

Caracterización proteica de huesos humanos con un intervalo postmortem entre 5 y 15 años

G. Prieto Bonete¹, I. Legaz Pérez¹, C. Pérez Martínez¹, L. Fernández López¹, M. Dolores Pérez Cárceles¹, A. Luna Maldonado¹.

¹ Área medicina Legal y forense. Departamento Ciencias Sociosanitarias, Campus Universitario Espinardo. Facultad de Medicina, gemmaprietobonete@gmail.com

1. Introducción

La estimación de la data de la muerte es uno de los grandes retos de las ciencias forenses siendo su determinación en restos óseos la que presenta mayores dificultades y suscita el mayor interés. Las investigaciones realizadas sobre restos óseos están centradas en determinar el sexo del individuo, la estatura o la etnia. [1]

En condiciones normales, la cinética de degradación de hueso es más lenta en lo que respecta a las moléculas orgánicas complejas. Las características especiales de los huesos determinan los procesos postmortem tengan diferente cinética que los tejidos blandos. Partiendo del hecho de que la muerte es seguido de una serie de modificaciones bioquímicas y estructurales cuyo punto final es la degradación de la materia orgánica, hay biomoléculas resistentes que pueden proporcionar gran cantidad de información, como las proteínas. [2]

Hay investigaciones recientes en las que se emplean ciertas proteínas como la Troponina I cardíaca para la determinación de la data de la muerte [3]. Por otro lado, también encontramos investigaciones sobre la identificación de enfermedades basadas en la identificación proteica en momias [4, 5].

El estudio de los perfiles de proteínas en restos óseos puede ser útil para proporcionar información adicional para estimar la data de la muerte y conocer el proceso de degradación de la proteína en los huesos [6]. El objetivo del estudio fue analizar la fracción peptídica en fémures humanos postmortem con un rango de datos de 5 a 15 años.

2. Materiales y método

Fueron analizados un total de 20 fémures, 10 huesos con 10 años y otros 10 huesos con 15 años de intervalo postmortem, que corresponden a 15 varones (75%) y 5 mujeres (25%) con una edad media de 71.81 años. Los huesos fueron retirados de nichos del cementerio de Murcia (España). Para poder realizar un análisis de los resultados, divididos los huesos en dos grupos atendiendo a la data postmortem, el primer grupo formado por los huesos de 10 años y el segundo, por los de 15 años.

2.1 Extracción de las proteínas

La preparación de la muestra, la separación y el análisis espectrometría de masas son muy importantes para la calidad de los resultados. El análisis de las muestras se realizó de acuerdo con el método descrito por Jiang (2007) [7] y Schweitzer (2012) [8]. Primero, se pesaron 350 mg de polvo de hueso fueron lavados de la contaminación con suero salino 1M (pH 7.4) durante 48 horas a 24°C.

Antes de la extracción, las muestras fueron centrifugados durante los 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante (la fracción ácida insoluble) fueron recogidas y el pelet fue almacenado a 4°C. A continuación, las proteínas fueron extraídos durante 48 horas a 4°C en un buffer que contiene 100mM de Tris y 6M de Urea a pH 7.4.

2.2 Espectrofotometría de masas

Un volumen de 40 microlitros de cada muestra fue analizado por HPLC/MS/MS usando Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) acoplado a espectrometro de masas (120 k resolution, full scan, positive mode, normal mass range 350–1500). Los fragmentos de los peptidos fueron automaticamente seleccionada por la máquina.

La masa de los péptidos fue obtenida a través de HPLC/MS/MS y se compararon con la base de datos del centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBIInr) utilizando el análisis de datos para LC/MSD y empleando los criterios de selección del Spectrum Mill.

La validación de los resultados se realizó mediante los siguientes parámetros: SPI>70% y score >5. La validación de los fragmentos péptidicos fue usada para identificar un conjunto de proteínas.

3. Resultados

Se obtuvo un total de 306 fracciones peptídicas de los 20 fémures humanos. La mayoría de las proteínas se encuentran en un rango de 5-10 años (n = 277, 90,5%) y el resto en 10 a 15 años postmortem (n = 29, 9.5%).

El análisis comparativo entre los dos grupos muestra que sólo 7 péptidos eran comunes a ambos grupos (Tabla 1) y por lo tanto se mantienen en todo el intervalo postmortem analizado (5-15 años).

Tabla 1. Peptidos comunes a ambos grupos de data.

Fracciones peptidicas comunes en el intervalo 5-15 años postmortem

Colágeno alfa I

DDB1 y CUL4 asociado al factor 13

Receptor Fc- proteína 5

Calmodulina IQ unido al motivo proteína 1

Nestina

PHC3

Canal de Ca tipo T voltaje dependiente, subunidad alfa-1G,

Posteriormente, se analizaron las masas (Da) de fragmentos de péptidos comunes que se encuentran en ambas datas. El fragmento más pesado que corresponde a la subunidad alfa 1-G del canal de Ca voltaje-dependientes tipo-T con un peso de 262.473,1 Da. La masa media de los fragmentos proteicos que se encuentran en 5 años fue 103.477,1 Da y a los 15 años fue de 103.810, 4 Da.

4. Conclusión

Las proteínas comunes mejor conservadas en todo el intervalo postmortem analizado tienen un rango de masa de 262.473,1-67.551,6 Da, existiendo diferencias entre ambos intervalos postmortem. Este estudio profundiza en el conocimiento de los perfiles de proteínas presentes en fémur humano y permite su utilización como una herramienta complementaria para estimar el intervalo postmortem.

5. Referencias

[1] P. Zioupos, A. Williams, G. Christodoulou, & R. Giles. (2014). Determining 'age at death' for forensic purposes using human bone by a laboratory-based biomechanical analytical method. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 33, 109-123.

[2] M.J. Prieto-Castelló, J.H. del Rincón, C. Pérez-Sirvent, P. Alvarez-Jimenez, M.D. Pérez-Cárceles, E. Osuna, & A. Luna (2007). Application of biochemical and X-ray diffraction analyses to establish the postmortem interval. *Forensic science international*, 172(2), 112-118.

[3] A.J. Sabucedo, & K. G. Furton. (2003). Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I. *Forensic science international*, 134(1), 11-16.

[4] A. Bona, Z. Papai, G. Maasz, G.A. Toth, E. Jambor, J. Schmidt, & L. Mark (2014). Mass spectrometric identification of ancient proteins as potential molecular biomarkers for a 2000-year-old osteogenic sarcoma. *PLoS one*, 9(1), e87215.

[5] S. Panzer, O. Peschel, B. Haas-Gebhard, B.E. Bachmeier, C.M. Pusch & A.G. Nerlich. (2014). Reconstructing the life of an unknown (ca. 500 years-old South American Inca) mummy—multidisciplinary study of a Peruvian Inca mummy suggests severe chagas disease and ritual homicide. *PloS one*, 9(2), e89528.

[6] C. Cattaneo. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. (2007). *Forensic Science International*. 165(2) 185-193.

[7] X. Jiang, M. Ye, X. Jiang, G. Liu, S. Feng, L. Cui, & H. Zou. (2007). Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *Journal of proteome research*. 6(6), 2287-2294.

[8] T.P. Cleland, K. Voegelé, M.H. Schweitzer, Empirical evaluation of bone extraction protocols, *PloS One* 7 (2012) e31443.