

Sección S1. Protocolos de procesamiento de las muestras

Toma de muestras. Las muestras fueron obtenidas con la menor invasividad posible, raspando suavemente los elementos óseos y sectores seleccionados con la punta esterilizada de una espátula metálica dental de acero inoxidable. La espátula fue cuidadosamente limpiada entre cada toma de muestra, primero con alcohol al 70% y luego con alcohol al 96%. Cada toma se realizó en mesadas descontaminadas y sobre fragmentos de láminas de aluminio descartables. Todo el procedimiento se realizó con vestimenta apropiada para evitar la contaminación (guantes de látex descartables libres de polvo Top Glove Sdn Bhd, guardapolvo, etc.) y con la menor circulación de aire posible dentro del recinto. Todo el procedimiento fue registrado fotográficamente, antes y después de cada toma, para dejar constancia del grado de alteración mecánica alcanzado. El polvo resultante de la toma fue conservado en tubos plásticos sellados a 4°C hasta su procesamiento.

Extracción de proteínas. Todo el procedimiento se realizó en un laboratorio (CEQUIBIEM) preparado específicamente para análisis proteómicos. Las superficies de vidrio y acero, las pipetas y los equipos utilizados son limpiados regularmente, según corresponda, con acetonitrilo (Merck), acetona (Cicarelli) o metanol (Carlo Erba). En todo momento el operador permaneció en silencio, con guardapolvo, redujo al mínimo sus movimientos y evitó la circulación de aire. La manipulación se hizo con guantes de látex libres de polvo, que fueron cambiados regularmente a lo largo del procedimiento. Tanto los reactivos como el material plástico descartable utilizados son libres de queratinas y se encuentran almacenados en condiciones especiales para evitar contaminaciones. Se aplicaron dos protocolos diferentes para evaluar su efectividad. Cada muestra fue dividida en mitades, cada una de las cuales recibió uno de los dos protocolos. En todo el procedimiento se utilizó plástico libre de queratinas y agua desionizada producida con sistema MilliQ (Millipore) con una resistividad aproximada de 18,2MΩ·cm. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 16100g a 4°C. Luego de aplicar el protocolo de extracción, las muestras fueron conservadas liofilizadas a 4°C para su posterior análisis por espectrometría de masas.

Protocolo 1: mezcla de extracción (Mix). A cada muestra se le agregó 200µL de mezcla de extracción (Mix) conteniendo ditioneitol (DTT, Sigma) 50mM, urea (Sigma) 8M, tiourea (Sigma) 2M, dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma) 0,1%, Tris-HCl (Promega) 50mM pH 8,8. Se sonicó por 20 minutos y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Luego se agregó 5µL de DTT 1M a cada muestra y se incubó 90 minutos a 56°C con agitación fuerte. Se agregó 10µL de iodacetamida (IAA, Sigma) 550mM y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. La proteína fue precipitada con tres volúmenes de acetona, incubación toda la noche a -20°C y posterior centrifugación por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó con acetona helada. Luego del secado se agregó a cada muestra 96µL de bicarbonato de amonio (ABC, Baker) 50mM y 0,4µg de tripsina (Promega, V5111); se resuspendió por sonicación y se incubó toda la noche a 37°C. La reacción fue frenada con 4µL de ácido trifluoroacético (TFA, Carlo Erba), centrifu-

gada para eliminar los sólidos remanentes y los sobrenadantes desalados a través de una micro columna de C18 y posteriormente liofilizados.

Protocolo 2: desmineralización con HCl. Este protocolo es una adaptación del utilizado en Buckley y Collins (2011). A cada muestra se le agregó 1000µL de HCl (Carlo Erba) 0,6N. Se sonicó y se incubó toda la noche a 4°C. Se centrifugó y se secó. Para neutralizar el HCl se agregó a cada muestra 100µL de ABC 500mM. Se resuspendió por sonicación y se incubó toda la noche a 70°C con agitación fuerte. Se centrifugó y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. Se agregó 4µL de DTT 1M e incubó 60 minutos a 56°C con agitación suave. Luego, se agregó 4µL de IAA 550mM y se incubó 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se precipitó con ácido tricloracético (TCA, Sigma) en hielo para eliminar las sales y tener mejor control del pH de la reacción. Se centrifugó y se limpió el precipitado con acetona helada. Tras el secado se agregó a cada muestra 48µL de ABC 50mM y 0,2µg de tripsina y se incubó toda la noche a 37°C. Se frenó la reacción con 2µL de TFA. Las muestras fueron luego desaladas a través de microcolumnas de C18 y liofilizadas.

Análisis por espectrometría de masas. Los productos de digestión desalados fueron analizados por nanoLC-MS/MS en un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas QExactive. Se utilizó un gradiente de 120 minutos. Se usó, como solvente A, 0,1% ácido fórmico (AF, Carlo Erba) en agua (Merck) y, como solvente B, 0,1% AF en acetonitrilo (ACN, Merck) a un flujo de 200nL/min con una columna C18, EASY-Spray Accucore (P/N ES801) de 2µm, 100A, 75µm x 150mm. El volumen de inyección fue de 5µL y el gradiente utilizado de 5% B (5 minutos) a 35% B (105 minutos) y 95% B (120 minutos). Se utilizó un espectrómetro de masas con una celda de fragmentación por colisión y un analizador de tipo Orbitrap (Thermo Scientific, Q-Exactive). Los péptidos que eluyeron de la cromatografía se ionizaron por electrospray (3,5kV). En cada ciclo se realizó un espectro de MS completo (Full MS-resolución 70000), se fragmentaron los quince péptidos más intensos y se obtuvieron sus MSMSs (resolución 17500) con un rango de exclusión dinámica para evitar que un mismo pico sea fragmentado más de una vez en el mismo pico de elución del cromatograma. Con los datos generados, se identificaron los péptidos y se asignaron a proteínas con los criterios que se detallan en Materiales y Métodos.

Control de contaminación. De rutina en nuestro laboratorio se hacen digestiones estandarizadas en paralelo a las muestras que se procesan. En este caso se hizo una digestión de un extracto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* WT1115. La búsqueda contra *Homo sapiens* (UP000005640) en el software *Proteome Discoverer* bajo las mismas condiciones con las que se buscaron las otras muestras arroja unas pocas queratinas humanas. Las queratinas poseen una cantidad de PSMs relativamente baja para tratarse de contaminación. Las proteínas de *Heat shock*, que tienen una cantidad de PSMs notable, presentan péptidos que no son exclusivos de humanos en tanto sus secuencias están compartidas con *Saccharomyces cerevisiae*, y probablemente provengan de ese organismo.

Búsquedas complementarias. Como se trata de muestras arqueológicas, el paso del tiempo y otros factores diagenéticos pueden haber fragmentado las proteínas presentes. La digestión con tripsina es posible que genere péptidos trípticos completos así como péptidos con un extremo que proviene de rotura espontánea, por lo cual realizamos búsquedas con semitripsina.

Para descartar la posibilidad de que los huesos muestreados pertenecieran a otros animales hicimos búsquedas sobre grandes agregados de proteomas (utilizando el taxón "mamíferos" como criterio) que no aportaron al análisis.

Las búsquedas contra una serie de microorganismos causantes de patologías (*Ascaris lumbricoides*, *Echinococcus granulosus*, *Escherichia coli*, virus de la influenza A (varias

cepas), B y C, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium sp.*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Staphylococcus aureus*, *Treponema pallidum*, *Trichuris trichiura*, virus de la varicela y *Vibrio cholerae* serotipo O1, no arrojaron resultados positivos.

Sección S2. Modelo celular y molecular de reparación de una fractura ósea

El hueso es un tejido dinámico con procesos de remodelación y regeneración constante ya sea en respuesta al estrés mecánico o para la reparación de fracturas (Mountziaris *et al.*, 2011). Los procesos de reparación de las fracturas avanzan a través de múltiples etapas que pueden diferenciarse a nivel histológico y bioquímico (Claes *et al.*, 2012; Harwood *et al.*, 2010; Marsell y Einhorn, 2011). En primer lugar, se forma un hematoma seguido por una inflamación aguda. La red de fibrinas creada por la vascularización del tejido, el sistema de complemento y la activación de la cascada de coagulación sirve como primera matriz provisional para el reclutamiento de células inflamatorias, como los neutrófilos, que son los primeros en llegar a la zona de la fractura (Hurst *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2010). La degranulación de los neutrófilos reclutan la segunda infiltración de células inflamatorias, monocitos y macrófagos (Hurst *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2010). Estos últimos producen a su vez mediadores inflamatorios y quimiotácticos, que inician el reclutamiento de fibroblastos, células madre mesenquimales y células osteoprogenitoras. Las citoquinas, quimiocinas, TGF- β , proteínas morfogenéticas óseas y otros factores de crecimiento, son mediadores importantes en el proceso (Gerstenfeld *et al.*, 2003; Tsiridis *et al.*, 2007). Luego, la reacción disminuye y es reemplazada por tejido de granulación rico en proteínas del mesénquima y por neovasculatura en desarrollo en una matriz colágena extracelular desorganizada (Claes *et al.*, 2012; Harwood *et al.*, 2010; Marsell y Einhorn, 2011; Schindeler *et al.*, 2008). Las proteínas de esta nueva matriz extracelular son de crucial importancia, donde se destaca la fibronectina como principal proteína reguladora de este complejo proceso de regeneración ósea (Klavert y van der Eerden, 2021). El microambiente generado en el espacio de la fractura guía la diferenciación de las células madre del mesénquima a lo largo de la vía condrogénica que concluye en la producción de cartílago y conecta los extremos fracturados, lo cual consolida al llamado callo blando (Claes *et al.*, 2012; Gerstenfeld *et al.*, 2003; Thomson *et al.*, 2002). Esta formación proporciona estabilidad mecánica y sirve como andamio para la formación de hueso endocondral (Claes *et al.*, 2012; Gerstenfeld *et al.*, 2003; Marsell y Einhorn, 2011; Thomson *et al.*, 2002).

LITERATURA CITADA

- Claes, L., Recknagel, S., y Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(3), 133-143. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1>
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., y Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 88(5), 873-884. <https://doi.org/10.1002/jcb.10435>
- Harwood, P. J., Newman, J. B., y Michael, A. L. (2010). An update on fracture healing and non union. *Orthopaedics and Trauma*, 24(1), 9-23. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2009.12.004>
- Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., MFüller, G., Topley, N., y Jones, S. A. (2001). Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*, 14(6), 705-714. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00151-0)

- Klavert, J., y van der Eerden, C.J. (2021). Fibronectin in Fracture Healing: Biological Mechanisms and Regenerative Avenues. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9: 663357. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.66335>
- Marsell, R., y Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551-555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
- Mountziaris, P. M., Spicer, P. P., Kasper, F. K., y Mikos, A. G. (2011). Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(6), 393-402. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0182>
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., y Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(5), 459-466. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.004>
- Thompson, Z., Miclau, T., Hu, D., y Helms, J. A. (2002). A model for intramembranous ossification during fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 20(5), 1091-1098. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00017-7)
- Tsiridis, E., Upadhyay, N., y Giannoudis, P. (2007). Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*, 38(1), S11-S25. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.006>
- Xing, Z., Lu, C., Hu, D., Yu, Y. Y., Wang, X., Colnot, C., Nakamura, M., Wu, Y., Miclau, T., y Marcucio, R. S. (2010). Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Disease models & mechanisms*, 3(7-8), 451-458. <https://doi.org/10.1242/dmm.003186>