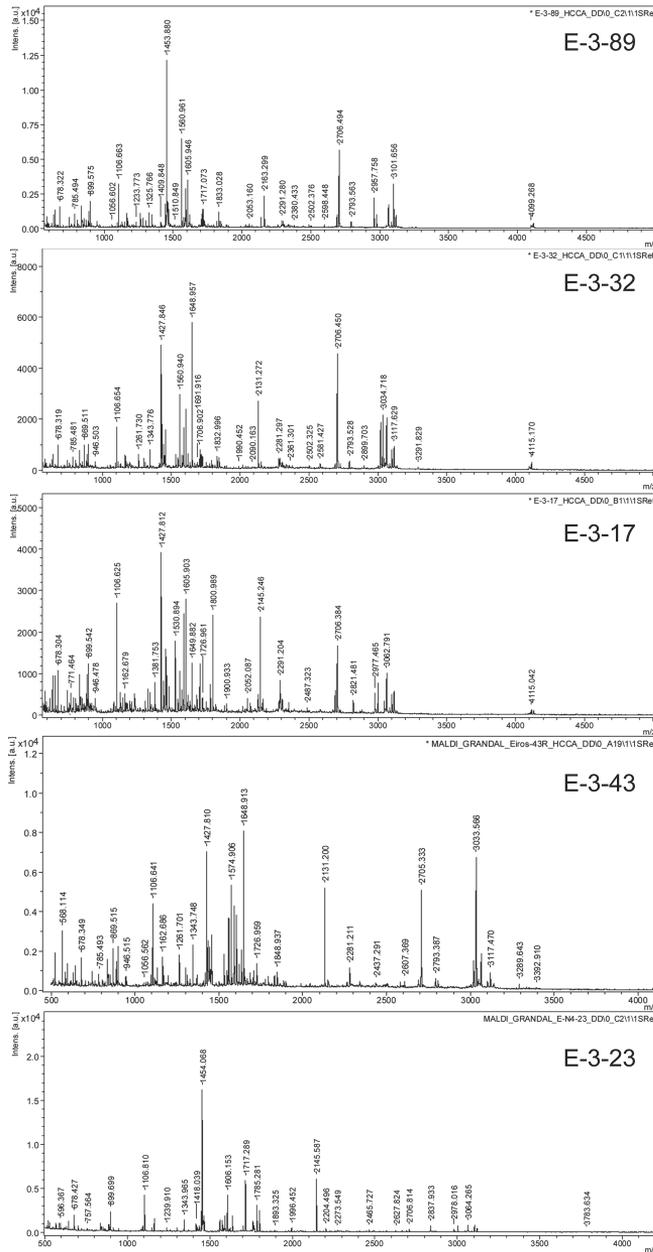


Figura 11. Espectros MALDI-TOF de las muestras analizadas, mostrando los picos de intensidad (eje vertical) con la que se registran los péptidos de masa/carga (m/z) creciente (eje horizontal). Es de destacar que los picos aparecen etiquetados de manera automática por el programa informático acoplado al espectrómetro, y no siempre están identificando péptidos de interés para fines taxonómicos.

Tabla 7. Listado completo de masa/carga de los péptidos tripticos obtenidos del colágeno de las muestras sin identificación taxonómica procedentes de Cova Eirós. Para mejor comprensión, se identifican con su denominación breve los que permiten identificar los taxones correspondientes

E-F24-N3-43	E-F23-N3-89	E-F23-N3-17	E-F23-N3-32	E-F25-N4-23
m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
1056,6	1056,6	1084,6	1095,6	1084,8
1078,6	1095,7	P1 1105,6	P1 1105,7	1091,9
1095,6	P1 1105,7	1106,6	1106,7	1095,8
P1 1105,7	1106,7	1127,6	1116,6	P1 1105,8
1106,6	1121,7	1132,5	1162,7	1106,8
1116,6	1132,6	1149,6	1163,7	1116,8
1121,7	1149,7	1162,7	1170,6	1149,8
1127,6	1162,7	1170,6	A 1197,7	1162,9
1133,6	1170,7	1178,6	1202,7	1163,8
1162,7	1184,7	A 1198,7	1261,7	1239,9
1163,7	1202,7	1214,7	1267,8	1261,9
1170,6	1214,7	1235,7	1301,7	1301,9
A 1197,7	A 1233,8	1239,7	1311,7	1339,9
1249,7	1261,7	1311,7	1343,8	1344
1261,7	1267,8	1329,7	1369,8	1370
1267,7	1281,7	1343,7	1417,8	1418
1301,7	1301,7	1355,7	B 1427,8	1426
1311,7	1325,8	1381,8	1435,8	1430
1328,7	1343,8	B 1427,8	1443,8	1438
1343,7	1369,8	1439,8	1446,9	1447,1
1369,7	1409,8	1446,8	1447,9	B 1454,1
1409,8	1417,9	1449,8	1449,8	1460
1417,8	1446,9	1459,8	1455,8	1466
1420,8	1447,9	1465,8	1459,8	1470,1
B 1427,8	B 1453,9	1483,8	1532,9	C 1551,1
1435,8	1459,8	1530,9	C 1550,9	1561,1
1439,8	1465,8	C 1550,9	1560,9	1563,2
1443,8	1469,9	1552,9	1562,9	1569,1
1446,8	1475,9	1562,9	1576,9	1576,1
1455,8	1510,8	1575,8	1586,9	1577,1
1459,8	1561	1577,8	1591,9	1585,1
1532,9	1563	1586,9	1592,9	1592,1
C 1550,8	C 1566,9	1591,8	1605,9	1593,1
1560,9	1576,9	1592,8	1621,9	1605,2
1574,9	1586,9	1605,9	1636,9	1606,2
1585,9	1592,9	1621,9	P2 1649,0	1607,1
1591,8	1594,9	1636,9	1655,9	1616,2
1604,9	1605,9	P2 1649,9	1670,9	1622,1
1621,9	1616	1650,8	1689	1637,1
1636,9	1621,9	1684,9	1691,9	1692,1
P2 1648,9	1636,9	1687	1706,9	1702,7
1655,9	1691,9	1690,9	1708,9	1717,3
1658,8	1706,9	1706,9	1717	1761,3
1670,9	1708,9	1727	1727	1769,3
1689	1717,1	1751,9	1751,9	1785,3

Tabla 7. Listado completo de masa/carga de los péptidos trípticos obtenidos del colágeno de las muestras sin identificación taxonómica procedentes de Cova Eirós. Para mejor comprensión, se identifican con su denominación breve los que permiten identificar los taxones correspondientes (*continuación*)

E-F24-N3-43	E-F23-N3-89	E-F23-N3-17	E-F23-N3-32	E-F25-N4-23
1717	1727	1785	1778,5	1801,3
1727	1737	1801	1794,5	1893,3
1731	1752	1823	1817	1996,5
1778,4	1778,5	1829	1833	2052,5
1794,4	1794,5	1886	1849	D 2145,6
1832,9	1817	1900,9	1902	2204,5
1848,9	1833	2021,1	1990,5	2273,5
1889	1849	2052,1	2021,1	2277,6
1900,9	1889,1	2074,1	2045	2293,6
D 2131,2	1901	2130,2	2059,1	2325,6
2151,1	2020,2	D 2145,2	2090,2	2465,7
2264,2	2029,1	2165,2	D 2131,3	2492,8
2281,2	2053,2	2167,2	2151,2	2570,8
2341,2	2075,1	2281,2	2281,3	2627,8
2437,3	2106,2	2284,2	2284,3	2663,8
2581,3	2135,2	2291,2	2290,2	2690,8
2607,4	D 2163,3	2306,2	2307,2	2706,8
2705,3	2263,3	2352,3	2337,3	2837,9
E 2793,4	2291,3	2487,3	2361,3	F 2870,0
2807,4	2297,3	2675,4	2380,4	2977
G 3017,5	2306,3	2690,4	2502,3	2978
G' 3033,6	2337,4	2706,4	2581,4	G 2984,1
3046,7	2352,4	2727,4	2690,4	G' 3000,1
3062,7	2380,4	E 2821,5	2706,5	3001,1
3102,5	2502,4	F 2883,6	2729,4	3048,3
3117,5	2598,4	2977,5	E 2793,5	3063,3
3139,6	2675,5	G 2999,6	F 2884,7	3064,3
3289,6	2690,5	3046,9	F' 2899,7	3102,1
3346,7	2706,5	3062,8	3003,6	3103,1
	2729,4	3085,6	3019,6	3118,1
	2793,6	3101,5	3031,7	3119,1
	E 2808,6	3117,5	G' 3034,7	3783,6
	F 2853,7	3134,5	3046,8	4431,2
	F' 2869,7	4106,2	3062,8	
	G 2957,8	4115	3069,7	
	2977,6	4130	3085,6	
	3062,9		3101,6	
	3069,7		3104,7	
	3085,6		3117,6	
	3101,7		3141,7	
	3117,7		3291,8	
	3123,6		4099,2	
	4099,3		4105,3	
	4105,3		4115,2	
	4115,2			
	4128,4			

Tabla 8. Péptidos con valor taxonómico identificados en los espectros MALDI-TOF de las muestras estudiadas. En negrita se identifican aquellos que presentan una unidad adicional por desamidación de la glutamina, una alteración diagenética habitual en restos arqueológicos. Un guión (-) indica la ausencia de péptidos que coincidan con alguno de los marcadores teóricos de cualquier taxón

	P1	A	A'	B	C	P2	D	E	F	F'	G	G'
E-3-43	1105	-	1197	1427	1550	1648	2131	2793	-	-	3017	3033
E-3-89	1105	-	1233	1453	1566	-	2163	2808	2853	2869	2957	-
E-3-17	1105	-	1198	1427	1550	1649	2145	2821	2883	-	-	2999
E-3-32	1105	-	1197	1427	1550	1649	2131	2793	2884	2899	-	3034
E-4-23	1105	-	-	1454	1551	-	2145	-	2870	-	2984	3000

mayor claridad, los péptidos identificados se etiquetan en esta tabla, aunque el significado de la combinación obtenida se discute con detalle más adelante.

Las figuras muestran los espectros peptídicos de cada muestra. Cada espectro registra la intensidad (eje vertical) con la que fue detectada cada péptido, y se ordenan en el eje horizontal según su creciente masa/carga. Es preciso destacar que el etiquetado de los péptidos en el espectro se realiza de forma automática por el programa informático acoplado al equipo MALDI-TOF y no representa necesariamente aquellos de mayor interés para este análisis.

Para realizar la atribución taxonómica de las muestras es necesario localizar la presencia de marcadores peptídicos entre todos los obtenidos. La tabla 8 presenta los valores de masa/carga obtenidos en estas muestras para los péptidos marcadores descritos en Welker *et al.* (2016). La identificación de taxones no tiene en cuenta solamente la presencia de una cierta variante, sino también la ausencia de otras posibles, para cada marcador.

Se observa que no todos los péptidos marcadores aparecen en todas las muestras. Esto es debido a que el colágeno fósil, aun cuando esté bien preservado como en la mayoría de estos casos, no se encuentra como molécula completa, sino que está hasta cierto punto fragmentado. De esta manera, cuando la tripsina rompe la molécula en las posiciones específicas, si la molécula ya estaba fragmentada, es posible que alguno de los péptidos quede desdoblado en fragmentos menores, que ya no se pueden identificar. Ocurre más frecuentemente con los péptidos de mayor longitud, como el F o el G. Este efecto se explica en la figura 12.

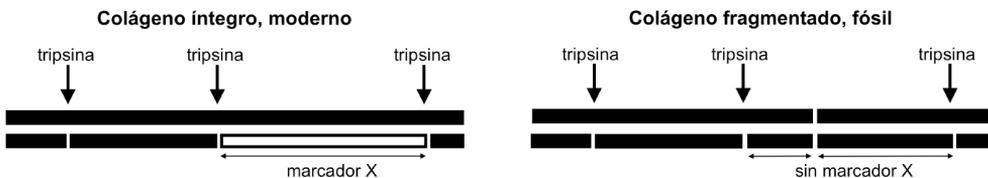


Figura 12. Esquema que representa el efecto de la fragmentación natural del colágeno antiguo sobre el resultado del análisis de huella peptídica.

En algunos casos también se observa que los valores de masa/carga están aumentados en una unidad (1 Da) con respecto a los marcadores publicados (Welker *et al.* 2016). Este aumento concreto en una unidad ocurre con frecuencia debido a una modificación puntual, más frecuente en los aminoácidos glutamina y asparagina, llamada *desamidación*. Este cambio químico consiste en la sustitución de un grupo de amoníaco (NH₃) por un grupo de agua (H₂O), lo que corresponde a un aumento global en la masa del aminoácido (por lo tanto, del péptido que lo contiene) de 1 Da (Robinson y Rudd, 1974). Es una modificación habitual en los restos de cierta antigüedad e incluso llegó a proponerse que podría servir como método de datación relativa (Wilson *et al.*, 2012) pero posteriormente se demostró que además de la antigüedad también influyen otros factores relacionados con los procesos diagenéticos (Welker *et al.*, 2017).

Finalmente, cabe destacar que no es necesario contar con la presencia de todos los péptidos específicos de un determinado taxón, sino simplemente con aquella combinación que permita la identificación hasta el rango más preciso posible. Es conveniente no dejar recaer la identificación en un solo péptido. Las combinaciones de marcadores peptídicos de cada muestra y su atribución taxonómica se discuten a continuación con más detalle.

2.5. Identificación taxonómica de los restos óseos

Muestra E-3-17. *Equus* sp.

Péptido	Variante	Posibles taxones
P1	1105	todos salvo cetáceos
A-A'	1198	<i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>
B	1427	bóvidos, cérvidos incluyendo <i>Rangifer</i> , <i>Equus</i> , <i>Castor</i>
C	1550	<i>Sus</i> , cérvidos, <i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>
P2	1649	<i>Equus</i>
D	2145	<i>Equus</i> , <i>Coelodonta/Diceros</i>
E	2821	carnívoros, <i>Equus</i>
F-F'	2883	lagomorfos, caprinos, <i>Sus</i> , cérvidos incl. <i>Rangifer</i> , <i>Equus</i> , <i>Castor</i>
G-G'	2999	mustélidos, félicos, <i>Crocota</i> , cánidos, <i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>

El péptido A-A' adquiere el valor 1198, exclusivo de ungulados perisodáctilos, representados por équidos y rinocerontes *sensu lato*. Lo mismo ocurre con el valor 2145 en el péptido D. Por lo tanto, la muestra podría pertenecer más probablemente a un équido o a un rinoceronte *s.l.* Según la tabla de referencia, solo existen entre ambas familias dos diferencias en sus marcadores peptídicos: en el péptido B (1427 en équidos y 1453 en rinocerontes *s.l.*) y en el P2, en el que los caballos presentan la variante 1649 (valor exclusivo de équidos) mientras que en algunos *Rhinocerotidae* se detecta el péptido 1623. Por lo tanto, la combinación formada por los péptidos A-A', B, P2 y D es suficiente para identificar la muestra como perteneciente al género *Equus*. Por el momento no existe la posibilidad de diferenciar, dentro de este género, las distintas especies que lo conforman.

Muestra E-3-32. *Megaloceros* o *Cervus elaphus*

Péptido	Variante	Posibles taxones
P1	1105	todos salvo cetáceos
A-A'	1197	caprinos, <i>Sus</i> , cérvidos, saiga
B	1427	bóvidos, cérvidos incl. <i>Rangifer</i> , saiga, <i>Equus</i> , <i>Castor</i>
C	1550	<i>Sus</i> , cérvidos, <i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>
P2	1649	cérvidos incluyendo <i>Rangifer</i>
D	2131	cánidos, bóvidos, <i>Sus</i> , cérvidos incl. <i>Rangifer</i> , saiga
E	2793	bóvidos, cérvidos, hipopótamo, saiga
F-F'	2884/2899	lagomorfos, caprinos, <i>Sus</i> , cérvido incl. <i>Rangifer</i> , saiga, <i>Equus</i>
G-G'	3034	bóvidos excepto <i>Capra</i> y <i>Bubalus</i> , cérvidos excepto <i>Capreolus</i> y <i>Rangifer</i> , <i>Sus</i> , hipopótamo

El valor alcanzado por el péptido B (1427) identifica esta muestra como un ungulado herbívoro, ya que es característico de las familias de los bóvidos, cérvidos o équidos, principalmente. El péptido A-A' (1196) restringe las posibilidades a caprinos (*Capra/Ovis/Rupicapra*) o cérvidos excepto el reno. El péptido C, por su parte (1550), excluye a los caprinos y nuevamente al reno. El péptido P2 alcanza un valor de 1629, exclusivo de cérvidos incluyendo el reno. Esta combinación hace que el único taxón posible sea el de cérvido. En esta categoría se agrupan todos los cérvidos salvo el reno (que difiere en el marcador A y en el C). El valor del péptido G (3033) permite excluir también al corzo (*Capreolus capreolus*). El alce (*Alces alces*) no se distribuyó en la península ibérica, o al menos no fue documentado en ningún yacimiento de la región cantábrica, al igual que el gamo (*Dama dama*), cuya presencia tampoco pudo ser confirmada (Mariezkurrena, 2011). Sin embargo, los marcadores de los cérvidos restantes (*Megaloceros* y ciervo) coinciden con los del antílope Saiga (*Saiga tatarica*), que no se puede excluir mediante este método. La escasez de este taxón en la península ibérica, solo documentado en el nivel E (Magdalenense medio) de Abauntz, en Navarra (Altuna y Mariezkurrena, 1996) permite descartar su presencia en Eirós y asumir que el resto pertenece a *Megaloceros* o *Cervus elaphus*.

Muestra E-3-43. *Megaloceros* o *Cervus elaphus*

Péptido	Variante	Posibles taxones
P1	1105	todos salvo cetáceos
A-A'	1196	caprinos, <i>Sus</i> , cérvidos, saiga
B	1427	bóvidos, cérvidos incl. <i>Rangifer</i> , saiga, <i>Equus</i> , <i>Castor</i>
C	1550	<i>Sus</i> , cérvidos, <i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>
P2	1648	cérvidos incl. <i>Rangifer</i>
D	2131	cánidos, bóvidos, <i>Sus</i> , cérvidos incl. <i>Rangifer</i> , saiga
E	2793	bóvidos, cérvidos, hipopótamo, saiga
F-F'	ausente	
G-G'	3017/3033	bóvidos excepto <i>Capra</i> y <i>Bubalus</i> , cérvidos excepto <i>Capreolus</i> y <i>Rangifer</i> , <i>Sus</i> , hipopótamo

Esta muestra arroja un resultado similar a E-3-32, salvo por la ausencia del péptido F-F'. Este péptido no es determinante para la identificación de la muestra como pertene-

ciente a un cérvido, y, como el caso anterior, lo identificamos como *Megaloceros* o ciervo (*Cervus elaphus*), ya que el péptido G-G' permite excluir al corzo.

Muestra E-3-43. *Megaloceros* o *Cervus elaphus*

Péptido	Variante	Posibles taxones
P1	1105	todos salvo cetáceos
A-A'	1233	<i>Ursus</i>
B	1453	lagomorfos, mustélidos, <i>Ursus</i> , felinos, cánidos, <i>Crocota</i> , <i>Sus</i> , <i>Rhinocerotidae</i> , proboscídeos
C	1566	lagomorfos, mustélidos, <i>Ursus</i> , felinos, cánidos, <i>Crocota</i> , pinnípedos
P2	ausente	
D	2163	<i>Felis/Lynx</i> , <i>Ursus</i>
E	2808	proboscídeos, ¿ <i>Ursus</i> ?
F-F'	2853	proboscídeos, carnívoros, bóvidos
G-G'	2957	lagomorfos, <i>Meles</i> , <i>Ursus</i> , primates, algunos pinnípedos

La presencia de la variante 1233 en el péptido A' señala que se trata de un oso, ya que ese péptido es exclusivo de úrsidos. El péptido D adquiere un valor 2163 exclusivo de úrsidos y *Felis* y *Lynx*, pero el péptido G excluye a los felinos. Los restantes marcadores son compatibles con *Ursus*. En principio no es posible mediante esta técnica diferenciar cuál es la especie de oso. Debido a la cronología de la muestra y a que procede en una cueva en la que la ocupación de oso cavernario fue intensa, podemos identificarlo con mayor probabilidad como un resto de esta especie, más que de oso pardo (*Ursus arctos*) que abunda más en el Holoceno de la región, expandiéndose en la época posglacial tras la extinción del oso cavernario (García-Vázquez *et al.*, 2019).

Muestra E-4-23. *Rhinocerotidae*

Péptido	Variante	Posibles taxones
P1	1105	todos salvo cetáceos
A-A'	ausente	
B	1454	proboscídeos, lagomorfos, múridos, <i>Ursus</i> , mustélidos, felinos, <i>Rhinocerotidae</i> , camélidos
C	1551	<i>Sus</i> , cérvido, <i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>
P2	ausente	
D	2145	<i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>
E	ausente	
F-F'	2870	<i>Rhinocerotidae</i> , algunos primates
G-G'	2984/3000	mustélidos, félidos, <i>Crocota</i> , cánidos, <i>Equus</i> , <i>Rhinocerotidae</i>

El péptido D adquiere el valor de 2145, exclusivo de ungulados perisodáctilos, es decir, con dedos impares, representados por équidos y rinocerontes *sensu lato*. Según la tabla de referencia, solo existen entre ambas familias dos diferencias en sus marcadores peptídicos: en el péptido B (1427 en équidos y 1453 en rinocerontes *s.l.*) y en el P2, en el que los caballos presentan la variante 1649, mientras que en algunos *Rhinocerotidae* (entre

ellos el rinoceronte lanudo, *Coelodonta antiquitatis*) se detecta el péptido 1623, solo existente también en manatíes (*Trichechus manatus*). En este caso, no disponemos del péptido P2 pero la combinación de variantes en los marcadores B y D es suficiente para indicar que se trata de un miembro de la familia *Rhinocerotidae*. La huella peptídica no permite diferenciar entre las distintas especies de rinocerontes que pudieron habitar la península ibérica durante el Pleistoceno superior, es decir el rinoceronte lanudo *Coelodonta antiquitatis* y el rinoceronte de nariz estrecha *Stephanorhinus hemitoechus*. El rinoceronte de Merck *S. kirchbergensis* no llegó a habitar la península ibérica (Cerdeño, 1990; Billia y Zervanová, 2015; Álvarez-Lao y Méndez, 2016).

3. Aplicaciones y limitaciones

3.1. Aplicaciones y primeros logros

Uno de los primeros logros obtenidos con el uso de ZooMS fue la posibilidad de resolver un problema clásico en la zooarqueología, como es la diferenciación entre oveja y cabra en restos óseos de ovicaprinos que morfológicamente no son diagnósticos (Buckley *et al.*, 2010). Este éxito aparentemente de escasa trascendencia ha permitido no solo conocer mejor la economía de muchas sociedades postpaleolíticas (por ejemplo, Grandal-d'Anglade *et al.* 2023; Viñas-Caron *et al.*, 2022), sino también hitos como la introducción de estos animales domésticos en otros continentes como en África (Le Meillour *et al.*, 2020), sobre todo cuando los avances de la técnica permitieron añadir marcadores para otros bóvidos silvestres de tamaño pequeño o medio (Coutu *et al.*, 2021; Janzen *et al.*, 2021).

Otro logro importante de esta técnica se obtuvo con su aplicación a un gran número de muestras óseas en el yacimiento de Denisova (Altai, Siberia) con el fin de recuperar restos de homínido a partir de cientos de fragmentos no identificables. El objetivo de este proyecto era incrementar el número de muestras humanas para su análisis genético. Además de lograr ese objetivo (Brown *et al.*, 2016), se obtuvieron cientos de espectros peptídicos que permitieron realizar un completo estudio zooarqueológico con materiales muy fragmentados que, de otra manera, no proporcionaban ninguna información de utilidad (Brown *et al.*, 2021b). Se abren así nuevas posibilidades de análisis, al poder incrementar el número de especies identificadas y otras métricas zooarqueológicas a partir de conjuntos óseos muy fragmentados. Por ejemplo, en el yacimiento del Paleolítico superior de Fumane (Italia), el uso de ZooMS descubrió que el número de elementos identificados como gran bóvido (*Bos/Bison*) era seis veces mayor que el calculado inicialmente solo por la morfología (Sinet-Mathiot *et al.*, 2019).

La optimización de la extracción de colágeno mediante técnicas mínimamente invasivas, como, por ejemplo, el uso de goma de borrar vinílica, también ofrece nuevas posibi-

lidades. La frotación de este material sobre la superficie del hueso produce una atracción electroestática que permite obtener moléculas de colágeno sin la destrucción apreciable de la muestra. De esta manera es posible identificar taxonómicamente el soporte de objetos de arte mueble, ya sean sobre hueso, marfil, asta (McGrath *et al.*, 2019; Martisius *et al.*, 2020), pieles o pergaminos, por ejemplo, ya que la piel también contiene una elevada proporción de colágeno (Amsgaard Ebsen *et al.*, 2019).

3.2. La validación de la técnica

Como cualquier técnica en desarrollo, la taxonomía por espectrometría de masas presenta aún algunas limitaciones. Que exista coincidencia en los valores de masa/carga no indica necesariamente que la secuencia de aminoácidos obtenida sea exactamente la correcta. Por ello es necesario conocer la secuencia de aminoácidos de cada uno de los marcadores de cada taxón.

Un primer paso para validar la técnica de ZooMS consiste en conocer la secuencia de aminoácidos de las cadenas 1 y 2 del colágeno de tipo 1 de los diversos taxones. Con estas secuencias, se puede predecir dónde va a actuar la tripsina y, por tanto, cuál va a ser el conjunto de péptidos que se puede obtener de su digestión. Este tipo de análisis se puede hacer *in silico*, es decir, recurriendo a las bases de datos que contienen este tipo de información y a herramientas informáticas. Por ejemplo, la base de datos UniProt Knowledgebase (UniProtKB), un nodo central del conocimiento sobre proteínas que proporciona una visión unificada de las secuencias de las proteínas y de su información funcional, puesto a disposición de forma gratuita por The UniProt Consortium en <https://www.uniprot.org/uniprot/> (Magrane, 2011). UniProtKB consta de dos secciones, UniProtKB/Swiss-Prot y UniProtKB/TrEMBL. La primera, UniProtKB/Swiss-Prot, se revisa manualmente, de modo que la información de cada entrada es corregida y anotada por un revisor. El principal problema es que abarca un número relativamente pequeño de taxones: solo están incluidos los más comunes (humanos, animales domésticos más habituales o de laboratorio, etc.). Los registros en UniProtKB/TrEMBL comprenden un número mayor de taxones, pero proceden de la traducción también *in silico*, automatizada, de la secuencia de bases del gen correspondiente. Así, un pequeño error en la secuenciación del ADN de los genes puede provocar una traducción automática errónea. Esto significa que no todos los registros de la base de datos de secuencias proteicas son fiables al cien por cien. Las secuencias publicadas en UniProtKB/TrEMBL necesitan una anotación o revisión manual completa. Esta limitación fue descrita en el caso de los úrsidos, donde se ha comprobado experimentalmente que algunos de los marcadores propuestos no coinciden con los que teóricamente se obtendrían según la secuencia proteica publicada en las bases de datos ni con los obtenidos experimentalmente a partir de un número elevado de muestras (García-Vázquez *et al.*, 2023). Es de esperar que, con los avances en estudios genéticos, cada vez más rápidos, se vayan

obteniendo secuencias confiables que puedan ser utilizadas como patrón, aún para las especies menos comunes.

Por otro lado, la coincidencia de valores de masa/carga puede enmascarar variaciones de interés taxonómico. Por ejemplo, dos péptidos con la misma cantidad de cada tipo de aminoácidos tendrán el mismo valor de masa/carga, aunque algunos aminoácidos aparezcan en distintas posiciones de la molécula. Actualmente, la verificación de los marcadores peptídicos se realiza mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem (LC/MS/MS). Esta potente técnica permite la secuenciación directa de proteínas, ya que no se basa simplemente en la masa total del péptido, como la técnica de ZooMS, sino también en la fragmentación secundaria de los péptidos para llegar a diferenciar cada aminoácido. De esta manera se pueden identificar y verificar los péptidos de relevancia taxonómica para cada taxón, para después ser utilizados a gran escala mediante la técnica convencional de huella peptídica, más simple y a menor coste.

3.3. La falta de resolución de la técnica en algunos taxones

Hemos visto en los resultados de nuestro ejemplo que la capacidad de discriminación de esta técnica es escasa en algunos taxones. En general, la especificidad de los marcadores es mínima dentro de un mismo género, como ocurre con las especies del género *Equus*. En otros casos, como el de los cérvidos, no es posible diferenciar incluso especies de géneros diferentes como el ciervo, el gamo, el alce o el megalocero. Aunque se puede recurrir al apoyo de la morfología o la distribución biogeográfica conocida de algunos taxones, en demasiadas ocasiones no es posible resolver la identificación de los pequeños fragmentos que no dan indicación alguna de la talla del animal, o en los casos en que el rango biogeográfico de varias especies puede solaparse.

Esta limitación, sin embargo, no es insalvable. En la actualidad se trabaja intensamente en la identificación de nuevos marcadores específicos para grupos taxonómicos menores. Por ejemplo, dentro de los bóvidos, se han descrito recientemente algunos marcadores que permiten diferenciar los caprinos domésticos de otros pequeños ungulados silvestres africanos (Coutu *et al.*, 2021; Janzen *et al.*, 2021). La posibilidad de solventar el problema de la falta de especificidad está condicionada a un mayor esfuerzo investigador que actualmente se está llevando a cabo y que, con toda probabilidad, irá dando sus frutos en los próximos años.

Una novedosa aproximación es la utilización de una enzima diferente a la tripsina para obtener los péptidos y localizar marcadores. Recientemente se ha probado a digerir la molécula de colágeno con quimotripsina, que rompe la molécula de colágeno en sitios específicos diferentes. De esta manera, se hacen visibles mínimas diferencias en la secuencia de aminoácidos que antes quedaban enmascaradas (por encontrarse en péptidos muy pequeños que no se tienen en cuenta, por ejemplo). Esta variante se ha aplicado a los équidos, permitiendo distinguir al caballo del asno (Paladugu *et al.*, 2023).

4. Conclusiones y futuras aproximaciones

El colágeno es una proteína que forma fibras que proporcionan elasticidad y resistencia al hueso. Como todas las proteínas está formado por secuencias de aminoácidos en un orden concreto. Protegido por la fracción mineral del hueso, el colágeno puede permanecer prácticamente inalterado durante miles de años en los huesos fósiles. Al tratarse de una proteína, el colágeno se sintetiza en las células a partir de la información contenida en el ADN. Por lo tanto, pequeñas variaciones en el ADN de distintos taxones producen diferencias en la secuencia de aminoácidos colagénicos.

La extracción del colágeno a partir del hueso se realiza mediante métodos físicos y químicos: disolución de los elementos minerales u orgánicos no deseados, su eliminación por filtración, y la gelatinización y liofilización final que permiten homogeneizar el colágeno extraído. En todo caso, es necesario comprobar, mediante ciertos parámetros, que el colágeno mantenga una buena preservación.

La técnica de ZooMS se ha convertido en una herramienta valiosa en la zooarqueología, permitiendo identificar taxones incluso a partir de restos óseos altamente fragmentados. Se basa en la comparación de espectros peptídicos obtenidos de colágeno óseo con espectros de referencia de diferentes taxones. Así, la proteómica se suma a los campos de la biología molecular con aplicación a los estudios del pasado.

Los retos actuales en el campo de ZooMS abarcan varios aspectos críticos, fundamentales para avanzar en nuestra comprensión de la fauna antigua. Estos aspectos son, en su mayoría, inherentes a la naturaleza misma de los restos arqueológicos y las técnicas de análisis empleadas. A continuación, profundizamos en los principales retos:

- Recuperar colágeno bien conservado: Uno de los desafíos más significativos en la zooarqueología basada en ZooMS radica en la obtención de colágeno bien conservado a partir de restos arqueológicos. El colágeno es la proteína clave para identificar taxones. Sin embargo, el colágeno es vulnerable a la degradación, y su supervivencia a lo largo del tiempo depende de una serie de factores ambientales, como la humedad, la temperatura y la geología del sitio arqueológico. Por lo tanto, desarrollar técnicas más efectivas para la preservación y recuperación de colágeno intacto es una necesidad apremiante. Esto podría incluir investigaciones sobre condiciones de almacenamiento ideales y protocolos de excavación específicos para la conservación de muestras.
- Contar con marcadores peptídicos validados para cada taxón: La precisión en la identificación taxonómica a través de la espectrometría de masas depende de la correcta definición de los marcadores peptídicos para cada taxón. A medida que la técnica de ZooMS se aplica a una gama de taxones cada vez mayor, es crucial desarrollar y validar marcadores específicos para cada grupo. Esto implica un proceso de investigación en el que se analizan muestras contemporáneas y antiguas de diversos taxones, generando una base de datos robusta de secuencias peptídicas. Cuanto más exhaustiva sea esta

base de datos, mejor equipados estaremos para identificar con precisión los restos arqueológicos y comprender la diversidad biológica del pasado.

- Disponer de una amplia base de datos de marcadores peptídicos que abarque un mayor número de taxones actuales y extintos. A medida que surgen nuevos descubrimientos paleontológicos y se realizan avances en la taxonomía, se hace necesario expandir y mantener actualizada esta base de datos. Los investigadores deben colaborar en la recopilación y el intercambio de información para garantizar que se incluyan múltiples especies y se responda a preguntas cada vez más complejas sobre la evolución y las interacciones entre los organismos a lo largo del tiempo.

Por último, cabe destacar que, en los últimos años, algunos equipos de investigación están haciendo esfuerzos para difundir las técnicas y aplicaciones de ZooMS. La publicación detallada de protocolos de laboratorio (Brown *et al.*, 2020) fue un primer paso para permitir que más equipos pudieran producir resultados comparables entre sí. La Universidad de York (Reino Unido) mantiene una base de datos en línea, actualizada puntualmente, con todos los marcadores publicados hasta el momento, no solo para mamíferos sino también para otros grupos, como aves o peces (<https://www.york.ac.uk/archaeology/about/research-centres/bioarch/research-themes/palaeoproteomics/>). La propuesta de estandarización de la nomenclatura de los péptidos (Brown *et al.*, 2021a) representó un hito y una referencia fundamental. Y aunque hace poco más de diez años que esta técnica se empleó por primera vez, ya empiezan a surgir trabajos de síntesis (Korzow Richter *et al.*, 2022; Warinner *et al.*, 2022) que ayudan a la comprensión y a la expansión de esta técnica.

Agradecimientos

Agradezco a los editores de *Pyrenae* haberme ofrecido la oportunidad de realizar este artículo. La investigación aquí expuesta ha sido realizada principalmente gracias a los proyectos de investigación de la Xunta de Galicia ED431B 2018/47 y ED431B 2021/17, concedidos a mi Grupo de Investigación (CulXeo, Grupo Interdisciplinar de Patrimonio Cultural e Xeolóxico) en la modalidad de Consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas do Sistema Universitario de Galicia. Así mismo, quiero agradecer al doctor Esteban Guitián Fernández, responsable de la Unidad de Espectrometría de Masas y Proteómica, del Área de Infraestructuras de Investigación de la Universidade de Santiago de Compostela, su colaboración en la puesta a punto del análisis de colágeno óseo mediante espectrometría de masas.

Bibliografía

- ALTUNA, J. y MARIEZKURRENA, K., 1996, Primer hallazgo de restos óseos de antílope Saiga (*Saiga tatarica* L.) en la Península Ibérica, *Munibe (Antropología-Arkeología)* 48, 3-6.
- ÁLVAREZ-LAO, D. J. y MÉNDEZ, M., 2016, Latitudinal gradients and indicator species in ungulate paleoassemblages during the MIS 3 en W Europe, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 449, 455-462. <<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2016.02.050>>
- AMBROSE, S. H., 1991, Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis, *Journal of Archaeological Science* 17, 431-451. <[https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90007-R](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90007-R)>
- AMSGAARD EBSSEN, J., KIRSTINE HAASE, K., RENÉ LARSEN, R., SOMMER, D. y ØRSTED BRANDT, L., 2019, Identifying archaeological leather – discussing the potential of grain pattern analysis and zooarchaeology by mass spectrometry (ZooMS) through a case study involving medieval shoe parts from Denmark, *Journal of Cultural Heritage* 39, 21-31. <<https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.04.008>>
- BILLIA, E. M. E. y ZERVANOVÁ, J., 2015, New *Stephanorhinus kirchbergensis* (Mammalia, Rhinocerotidae) records in Eurasia. Addenda to a previous work, *Gortania. Geologia, Paleontologia, Paleontologia* 36, 55-68.
- BOCHERENS, H., BILLIOU, D., PATOU-MATHIS, M., BONJEAN, D., OTTE, M. y MARIOTTI, A., 1997, Paleobiological Implications of the Isotopic Signatures (^{13}C , ^{15}N) of Fossil Mammal Collagen in Scladina Cave (Sclayn, Belgium), *Quaternary Research* 48, 370-380. <<https://doi.org/10.1006/qres.1997.1927>>
- BOCHERENS, H., DRUCKER, D., BILLIOU, D. y MOUSSA, I., 2005, Une nouvelle approche pour évaluer l'état de conservation de l'os et du collagène pour les mesures isotopiques (datation au radiocarbone, isotopes stables du carbone et de l'azote), *L'Anthropologie* 109, 557-567. <<https://doi.org/10.1016/j.anthro.2005.06.005>>
- BRITTON, K., GAUDZINSKI-WINDHEUSER, S., ROEBROEKS, W., KINDLER, L. y RICHARDS, M., 2012, Stable isotope analysis of well-preserved 120,000-year-old herbivore bone collagen from the Middle Palaeolithic site of Neumark-Nord 2, Germany reveals niche separation between bovinds and equids, *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 333-334, 168-177. <<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2012.03.028>>
- BRONK RAMSEY, C., 2009, Bayesian analysis of radiocarbon dates, *Radiocarbon* 51(1), 337-360. <<https://doi.org/10.1017/S0033822200033865>>
- BROWN, S., HIGHAM, T., SLON, V., PÄÄBO, S., MEYER, M., DOUKA, K., BROCK, F., COMESKEY, D., PROCOPIO, N., SHUNKOV, M., DEREVIANKO, A. y BUCKLEY, M., 2016, Identification of a new hominin bone from Denisova Cave, Siberia using collagen fingerprinting and mitochondrial DNA analysis, *Scientific Reports* 6, 23559. <<https://doi.org/10.1038/srep23559>>
- BROWN, S., HEBESTREIT, S., WANG, N., BOIVIN, N., DOUKA, K. y KORZOW RICHTER, K., 2020, Zooarchaeology by Mass Spectrometry (ZooMS). Pretreatment protocols for bone material, *Protocols.io*. <[dx.doi.org/10.17504/protocols.io/bf5dj26](https://doi.org/10.17504/protocols.io/bf5dj26)>
- BROWN, S., DOUKA, K., COLLINS, M. J. y KORZOW RICHTER, K., 2021a, On the standardization of ZooMS nomenclature, *Journal of Proteomics* 235, 104041. <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104041>>
- BROWN, S., WANG, N., OERTLE, A., KOZLIKIN, M. B., SHUNKOV, M. V., DEREVIANKO, A. P., COMESKEY, D., JOPE-STREET, B., HARVEY, V.L., CHOWDHURY, M. P., BUCKLEY, M., HIGHAM, T. y DOULA, K., 2021b, Zooarchaeology through the lens of collagen fingerprinting at Denisova Cave, *Scientific Reports* 11, 15457. <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-94731-2>>
- BUCKLEY, M., 2018, Zooarchaeology by Mass Spectrometry (ZooMS) Collagen Fingerprinting

- for the Species Identification of Archaeological Bone Fragments, en C. M. GIOVAS y M. J. LEFEBVRE (eds.), *Zooarchaeology in Practice, Case Studies in Methodology and Interpretation in Archaeofaunal Analysis*, Springer, Nueva York, 227-247. <<https://doi.org/10.1007/978-3-319-64763-0>>
- BUCKLEY, M., COLLINS, M., THOMAS-OATES, J. y WILSON, J. C., 2009, Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 3843-3854. <<https://doi.org/10.1002/rcm.4316>>
- BUCKLEY, M. y COLLINS, M. J., 2011, Collagen survival and its use for species identification in Holocene-lower Pleistocene bone fragments from British archaeological and paleontological sites, *Antiqua* 1, 1-7. <<https://doi.org/10.4081/antiqua.2011.e1>>
- BUCKLEY, M., LARKIN, N. y COLLINS, M., 2011, Mammoth and Mastodon collagen sequences; survival and utility, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 2007-2016. <<https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.01.022>>
- BUCKLEY, M., WHITCHER KANSA, S., HOWARD, S., CAMPBELL, S., THOMAS-OATES, J. y COLLINS, M., 2010, Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide, *Journal of Archaeological Science* 37, 13-20. <<https://doi.org/10.1016/j.jas.2009.08.020>>
- CANO, J. A. y NOGUEIRA, S., 1993, Intervención arqueológica en Cova Eirós, *Furada* 1, 35-37.
- CERDEÑO, E., 1990, *Stephanorhinus hemitoechus* (Falc.) (Rhinocerotidae, Mammalia) del Pleistoceno medio y superior de España, *Estudios geológicos* 46(5-6), 465-479. <<https://dx.doi.org/10.3989/egol.90465-6475>>
- COUTU, A. N., TAUROZZI, A. J., MACKIE, M., JENSEN, T., COLLINS, M. J. y SEALY, J., 2021, Palaeoproteomics confirm earliest domesticated sheep in southern Africa ca. 2000 BP, *Scientific Reports* 11, 6631. <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85756-8>>
- CROCKETT, J. C., ROGERS, M. J., COXON, F. P., HOCKING, L. J. y HELFRICH, M. H., 2011, Bone remodelling at a glance, *Journal of Cell Science* 124, 991-998. <<https://doi.org/10.1242/jcs.063032>>
- DAVIES, J. E. y HOSSEINI, M. M., 2000, Histodinamics of endosseous wound healing, en J. E. DAVIES (ed.), *Bone Engineering*, Em Squared Inc, Toronto, 1-14.
- DE LOMBERA-HERMIDA, A., RODRÍGUEZ ÁLVAREZ, X.-P., AMEIJENDA-IGLESIAS, A., DÍAZ-RODRÍGUEZ, M., REY-RODRÍGUEZ, I., VALVERDE TEJEDOR, I., PÉREZ-ALBERTI, A., CUNHA, P., BAL GARCÍA, H., ALDEA MOREIRA, X., LORENZO SALGUEIRO, C., MOSQUERA CASTRO, T. y FÁBREGAS-VALCARCE, R., 2021, Between two worlds: Cova Eirós and the Middle-Upper Palaeolithic transition in NW Iberia, *Comptes Rendus Palevol*, 20 (42), 859-886. <<https://doi.org/10.5852/cr-palevol2021v20a42>>
- DE LOMBERA-HERMIDA, A., RODRIGUEZ-ALVAREZ, X. P., VALVERDE TEJEDOR, I. y FÁBREGAS-VALCARCE, R., 2020, Entre dos mares. Los últimos neandertales y los primeros artistas del yacimiento de Cova Eirós (Lugo, Galicia), en *Actualidad de la investigación arqueológica en España II (2019-2020)*, Conferencias impartidas en el Museo Arqueológico Nacional, Ministerio de Cultura y Deporte, Madrid, 185-202.
- DENIRO, M. J., 1985, Post-mortem preservation and alteration of *in vivo* bone collagen isotope ratios in relation to palaeodietary reconstruction, *Nature* 317, 806-809. <<https://doi.org/10.1038/317806a0>>
- DENIRO, M. J. y EPSTEIN, S., 1981, Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45(3), 341-351 <[https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90244-1)>
- DOBBERSTEIN, R. C., COLLINS, M. J., CRAIG, O. E., TAYLOR, G., PENKMAN, K. E. H. y RITZ-TIMME, S., 2009, Archaeological collagen: Why worry about collagen diagenesis?, *Archaeological and Anthropological Sciences* 1, 31-42. <<https://doi.org/10.1007/s12520-009-0002-7>>

- EASTOE, J. E., 1955, The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin, *Biochemical Journal* 61 (4), 589-600. <<https://doi.org/10.1042/bj0610589>>
- GARCÍA-VÁZQUEZ, A., PINTO-LLONA, A. C. y GRANDAL-D'ANGLADE, A., 2019, Post-glacial colonization of Western Europe brown bears from a cryptic Atlantic refugium out of the Iberian Peninsula, *Historical Biology* 31 (5), 618-630. <<https://doi.org/10.1080/08912963.2017.1384473>>
- GARCÍA-VÁZQUEZ, A., PINTO-LLONA, A. C., MAROTO, J., TORRES, T. y GRANDAL-D'ANGLADE, A., 2023, Characterising the cave bear *Ursus spelaeus* Rosenmüller by ZooMS: a review of peptide mass fingerprinting markers. *Earth and Environmental Science, Transactions of The Royal Society of Edinburgh* 1-11. <<https://doi.org/10.1017/S1755691023000038>>
- GRANDAL-D'ANGLADE, A., 1993, *El Oso de las Cavernas en Galicia: el yacimiento de Cova Eirós*, Serie Nova Terra 8, Edición do Castro, A Coruña.
- GRANDAL-D'ANGLADE, A., PÉREZ RAMA, M., GARCÍA-VÁZQUEZ, A., GONZÁLEZ FORTES, G. y FERNÁNDEZ MOSQUERA, D., 2011, Upper Pleistocene cave bears from Galicia (NW of the Iberian Peninsula): a palaeoenvironmental approach, en A. DE LOMBERA-HERMIDA y R. FÁBREGAS-VALCARCE (eds.), *To the West of Spanish Cantabria: the Palaeolithic Settlement of Galicia*, BAR, International series 2283, Oxford, 25-38.
- GRANDAL-D'ANGLADE, A. y VIDAL ROMANÍ, J. R., 1997, A population study on the Cave Bear (*Ursus spelaeus* Ros.-Hein.) from Cova Eirós (Triacastela, Galicia, Spain), *Geobios*, 30(5), 723-731. <[https://doi.org/10.1016/S0016-6995\(97\)80160-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6995(97)80160-X)>
- GRANDAL-D'ANGLADE, A., GARCÍA-VÁZQUEZ, A., MORENO-GARCÍA, M., PEÑA-CHOCARRO, L., SANJURJO-SÁNCHEZ, J. y MONTERO-FENOLLÓS, J. L., 2023, Stable Isotopes and Herding Strategies in Middle Uruk Period in Tell Humeida (Syrian Euphrates Valley), *Diversity* 15(6), 709. <<https://doi.org/10.3390/d15060709>>
- GRANDAL-D'ANGLADE, A., PÉREZ-RAMA, M., GARCÍA-VÁZQUEZ, A. y GONZÁLEZ-FORTES, G., 2019, The cave bear's hibernation: reconstructing the physiology and behaviour of an extinct animal, *Historical Biology* 31 (4), 429-441. <<https://doi.org/10.1080/08912963.2018.1468441>>
- HENRIKSEN, K. y KARSDAL M. A., 2019, Chapter 1 - Type I collagen, en M. A. KARSDAL (ed.), *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* (Second Edition), Academic Press, Londres, 1-12. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817068-7.00001-X>>
- JAMES, P., QUADRONI, M., CARAFOLI, E. y GONNET, G., 1993, Protein identification by mass profile fingerprinting, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 195 (1), 58-64. <<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2009>>
- JANZEN, A., RICHTER, K. K., MWEBI, O., BROWN, S., ONDUSO, V., GATWIRI, F., NDIEMA, E., KATONGO, M., GOLDSTEIN, S. T., DOUKA, K. y BOIVIN, N., 2021, Distinguishing African bovids using Zooarchaeology by Mass Spectrometry (ZooMS): New peptide markers and insights into Iron Age economies in Zambia, *PLoS ONE* 16, e0251061 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251061>>
- KATZENBERG, M. A. y WATERS-RIST, A., 2019, Stable Isotope Analysis: A Tool for Studying Past Diet, Demography, and Life History, en M. A. KATZENBERG y A. GRAUER (eds.), *Biological Anthropology of the Human Skeleton*, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York, 467-504.
- KORZOW RICHTER, K., CODLIN, M. C., SEABROOK, M. y WARINNER, C., 2022, A primer for ZooMS applications in archaeology, *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA* 119 (20) e2109323119. <<https://doi.org/10.1073/pnas.2109323119>>
- KUHN, K., 1987, The classical collagens: types I, II and III, en R. MAYNE y R. BURGESSON (eds.), *Structure and Function of Collagen Types*, Academic Press, Nueva York, 1-42. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-481280-2.50005-2>>
- LE MEILLOUR, L., ZIRAH, S., ZAZZO, A., CERSONY, S., DÉTROIT, F., IMALWA, E., LEBON, M.,

- NANKELA, A., TOMBRET, O., PLEURDEAU, D. y LESUR, J., 2020, Palaeoproteomics gives new insight into early southern African pastoralism, *Scientific Reports* 10, 14427. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71374-3>>
- LEE, Y. C., CHIANG, C. C., HUANG, P. Y., CHUNG, C. Y., HUANG, T. D., WANG, C. C., CHEN, C. I., CHANG, R. S., LIAO, C. H. y REISZ, R. R., 2017, Evidence of preserved collagen in an Early Jurassic sauropodomorph dinosaur revealed by synchrotron FTIR microspectroscopy, *Nature Communications* 8, 14220. <<https://doi.org/10.1038/ncomms14220>>
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D. y DARNELL, J., 2000, *Molecular Cell Biology*, 4ª edición, W. H. Freeman, Nueva York.
- LONGIN, R., 1971, New method of collagen extraction for radiocarbon dating, *Nature* 230, 241-242. <<https://doi.org/10.1038/230241a0>>
- MAGRANE, M. y UNIPROT CONSORTIUM, 2011, UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data, *Database*, 2011, bar009. <<https://doi.org/10.1093/database/bar009>>
- MARIEZKURRENA, K., 2011, Hallazgos de macromamíferos poco frecuentes en yacimientos arqueológicos y paleontológicos del Pleistoceno de la región cantábrica, *Kobie. Serie Paleoantropología* 30, 83-110.
- MARTISIUS, N. L., WELKER, F., DOGANDŽI, T., GROTE, M., RENDU, W., SINET-MATHIOT, V., WILCKE, A., MCPHERRON, S., SORESSI, M. y STEELE, T., 2020, Non-destructive ZooMS identification reveals strategic bone tool raw material selection by Neandertals, *Scientific Reports* 10, 7746. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64358-w>>
- McGRATH, K., ROWSELL, K., GATES ST-PIERRE, C., 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, 11027.
- NELSON, B. K., DeNIRO, M. J., SCHOENINGER, M. J. y De PAOLO, D. J., 1986, Effects of diagenesis on strontium, carbon, nitrogen and oxygen concentration and isotopic composition of bone, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50, 1941-1949. <[https://doi.org/10.1016/0016-7037\(86\)90250-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(86)90250-4)>
- OLSEN, J. V., ONG, SHAO-EN, O. y MANN, M., 2004, Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues, *Molecular y Cellular Proteomics* 3 (6), 608-614. <<https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>>
- OSTROM, P., SCHALL, M., GANDHI, H., SHEN, T., HAUSCHKA, P., STRAHLER, J. y GAGE, D., 2000, New strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 1043-1050. <[https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00381-6)>
- PALADUGU, R., KORZOW-RICHTER, K., VALENTE, M. J., GABRIEL, S., DETRY, C., WARINNER, C. y BARROCAS DIAS, C., 2023, Your horse is a donkey! Identifying domesticated equids from Western Iberia using collagen fingerprinting, *Journal of Archaeological Science* 149, 105696. <<https://doi.org/10.1016/j.jas.2022.105696>>
- PAPPIN, D. J., HOJRUP, P. y BLEASBY, A. J., 1993, Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting, *Current Biology* 3 (6), 327-332. <[https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90195-T](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90195-T)>
- REIMER, P. J., AUSTIN, W. E., BARD, E., BAYLISS, A., BLACKWELL, P. G., RAMSEY, C., BUTZIN, M., CHENG, H., EDWARDS, R. L., FRIEDRICH, M., GROOTES, P. M., GUILDERSON, T. P., HAJDAS, I., HEATON, T. J., HOGG, A. G., HUGHEN, K. A., KROMER, B., MANNING, S. W., MUSCHELER, R., PALMER, J. G., PEARSON, C., VAN DER PLICHT, J., REIMER, R. W., RICHARDS, D. A., SCOTT, E. M., SOUTHON, J. R., TURNEY, C. S. M., WACKER, L., ADOLPHI, F., BÜNTGEN, U., CAPANO, M., FAHRNI, S. M., FOGTMANN-SCHULZ, A., FRIEDRICH, R., KÖHLER, P., KUDSK, S., MIYAKE, F., OLSEN, J., REINIG, F., SAKAMOTO, M., SOOKDEO, A. y TALAMO, S., 2020, The IntCal20 Northern

- Hemisphere radiocarbon age calibration curve (0–55 cal. kBP), *Radiocarbon* 62 (4), 725-757. <<https://doi.org/10.1017/rdc.2020.41>>
- ROBINSON, A. B. y RUDD, C. J., 1974, Deamidation of Glutaminyl and Asparaginyl Residues in Peptides and Proteins, *Current Topics in Cellular Regulation* 8, 247-295. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152808-9.50013-4>>
- RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, X. P., DE LOMBERA-HERMIDA, A., FÁBREGAS-VALCARCE, R. y LAZUÉN FERNÁNDEZ, T., 2011, The Upper Pleistocene site of Cova Eirós (Triacastela, Lugo, Spain), en A. DE LOMBERA-HERMIDA y R. FÁBREGAS-VALCARCE (eds.), *To the West of Spanish Cantabria: the Palaeolithic Settlement of Galicia*, BAR, International series 2283, Oxford, 123-133.
- SCHWARCZ, H. P. y NAHAL, H., 2021, Theoretical and observed C/N ratios in human bone collagen, *Journal of Archaeological Science* 131, 105396. <<https://doi.org/10.1016/j.jas.2021.105396>>
- SCHWEITZER, M. H., ZHENG, W., ORGAN, C. L., AVCI, R., SUO, Z., FREIMARK, L. M., LEBLEU, V. S., DUNCAN, M. B., VANDER HEIDEN, M. G., NEVEU, J. M., LANE, W. S., COTTRELL, J. S., HORNER, J. R., CANTLEY, L. C., KALLURI, R. y ASARA, J. M., 2009, Biomolecular Characterization and Protein Sequences of the Campanian Hadrosaur *B. canadensis*, *Science* 324 (5927), 626-631. <<https://doi.org/10.1126/science.1165069>>
- SHOULDERS, M. D. y RAINES, R. T., 2009, Collagen structure and stability, *Annual Reviews in Biochemistry* 78, 929-958. <<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>>
- SINET-MATHIOT, V., SMITH, G. M., ROMANDINI, M., WILCKE, A., PERESANI, M., HUBLIN, J. J. y WELKER, F., 2019, Combining ZooMS and zooarchaeology to study Late Pleistocene hominin behaviour at Fumane (Italy), *Scientific Reports* 9, 12350. <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48706-z>>
- VAN KLINKEN, G. J., 1999, Bone Collagen Quality Indicators for Palaeodietary and Radiocarbon Measurements, *Journal of Archaeological Science* 26, 687-695. <<https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0385>>
- VIÑAS-CARON, L. C., AGUILERA, I., JAKOB, T., WALSER, J., SPINDLE, L., FONTANALS-COLL, M. y ALEXANDER, M., 2022, Human and animal subsistence in northern Iberia during the Late Chalcolithic-Bronze Age: biomolecular insights from Muela de Borja, Ebro Valley, *Archaeological and Anthropological Sciences* 14(6), 105. <<https://doi.org/10.1007/s12520-022-01550-1>>
- WARINNER, C., KORZOW RICHTER, K. y COLLINS, M. J., 2022, Paleoproteomics *Chemical Reviews* 122(16), 13401-13446. <<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00703>>
- WELKER, F., HAJDINJAK, M., TALAMO, S., JAOUEN, K., DANNEMANN, M., DAVID, F., JULIEN, M., MEYER, M., KELSO, J., BARNES, I., BRACE, S., KAMMINGA, P., FISCHER, R., KESSLER, B. M., STEWART, J. R., PÅÅBO, S., COLLINS, M. J. y HUBLIN, J. J., 2016, Palaeoproteomic evidence identifies archaic hominins associated with the Châtelperronian at the Grotte du Renne, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 113, 11162-11167. <<https://doi.org/10.1073/pnas.1605834113>>
- WELKER, F., SORESSI, M., ROUSSEL, M., VAN RIEMSDIJK, I., HUBLIN, J. J. y COLLINS, M. J., 2017, Variations in glutamine deamidation for a Châtelperronian bone assemblage as measured by peptide mass fingerprinting of collagen, *Science and Technology in Archaeological Research (STAR)* 3 (1), 15-27. <<https://doi.org/10.1080/20548923.2016.1258825>>
- WILSON, J., VAN DOORN, N. L. y COLLINS, M. J., 2012, Assessing the extent of bone degradation using glutamine deamidation in collagen, *Analytical Chemistry* 84, 9041-9048. <<https://doi.org/10.1021/ac301333t>>
- YAMAUCHI, M. y SRICHOLPECH, M., 2012, Lysine post-translational modifications of collagen, *Essays in Biochemistry* 52, 113-133. <<https://doi.org/10.1042/bse0520113>>

