

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS RÁPIDAS BASADAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN RESTOS HUMANOS

Miguel del Nogal Sánchez¹, Ana María Casas Ferreira¹, Ángel Esparza Arroyo², Javier Velasco Vázquez³, Angélica Santa Cruz del Barrio^{2,4}, Verónica Alberto Barroso⁵, Teresa Delgado Darias⁶, José Luis Pérez Pavón¹

¹Dept. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Salamanca.

²Dept. de Prehistoria, Historia Antigua y Arqueología. Universidad de Salamanca. ³Servicio de Patrimonio Histórico. Cabildo de Gran Canaria. ⁴Dept. de Prehistoria, Arqueología, Antropología Social y C.C. y T.T. Historiográficas. Universidad de Valladolid. ⁵Tibicena. Arqueología y Patrimonio. ⁶El Museo Canario

1. Introducción

A finales del año 2019, algunos compañeros del Departamento de Prehistoria de la Universidad de Salamanca, a través del Dr. Ángel Esparza, nos indicaron su interés por la determinación del sexo de ciertos individuos de la Prehistoria Reciente en la submeseta norte ibérica. El Dr. Esparza nos indicó que entender el sexo de los individuos en la prehistoria es crucial por varias razones:

(1) Proporciona información básica sobre la estructura social y las dinámicas de género, así como sobre prácticas funerarias y rituales relacionados con la muerte.

(2) Ayuda a reconstruir la demografía y la historia de poblaciones antiguas, permitiendo trazar patrones de migración y establecer relaciones genéticas.

En resumen, conocer el sexo de los individuos en la prehistoria es fundamental para comprender aspectos clave de la vida y la cultura de nuestros antepasados.

Su idea inicial era enviar las muestras al extranjero para llevar a cabo los análisis, pero ciertas coincidencias, que no vienen al caso, nos pusieron en el mismo camino y aceptamos el reto. Para ello debíamos realizar un análisis de algunos péptidos presentes en el esmalte dental [1,2].

La amelogenina es una de las proteínas que intervienen en la formación del esmalte dental. Su gen codificante se sitúa en los cromosomas sexuales, X e Y, con dos isoformas o variantes, AMELX y AMELY, respectivamente. En restos prehistóricos, donde los tejidos viables pueden estar deteriorados o ausentes, el análisis de los péptidos derivados de la amelogenina del esmalte dental se vuelve de gran valor para determinar el sexo de los individuos frente al análisis de ADN tradicional. Esta técnica es particularmente útil en contextos arqueológicos donde los restos óseos están fragmentados o incompletos, ya que el esmalte dental tiende a preservarse mejor que otros tejidos. Además, proporciona una manera no invasiva de determinar el sexo de los individuos sin dañar los restos, lo que es importante para la conservación del patrimonio arqueológico.

2. Trabajo experimental

Los péptidos que analizamos fueron dos, AMELX-(44-52) y AMELY-(58-64), que corresponden a la secuencia de aminoácidos SIRPPYPSY y SM_(ox)IRPPY, respectivamente [1,2]. La asignación de sexo se basó en la presencia/ausencia de estos péptidos. Esto es, aquellos individuos que presentaban ambos péptidos se asignaron como masculinos, mientras que en el caso de presentar únicamente el péptido AMELX-(44-52) (ausencia de la isoforma AMELY, codificada por el cromosoma sexual Y) fueron asignados como femeninos. Para su análisis, se utilizó inicialmente una modificación de un método previamente publicado por Steward y colaboradores [1,2]. Brevemente, la estrategia de preparación de muestra consta de las siguientes etapas (Fig. 1): el esmalte dental se lava con una disolución de H₂O₂ y, posteriormente, se enjuaga con agua ultrapura. A continuación, se añaden 60 µL de una disolución de HCl al 5 % (v/v) en la tapa de un tubo Eppendorf y en un primer ataque se pone en contacto una parte del esmalte dental con la disolución ácida durante 2 min. Posteriormente, se hace un segundo ataque sobre la misma porción de la muestra con otros 60 µL de HCl. Estos 60 µL se toman como disolución de trabajo. Con el objetivo de concentrar los péptidos, se utilizan puntas de pipeta Zip-Tip® que contienen un sorbente apolar C18. Terminado el proceso de acondicionamiento del sorbente, se extraen los péptidos de la disolución de trabajo y se eluyen e inyectan en el sistema cromatográfico.

El análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución, utilizando una fuente de ionización por electrospray y un analizador tipo Orbitrap (LC-ESI-HRMS), adaptándose las condiciones de los estudios previos mencionados. Se analizaron 16 piezas dentales correspondientes casi todas al grupo Cogotas I (Edad del Bronce), incluyendo otras cinco ligeramente más antiguas (del Calcolítico y Bronce Antiguo) a fin de evaluar posibles efectos de la mayor o menor antigüedad de los dientes en los resultados analíticos.

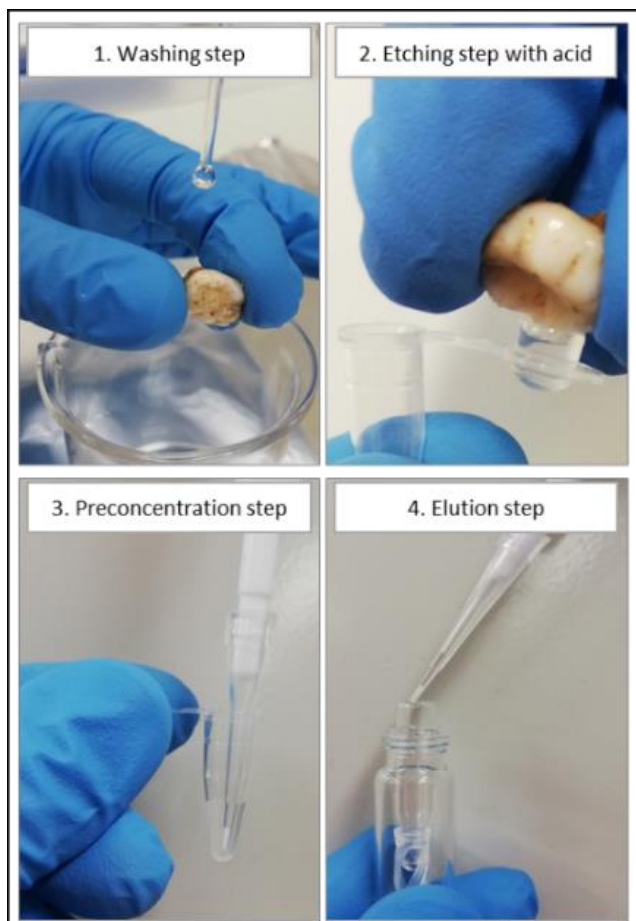


Fig. 1. Etapas involucradas en el tratamiento de muestra [3].

3. Resultados

Fruto de este trabajo se publicó un artículo de investigación [4] donde se compararon los resultados analíticos con los obtenidos mediante análisis osteológico. En muchos casos no se disponía de tal resultado al tratarse de individuos subadultos. El análisis antropológico para identificar el sexo en muestras de huesos no es posible para subadultos debido a que muchas características sexuales secundarias, utilizadas en la determinación del sexo en adultos, no se desarrollan completamente hasta la adolescencia (las características sexuales dimórficas presentes en el esqueleto no se desarrollan completamente hasta que no se alcanza la madurez sexual, por tanto, el diagnóstico en individuos subadultos es prácticamente imposible). Esto dificulta la precisión del análisis antropológico en este grupo de edad, provocando que un buen número de subadultos se clasifiquen como individuos de sexo indeterminado. El resto de las muestras fueron adultos con sexo osteológico diagnosticado y los resultados obtenidos con ambas metodologías coincidían excepto en una de ellas (Tabla 1).

La discrepancia encontrada en la muestra 6 demostró el grado de incertidumbre que a veces presentan los

procedimientos de diagnóstico bioantropológico y que, con cada vez mayor frecuencia, puede ser corregida con un método fiable y accesible como el que se presenta en este trabajo. La nueva asignación del sexo de este individuo hace que ahora concuerde con la tendencia observada en la posición en la que el cuerpo fue inhumado (sobre su costado derecho, como suele ser más habitual en los individuos de sexo masculino en Cogotas I). La excepción que tras el primer diagnóstico constituía este enterramiento, ahora es corregida por el análisis proteómico, ayudando a una mejor comprensión de la norma del comportamiento mortuario de Cogotas I en su diversidad de manifestaciones arqueológicas.

Tabla 1. Resultado de los análisis LC-MS y estimaciones bioantropológicas previas. (F: femenino; M: masculino, *: indeterminados con edad estimada de muerte) [4].

Muestra	Sexo	
	LC-MS	Antropológico
1	F	Indeterminado
2	M	M (25-35 años)
3	M	Indeterminado* (6-8 años)
4	F	¿F? (18-25 años)
5	F	F (18-25 años)
6	M	¿F? (17-20 años)
7	M	Indeterminado* (5-6 años)
8	F	Indeterminado* (6-7 años)
9	M	Indeterminado* (2-4 años)
10	F	Indeterminado* (7-11 meses)
11	M	M (20-25 años)
12	-	Indeterminado
13	M	M (18-25 años)
14	F	Indeterminado* (8-9 años)
15	F	Indeterminado* (6-8 años)
16	-	Indeterminado

A pesar de los buenos resultados obtenidos con el método utilizado, éste presentaba varios inconvenientes, como un elevado tiempo de análisis por muestra que rondaba los 100 minutos y la necesidad de disponer de equipos de espectrometría de masas de alta resolución. Basándonos en nuestra experiencia previa en el desarrollo de métodos rápidos de análisis [5-11] y con el objetivo de desarrollar una nueva metodología rápida y más accesible a laboratorios que quieran llevar a cabo este análisis, desarrollamos dos métodos rápidos no separativos para el análisis de estas muestras. Los tiempos de análisis fueron inferiores a 3 min y además se evaluó la posibilidad de utilizar un espectrómetro de masas de baja resolución [3]. Para comprobar la validez de ambos métodos, los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos mediante el método LC-ESI-HRMS anteriormente utilizado, analizando el mismo conjunto de muestras.

El procedimiento de preparación de muestra fue el mismo que en el primer trabajo (Fig. 1). Sin embargo, en este caso el análisis del extracto se llevó a cabo mediante análisis por inyección en flujo acoplado a un espectrómetro de masas con una fuente de electrospray y dos analizadores, uno de alta resolución (Orbitrap, FIA-ESI-HRMS) y otro de baja resolución (triple cuadrupolo, FIA-ESI-MS/MS).

En el caso de FIA-ESI-HRMS, la detección de los péptidos se llevó a cabo utilizando el modo combinado Full MS (250-650 m/z) y Parallel Reaction Monitoring (PRM) utilizando como ion precursor los cationes moleculares diprotonados $[M+2H]^{2+}$ de ambos analitos y una energía de colisión normalizada de 20%. Para la identificación de los péptidos se utilizó el ion quasi-molecular (Full MS) y tres transiciones en PRM. El tiempo de análisis fue 3.0 min y el tiempo entre inyecciones 4,4 min.

Cuando se utilizó la metodología FIA-ESI-MS/MS, se seleccionaron tres transiciones por cada uno de los péptidos objeto de estudio. El tiempo de análisis fue 1,0 min y el tiempo entre inyecciones 2,1 min.

En la Fig. 2. se muestra un esquema de las configuraciones utilizadas.

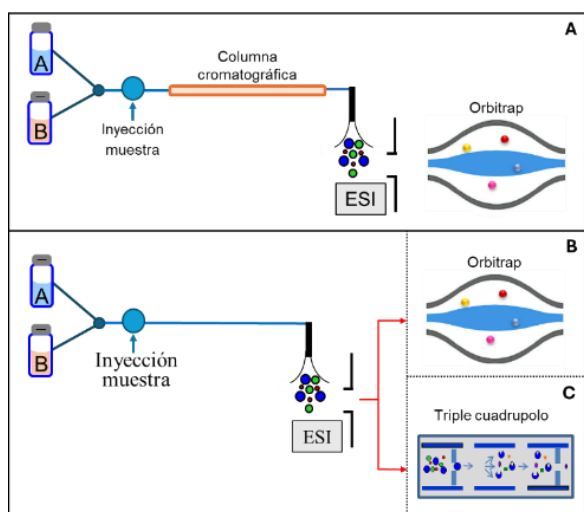


Fig. 2. Diagrama de las configuraciones instrumentales utilizadas: (A) LC-ESI-HRMS, (B) FIA-ESI-HRMS y (C) FIA-ESI-MS/MS.

Los resultados obtenidos mostraron una total coherencia entre ellos, siendo la asignación de sexo coincidente entre las metodologías no separativas y la metodología separativa anteriormente descrita (Tabla 1). Estos resultados validan ambas metodologías para llevar a cabo un análisis rápido de las muestras. Además, los resultados obtenidos con el analizador de triple cuadrupolo son análogos a los obtenidos con el Orbitrap, abriendo la posibilidad de llevar a cabo este análisis en equipos más accesibles en los laboratorios debido a su precio. En la Fig. 3. se muestran los registros obtenidos mediante FIA-ESI-MS/MS en dos dientes (muestra 6 y muestra 8).

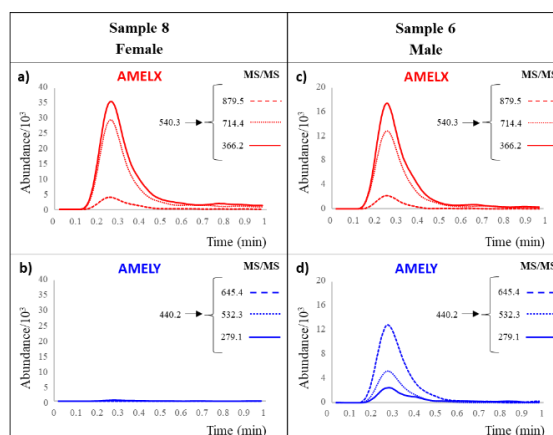


Fig. 3. Señales MS/MS para las transiciones correspondientes a AMELX-(44-52) para la muestra 8 (a) y 6 (c). Señales MS/MS para las transiciones seleccionadas para AMELY-(58-64) para la muestra 8 (b) y 6 (d) [3].

En la Fig. 4. se muestra un diagrama donde se comparan los tiempos de análisis requeridos para cada una de las metodologías desarrolladas. Como puede observarse, los tiempos se reducen drásticamente, siendo posible analizar 23 y 48 muestras utilizando los métodos FIA-ESI-HRMS y FIA-ESI-MS/MS, respectivamente, en el tiempo necesario para analizar una muestra utilizando el método cromatográfico.

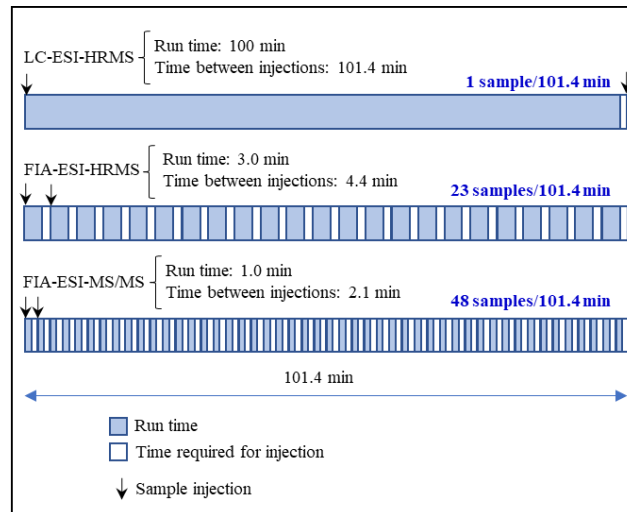


Fig. 4. Diagrama del tiempo requerido para el análisis de muestra y número de muestras analizadas en el tiempo requerido para llevar a cabo el análisis mediante LC-ESI-HRMS [3].

Los resultados obtenidos muestran claramente que es posible llevar a cabo el análisis de los péptidos objeto de estudio en tiempos menores y con una instrumentación más sencilla que los originalmente requeridos. Esto simplifica enormemente el análisis y lo hace más accesible a los laboratorios que deseen llevar a cabo este tipo de estudios.

4. Interés y aplicación de los métodos desarrollados



Fig.5. Fotografías de las muestras analizadas (A). Ataque del esmalte en la pieza dental sin extraer (B).

El trabajo realizado ha suscitado un elevado interés en el área de la arqueología prehistórica. Como se ha explicado, los datos demográficos relativos al sexo de los individuos procedentes de contextos funerarios son imprescindibles para interpretar las sociedades del pasado, pero a menudo las colecciones arqueológicas se presentan muy fragmentadas y mal conservadas. Así pues, se ha continuado colaborando en trabajos de diagnóstico sexual a partir del esmalte en diferentes grupos de población arqueológica, como ha sido el caso de colecciones megalíticas de la submeseta norte, donde el análisis osteológico generalmente apunta a una mayoría de integrantes masculinos. También se siguen explorando las prácticas funerarias asociadas a Cogotas I, para lo cual se ha planificado un muestreo sistemático de todos los individuos extraídos de yacimientos de Edad del Bronce y depositados en Museos de Castilla y León. Esta tarea ha

sido especialmente viable gracias a que la técnica de extracción de péptidos es muy poco invasiva y permite conservar la pieza dental analizada.

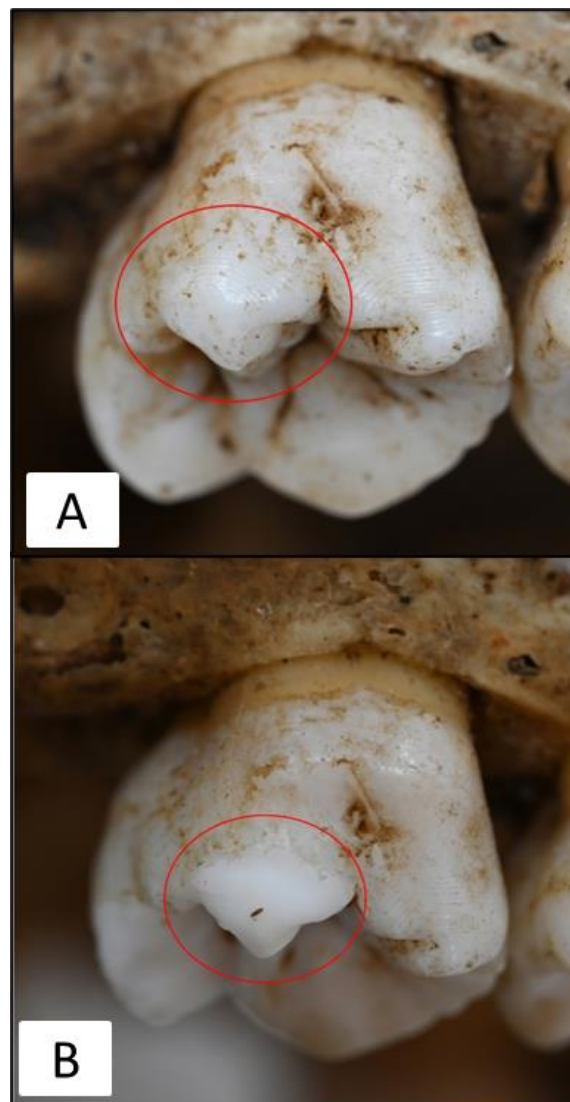


Fig. 6. Estado del diente antes (A) y después (B) del ataque ácido.

Por último, también se está trabajando en poblaciones arqueológicas de las islas Canarias. Una parte importante de dichas colecciones son individuos subadultos de sexo osteológico indeterminado y su clasificación sexual a partir del análisis proteómico será fundamental para la interpretación de las formas de vida y prácticas sepulcrales de la población indígena canaria.

En la Fig. 5. se muestran las muestras analizadas, observándose que es posible llevar a cabo el ataque ácido del esmalte sin necesidad de extraer la pieza dental. En la Fig. 6. se muestra el estado del esmalte en la etapa previa y posterior del ataque. Como se ha comentado anteriormente, la técnica de extracción de péptidos es muy poco invasiva y permite conservar la pieza dental analizada.

Agradecimientos

Este último trabajo está enmarcado en el proyecto "Semántica de la violencia en las sociedades indígenas de Canarias" (PID2022-1424190B-I00) financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100 011033 / FEDER, UE, que tiene como objetivo estudiar la violencia en función de las categorías de sexo como medio para contribuir al conocimiento de la construcción de las relaciones sociales de género.

Referencias

- [1] N.A. Stewart, G.F. Molina, J.P. Mardegan Issa, N.A. Yates, M. Sosovicka, A.R. Vieira, S.R.P. Line, J. Montgomery, R.F. Gerlach, The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human surface tooth enamel following a simple acid etch extraction, *RSC Adv.* 6 (2016) 61673–61679. <https://doi.org/10.1039/c6ra05120k>
- [2] N.A. Stewart, R.F. Gerlach, R.L. Gowland, K.J. Gron, J. Montgomery, Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114 (2017) 13649–13654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714926115>
- [3] A.M. Casas-Ferreira, M. del Nogal-Sánchez, Á. Esparza Arroyo, J. Velasco Vázquez, J.L. Pérez-Pavón, Fast methods based on mass spectrometry for peptide identification. Application to sex determination of human remains in tooth enamel, *Microchem. J.* 181 (2022) 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107645>
- [4] Á. Esparza Arroyo, J. Velasco Vázquez, M. del Nogal Sánchez, A.M. Casas Ferreira, J.L. Pérez Pavón, Una contribución a la problemática del sexo bioantropológico mediante análisis proteómico del esmalte dental de restos humanos de la Prehistoria reciente de la submeseta norte ibérica, *Trab. Prehist.* 79 (2022) 274–290. <https://doi.org/10.3989/tp.2022.12299>
- [5] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Development of a screening and confirmatory method for the analysis of polar endogenous compounds in saliva based on a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric system, *J. Chromatogr. A.* 1590 (2019) 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.001>
- [6] A.M. Casas-Ferreira, M. del Nogal-Sánchez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-cordero, J.L. Pérez-Pavón, Determination of leucine and isoleucine/allo-isoleucine by electrospray ionization-tandem mass spectrometry and partial least square regression: Application to saliva samples, *Talanta.* (2020) 120811. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120811>
- [7] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, J.L. Pérez Pavón, Combining Orbitrap-HRMS acquisition modes and direct injection by a guard column for targeted analysis of underivatized amino acids in urine, *Microchem. J.* 196 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109663>
- [8] P. Martín Santos, M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Non-separative method based on a single quadrupole mass spectrometer for the semi-quantitative determination of amino acids in saliva samples. A preliminary study, *Talanta.* 208 (2020) 120381. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120381>
- [9] P. Martín Santos, M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Quantitative and qualitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine samples using a non-separative method based on mass spectrometry, *Talanta.* 181 (2018) 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.032>
- [10] M. del Nogal Sánchez, E. Hernández García, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva, *Anal. Chem.* 84 (2012) 379–385. <https://doi.org/10.1021/ac2026892>
- [11] M. del Nogal Sánchez, P.A. Callejo Gómez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Á.P. Crisolino Pozas, Á. Sánchez Rodríguez, Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed temperature vaporizer, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7890–7898. <https://doi.org/10.1021/ac501917a>