



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas
Dirección de Postgrado
Programa Magíster en Biotecnología Molecular

BIOMARCADORES PROTEICOS.

Hacia el Desarrollo de Metodologías para la Estimación del Intervalo Post Mortem (IPM) en Osamentas Humanas.

Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología Molecular

POR

CAMILA CATALINA GARCÉS PARRA

Docente Guía: Estefanía Salomé Tarifeño Saldivia.

8 de junio de 2023

Concepción, Chile.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Docente Guía:

Dra. Estefanía Tarifeño Saldivia
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Raquel Montesino Seguí
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Elena Uribe Pérez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Mg. Mauricio Hernández Cea.
MELISA Institute.

Directora de Programa:

Dra. Coralía Rivas Rocco
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

©2023, CAMILA CATALINA GARCÉS PARRA

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

A la beca de Magíster Nacional otorgada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) folio de postulación 22211332. Por financiar mi estancia en el programa de Magíster en Biotecnología Molecular.

Al Gene Expression and Regulation Laboratory (GEaRLab) por aceptarme como su integrante y por ser parte activa de mi formación, otorgándome las herramientas necesarias para el desarrollo de esta investigación. Agradecer también al cuerpo docente del laboratorio de Enzimología por la enseñanza y ayuda entregada.

Al Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Chile, en particular, a Miguel Soto y William Aguilar, por sus gestiones y apoyo incondicional en el proceso de recopilación de las muestras.

Al MELISA Institute por la oportunidad de ejecutar gran parte de mis experimentos en sus dependencias, proporcionando el conocimiento y equipo necesario para el trabajo en el área de la proteómica. Agradecer al personal científico-técnico por su disponibilidad y por compartir su conocimiento conmigo.

Al Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Concepción y al Servicio Médico Legal sede Concepción, por el apoyo técnico en el trabajo con osamentas humanas.

**Dedicado a ti.
No olvides que tú puedes
y que eres capaz de alcanzarlo todo.**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El Intervalo <i>Post mortem</i>	1
1.2. Metodologías para la Estimación del Intervalo <i>Post mortem</i>	4
1.3. Proteómica Forense en la Estimación de IPM tardíos.	7
1.4. Características de la Composición Ósea y su Aplicabilidad a la Proteómica.	10
1.5. Proteínas de la Matriz Ósea y su unión a la Hidroxiapatita.	20
1.6. Diagénesis Ósea	23
1.7. Degradación de Proteínas en Restos Óseos para la Estimación del IPM.	27
2. HIPÓTESIS	42

3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo General.....	44
3.2. Objetivos Específicos.	44
4. METODOLOGÍA	45
4.1. Obtención de Material Biológico para Análisis Proteómico.....	45
4.1.1. Requerimientos para el Trabajo con Restos Óseos Humanos.....	49
4.1.2. Extracción de Muestras Óseas Cadavéricas y Esqueletizadas.....	50
4.2. Estandarización de un Protocolo de Extracción de Proteínas a Partir de Muestras Óseas.	62
4.2.1. Extracción Polvo de Hueso Cortical Porcino.	63
4.2.2. Extracción e Identificación de Proteínas en Muestras de Costillas de Cerdo.....	65
4.3. Extracción Proteica en Muestras de Tejido Cortical Provenientes de Costillas y Tibias Humanas.	76
4.3.1. Preparación y Análisis de Muestras Óseas Humanas para análisis LC-MS/MS.....	78
4.3.2. Identificación de las Proteínas Presentes en las Muestras de Costilla y Tibias Humanas.	79
4.3.3. Caracterización in silico de las Proteínas Identificadas.....	81

4.3.4. Análisis Estadístico Multivariado. MCA y PCA.	81
4.3.5. Análisis de Abundancias Relativas.....	82
5. RESULTADOS.....	85
5.1. Obtención de Restos Óseos Humanos para Análisis Proteómicos.	85
5.2. Estandarización de un Protocolo de Extracción de Proteínas a partir de Muestras Óseas para Análisis Proteómicos Utilizando Costillas de Cerdo. ..	87
5.3. Identificación de Proteínas Presentes en Muestras de Costillas y Tibias Humanas a Diferentes Intervalos <i>Post mortem</i>	95
5.4. Caracterización in Silico de las Proteínas Identificadas en Muestras Humanas.	105
5.5. Análisis Estadístico Multivariado. MCA y PCA.	110
5.6. Análisis de Abundancias Relativas.....	118
6. DISCUSIÓN.....	128
7. CONCLUSIÓN	155
8. BIBLIOGRAFÍA	156
9. ANEXO 1	173
10. ANEXO 2	174
11. ANEXO 3	177
12. ANEXO 4	184

13. ANEXO 5	191
14. ANEXO 6	200

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de tejido óseo y su distribución en el hueso.....	11
Figura 2. Estructura jerárquica del colágeno tipo I.....	14
Figura 3. Proteínas no colágenas presentes en la MEC ósea	19
Figura 4. Esquemmatización de la interacción entre los cristales de hidroxapatita y las fibrillas de colágeno.....	21
Figura 5. Proteínas con potencial aplicación en la estimación del IPM en restos óseos	36
Figura 6. Diseño experimental de los estudios sobre la degradación <i>post mortem</i> del proteoma en restos óseos.....	37
Figura 7. Diseño experimental del estudio.....	46
Figura 8. Protocolo para la obtención del material biológico.....	50
Figura 9. Puntos de análisis morfológico del hueso coxal para la estimación del sexo.	55
Figura 10. Puntos de análisis morfológico del cráneo para la estimación del sexo	57

Figura 11. Fases del método propuesto por Suchey-Brooks (1990) de estimación de edad para individuos masculinos.	59
Figura 12. Fases del método propuesto por Lovejoy (1985) para la estimación de edad.....	60
Figura 13. Procedimiento de obtención del tejido cortical en muestras óseas de cerdo.....	64
Figura 14. Estandarización de la extracción proteica utilizando muestras óseas de cerdo.....	70
Figura 15. Obtención de fragmentos de tejido cortical humanos	77
Figura 16. Estandarización de un protocolo de extracción de proteínas para identificación por LC-MS/MS desde osamentas humanas.....	93
Figura 17. Número de proteínas identificadas en muestras humanas.....	99
Figura 18. Proteínas compartidas entre muestras de un mismo intervalo <i>post mortem</i> y hueso de procedencia.....	103
Figura 19. Propiedades de las proteínas establecidas como representativas de los distintos tiempos <i>post mortem</i>	110
Figura 20. Dinámica del proteoma <i>post mortem</i> establecido por la presencia/ausencia de proteínas mediante análisis de MCA.....	116
Figura 21. Dinámica del proteoma <i>post mortem</i> establecido por la abundancia relativa de proteínas mediante análisis de PCA.....	118

Figura 22. Cambios en la abundancia relativa de proteínas extraídas desde muestras de costillas a distintos IPM	124
Figura 23. Cambios en la abundancia relativa de proteínas extraídas desde muestras de tibias con IPM=15 e IPM=20 años.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado y descripción de las muestras recopiladas en el estudio.....	86
Tabla 2. Clusters of Orthologous Groups (COGs) de las 57 diferentes proteínas identificadas en muestras de cerdos a partir de los protocolos testeados.	93
Tabla 3. Cantidad de proteínas extraídas en cada una de las muestras óseas humanas.	98
Tabla 4. Número de proteínas identificadas para cada muestra diferenciadas según el tipo de corrida y el resultado global por condición en estudio.	100
Tabla 5. Nombre y función de las 22 proteínas definidas como representativas de cada IPM.....	103
Tabla 6. Resultados de las pruebas de hipótesis en proteínas identificadas en muestras de costillas.	125
Tabla 7. Resultados de las pruebas de hipótesis en proteínas identificadas en muestras de tibias.....	127

ABREVIATURAS

ADN	: Ácido desoxirribonucleico.
ALBU	: Albúmina.
Arg	: Arginina.
Asp	: Ácido aspártico.
cm	: Centímetro.
CO1A1	: Cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo I.
CO1A2	: Cadena de colágeno alfa-2 del colágeno tipo I.
CO3A1	: Cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo III.
COGs	: Cluster of orthologous groups.
Da	: Dalton.
FABP5	: Proteína de unión a ácidos grasos 5.
FDR	: False Discovery Rate.
FETUA	: Alfa-2-HS-glicoproteína.
FWHM	: Full Width at Half Maximum.
g	: Fuerza centrífuga relativa o fuerza g.
G3P	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
Glu	: Ácido glutámico.
Gly	: Glicina.
H10	: Histona H1.0.
H12	: Histona H1.2.
H14	: Histona H1.4.

HBA	:	Subunidad alfa de la hemoglobina.
HBB	:	Subunidad beta de la hemoglobina.
His	:	Histidina.
HPLC-MS/MS	:	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.
hrs	:	Horas.
IPM	:	Intervalo post mortem.
IPMs	:	Intervalos post mortem.
K1C10	:	Queratina, tipo I citoesquelética 10.
K1C13	:	Queratina, tipo I citoesquelética 13.
K2C1	:	Queratina, tipo II citoesquelética 1.
K2C4	:	Queratina, tipo II citoesquelética 4.
kDa	:	kilodaltons.
kHz	:	kilohercio.
LC-MS/MS	:	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.
Lys	:	Lisina.
M	:	Molar.
MCA	:	Análisis de correspondencia múltiple.
MEC	:	Matriz extracelular.
mg	:	Miligramos.
min	:	Minutos.
mL	:	Mililitro.

mm	: Milímetro.
mM	: Milimolar.
NCP	: Non-collagen protein.
ng	: Nanogramos.
PASEF	: Parallel accumulation serial fragmentation.
PCA	: Análisis de componentes principales.
PGS1	: Biglicano.
PIP	: Proteína inducible por prolactina.
ppm	: Partes por millón.
S10A8	: Proteína S100-A8.
S10A9	: Proteína S100-A9.
S10AB	: Proteína S100-A11.
SDS-Page	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
SEMG1	: Semenogelina-1.
TFA	: Ácido trifluoroacético.
TFE	: Trifluoroetanol.
THRB	: Protrombina.
Tims	: Trapped Ion Mobility Spectrometry.
UHPLC	: Ultra-High-Performance Liquid Chromatography.
UV-Vis	: Espectroscopia ultravioleta visible.
V	: Volt.
µg	: Microgramos.

μL : Microlitros.

μm : Micrómetro.

RESUMEN

La estimación del intervalo *post mortem* (IPM) resulta todo un desafío, más aún cuando se enmarca en contextos forenses que requieren establecer la data de muerte de restos en etapas tardías de descomposición. Actualmente, las investigaciones tafonómicas buscan proporcionar marcadores que permitan desarrollar estimaciones precisas y objetivas, de manera tal que sean admisibles en los procesos judiciales. En dicho esfuerzo, los estudios de degradación proteica han resultado prometedores. La presente investigación exploró las dinámicas del proteoma de osamentas humanas a distintos IPM en términos de diversidad y abundancia, a fin de evaluar si estas son informativas para la estimación de la data de muerte en restos óseos. Para ello se tomaron muestras de tejido cortical de costillas y tibias de 15 individuos masculinos con edades entre 20 a 50 años provenientes de contextos cadavéricos y de resacas de cementerio, cuyos IPM corresponden a <1 año, 15 años y 20 años en muestras de costillas, y con IPM de 15 y 20 años para muestras de tibias. Los resultados proteómicos indican que muestras tempranas (IPM<1 año) exhiben una mayor diversidad y abundancia de proteínas que muestras tardías (IPM=15 y 20 años), identificando 7 proteínas discriminantes entre ambos IPM. Se observó que otras 7 proteínas siguen un decaimiento gradual y progresivo en su abundancia que se correlaciona significativamente con el aumento del IPM. A su vez, se evidenció que las propiedades estructurales de las proteínas como el peso molecular y composición aminoacídica podrían ser cruciales para la preservación *post*

mortem. Se sugiere además que el uso de péptidos semitripticos refleja mejor la degradación del proteoma en los análisis de espectrometría que los péptidos tripticos.

Palabras claves: Proteómica forense, intervalo *post mortem*, restos óseos, perfil proteómico y candidatos proteicos.

ABSTRACT

The estimation of the post-mortem interval (PMI) is a difficult task, even more so when it is framed in forensic contexts that require establishing the date of death of remains in late stages of decomposition. Currently, taphonomic research seeks to provide markers that allow the development of precise and objective estimates, so that they are admissible in legal proceedings. In this effort, protein degradation studies have shown promise. The present investigation explored the dynamics of the proteome of human skeletal remains at different PMI in terms of diversity and abundance, in order to assess whether these are informative for the estimation of the date of death in skeletal remains. For this purpose, samples of cortical tissue from ribs and tibia were taken from 15 male individuals aged 20 to 50 years old from cadaveric contexts and from cemetery remains, whose PMIs correspond to <1 year, 15 years and 20 years in rib samples, and with PMIs of 15 and 20 years for tibia samples. Proteomic results indicate that early samples (PMI<1 year) exhibit a higher diversity and abundance of proteins than late samples (PMI=15 and 20 years), identifying 7 discriminating proteins between both PMI. Another 7 proteins were observed to follow a gradual and progressive decay in abundance that correlates significantly with increasing PMI. In turn, it was evidenced that protein structural properties such as molecular weight and amino acid composition could be crucial for post-mortem preservation. It is further suggested that the use of semi-tryptic peptides better reflects proteome degradation in spectrometric analysis than tryptic peptides.

Key words: Forensic proteomics, *postmortem* interval, skeletal remains, proteomic profile and proteomic candidates.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Intervalo *Post mortem*.

El intervalo *post mortem* (IPM) corresponde al rango de tiempo que transcurre desde la muerte de un individuo hasta el descubrimiento de su cadáver (Amendt et al., 2011). Durante este periodo, el cuerpo humano atraviesa por una serie de cambios físicos, químicos y biológicos que dan pie a la descomposición cadavérica, la cual supone un desarrollo continuo que implica procesos de autólisis y putrefacción (Fiedler & Graw, 2003).

Lee Goof (2009) ha descrito 5 estadios de descomposición que comienzan inmediatamente tras la muerte celular, conocidos como reciente, de distención, decaimiento, post-decaimiento y fase esquelética. La primera etapa expresa cambios *post mortem* asociados a procesos físicos y químico como las livideces y el enfriamiento cadavérico, así como también la rigidez y espasmos cadavéricos (Vargas, 1999). Lo que es sucedido por procesos autolíticos, donde las bacterias anaeróbicas presentes en el intestino y en otras partes del cuerpo, comienzan a digerir los tejidos, provocando una acumulación de gases que generan una inflamación en la zona del abdomen y le dan al cadáver un aspecto de hinchazón. Una vez que la barrera epitelial cede, las cavidades corporales quedan expuestas, permitiendo la liberación de los gases al ambiente y la colonización de los restos por parte de larvas, dípteros y bacterias, donde finalmente los tejidos blandos como músculo, piel y cartílago se degradan por

completo, quedando el cadáver reducido únicamente a restos óseos (Lee Goof, 2009; Powers, 2005; Vargas, 1999).

Estos cambios *post mortem* estarían influenciados por factores bióticos y abióticos, al igual que por factores intrínsecos y extrínsecos, como lo es la temperatura ambiente, la humedad, el pH del entorno de depósito, el tipo de suelo, microorganismos exógenos, insectos, fauna carroñera, características individuales del cadáver, por ejemplo, la masa corporal, la temperatura corporal, la microbiota endógena, el sexo, la edad, etc. De modo que la descomposición del cadáver es el reflejo de un proceso ecológico dinámico (Hyde et al, 2015; Sacco et al., 2022).

Es precisamente este gran dinamismo, ocasionado por la compleja asociación entre la multiplicidad de factores que interfieren en el proceso de descomposición, lo que dificulta determinar de manera exacta la data muerte de un individuo, por lo que la estimación del intervalo *post mortem* corresponde a uno de los problemas más desafiantes de resolver para las ciencias forenses (Luna-Maldonado, 2010).

La precisión en las estimaciones depende principalmente de dos factores interrelacionados, en primer lugar, del tiempo transcurrido desde la muerte y, por otro lado, de las metodologías existentes para su aproximación. En la actualidad, las técnicas más frecuentes para determinar el IPM se centran en los cambios en términos de temperatura, excitabilidad muscular, ultraestructura de tejidos y la

variación de sustancias bioquímicas en fluidos como el humor vítreo, sangre, fluido pericárdico, entre otros (Hostiuc et al., 2017). Cabe señalar que el uso de estos parámetros de forma individual, son propensos a inducir errores en la estimación, por lo que se trabajan de manera conjunta para aumentar su precisión. Sin embargo, su aplicabilidad se encuentra limitada al estadio reciente, pudiendo ser utilizadas sólo hasta cerca de las 36 horas *post mortem*, ya que la estimación del IPM se torna aún más difícil cuanto más avanzado se encuentre el estado de descomposición del cadáver (Hostiuc et al., 2017).

Se ha demostrado que los métodos empleados en la estimación de intervalos de hasta 24 horas alcanzan cerca de un 90% de precisión, lo que se reduce drásticamente al 50% cuando se trata de IPM entre 1 a 5 años, fecha a la que, por lo general, el cadáver estará reducido a restos óseos (Sun et al., 2013). Lo cual supone una gran problemática, ya que la identificación precisa y rápida de restos humanos, muchas veces depende del intervalo *post mortem*, sobre todo, para precisar si los restos humanos hallados son de interés arqueológico o forense (Schmidt et al., 2022).

En el caso de investigaciones de muertes por homicidio, muertes sospechosas u otras muertes prematuras, la estimación de una ventana de tiempo entre la muerte y el hallazgo del cadáver proporciona información relevante en términos legales, ya que permite acotar el momento exacto de la muerte y con ello, determinar los eventos que rodean el fallecimiento, así como también, situar a las

posibles personas involucradas, verificar las declaraciones de testigos, limitar el número de sospechosos y filtrar evidencia decisiva para los procesos judiciales (Madea, 2016; Salam et al., 2012; Sangwan et al., 2021). Por otro lado, la estimación del IPM es de gran utilidad al momento de evaluar la posible prescripción de un delito, que en el caso de la legislación chilena se señala en el Artículo 94 del Código Penal, que la acción penal prescribe a los 15 años “respecto de los crímenes a los que la ley impone pena de presidio, reclusión o relegación perpetuos” y a los 10 años “respecto de los demás crímenes” (Código Penal de la República de Chile, 1874). Por ende, es fundamental avanzar hacia la estimación del intervalo *post mortem* con mayor precisión.

1.2. Metodologías para la Estimación del Intervalo *Post mortem*.

Los desafíos en torno a la estimación del intervalo *post mortem* en términos de precisión, no sólo se restringen a las variaciones inducidas por las condiciones de depósito y características propias de cada individuo, sino que también se vinculan con los métodos y la capacidad tecnológica disponible para el análisis de los distintos tipos de muestras (Ciaffi et al., 2018).

Mientras que para el período *post mortem* temprano, es decir, cuando aún se encuentran presentes los tejidos blandos, existen métodos cualitativos y cuantitativos de estimación, que analizan los parámetros ya mencionados como el descenso de la temperatura corporal, la rigidez cadavérica, ciertas alteraciones oculares e incluso datos circunstanciales. En tanto, en aquellas etapas *post*

mortem intermedias y tardías, caracterizadas por un avanzado estado de descomposición cadavérica, aún no se desarrollan metodologías estandarizadas para su estimación (Pittner et al., 2020). Lo anterior, se debe a que después de semanas y meses posteriores a la muerte, la putrefacción del cadáver avanza de tal manera que las metodologías tradicionales ya no son aplicables producto del importante deterioro de los tejidos circundantes (Swift, 2006).

En estas etapas, casi la única evidencia material disponible corresponde a restos óseos, tejido que ha demostrado ser muy resistente al paso del tiempo y cambios *post mortem*, por lo que la mayoría de los análisis en investigaciones de IPM tardíos se basan en el examen del material óseo (Buckley, 2019). No obstante, la datación a partir de elementos esqueléticos se torna una tarea aún más difícil, dado los complejos procesos de degradación químicos, físicos y biológicos que ocurren entre los huesos y el ambiente de depósito en el que se encuentran (Ortiz-Herrero et al., 2021; Schmidt et al., 2022).

Actualmente, existen dos tipos de metodologías para la estimación del IPM en restos óseos. Por un lado, están aquellos métodos basados en el análisis morfológico de estructuras, que observan la presencia o ausencia de ligamentos, nivel de grasa asociada y otras materias orgánicas (Behrensmeyer, 1978). En tanto, otros estudios se centran en factores intrínsecos de la estructura ósea y sus cambios vinculados a procesos químicos y físicos *post mortem*. Schmidt y cols., (2022) señala que, hasta la fecha, las técnicas aplicadas en osamentas

para fines de estimación de IPM incluyen el examen histológico, métodos de espectroscopía UV-Vis, mediciones de radioisótopos, reacción quimioluminiscente del luminol, estudios de difracción de rayos X, de espectroscopía infrarroja, microtomografía computarizada, análisis de la pérdida de nitrógeno y evaluación de la degradación de compuestos orgánicos como lípidos, proteínas y ADN.

Metodologías que, en general, suponen la destrucción de la muestra y que, además, se ven limitadas debido a la complejidad que supone la obtención de osamentas humanas para los estudios tafonómicos, por lo que este tipo de investigaciones son acotadas en términos de tamaño muestral y condiciones de diseño (Pittner et al., 2020). Por ende, muchas de las investigaciones sobre descomposición humana han debido emplear sustitutos animales, como ratones y cerdos, siendo estos últimos, los ejemplares predilectos dada ciertas similitudes en cuanto al tejido tegumentario, proporciones corporales y comunidades microbianas intestinales relacionadas con una dieta omnívora (Catts & Goff, 1992; Micozzi, 1986). Sin embargo, los resultados de estos estudios deben tomarse con precaución, ya que existen diferencias respecto al comportamiento que sigue la descomposición humana (Connor et al., 2018).

Se ha señalado que el enfoque más prometedor para alcanzar estimaciones que sean confiables, precisas y ampliamente aplicables en la estimación de intervalos *post mortem* tardíos, hace referencia con disponer de un abanico de

metodologías que se acomoden a las distintas condiciones que exhiben los restos humanos y los contextos ambientales en el proceso de descomposición, seleccionando aquel que sea más acorde a las características y demandas de cada caso en particular (Pittner et al., 2020).

En este sentido, dada la compleja asociación entre los factores que intervienen en la descomposición cadavérica, sumado a la pérdida de los puntos de análisis por los procesos propios de degradación y la falta de métodos cuantitativos para estimaciones de IPM tardíos (Wescott, 2018), existe la necesidad de buscar nuevos indicadores y metodologías de análisis complementarias a las ya existentes, que sean capaces de proveer estimaciones de IPM más precisas y acotadas. Sobre todo, si se considera que el desarrollo de nuevas metodologías para la estimación de este parámetro es de gran relevancia para las investigaciones de carácter forense (Choi et al., 2019), cuya aplicabilidad se extiende a contextos de diversa índole como desastres masivos, desaparición forzada, crímenes de lesa humanidad, trata de personas, feminicidios, etc. No obstante, los campos de acción de la estimación del IPM alcanzan a cualquier investigación vinculada a la datación de restos humanos.

1.3. Proteómica Forense en la Estimación de IPM tardíos.

Si bien los trabajos más conocidos dentro de las investigaciones de carácter forense están basados en el análisis del ADN, el estudio del proteoma se ha posicionado como una herramienta innovadora y poderosa para subsanar

carencias de las técnicas tradicionales, siendo considerado como uno de los recursos que al igual que la secuenciación genómica, es capaz de proporcionar una alta especificidad molecular (Merkley et al., 2019; Díaz et al., 2019).

Siguiendo esta línea, la proteómica se ha vuelto una herramienta prometedora en términos forenses, encontrando recientemente una gran aplicabilidad en la estimación del IPM por medio de la potencial identificación de marcadores proteicos altamente resistentes al paso del tiempo (Buckley, 2019). Distintos estudios han sugerido que la degradación *post mortem* de ciertas proteínas podría correlacionarse negativamente con el tiempo transcurrido desde la muerte de un individuo, lo que eventualmente permitiría la estimación del IPM (Bonicelli et al., 2022a; Mickleburgh et al., 2021; Pérez-Martínez et al., 2017; Prieto-Bonete et al., 2019; Procopio et al., 2017; Procopio et al., 2018). Dichos estudios sobre la degradación proteica y su correlación con el IPM han tenido un aumento significativo durante la última década (Zissler et al., 2020). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se centran en el análisis del IPM temprano e intermedio con períodos que abarcan desde horas hasta 4 semanas *post mortem*, y sólo 9 estudios desde el 2001 al 2021, trabajan con tiempos *post mortem* tardíos, que comprenden desde meses hasta años transcurrida la muerte, en donde los restos alcanzan la etapa de esqueletización (Sacco et al., 2022).

En contextos de IPM tardíos, los restos óseos han demostrado ser una buena alternativa para la extracción de proteínas, las que posteriormente, son factibles

de analizar mediante técnicas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Bonicelli et al., 2022a; Pérez-Martínez et al., 2017; Prieto-Bonete et al., 2019; Procopio et al., 2021). Una técnica analítica moderna que permite reconocer secuencias peptídicas y la identificación de proteínas con un gran nivel de precisión y sensibilidad, a partir de lo que se conoce como proteómica ascendente, en donde una proteína es convertida a péptidos por medio de digestión proteolítica, los que luego son separados por cromatografía líquida e ionizados antes de ingresar al espectrómetro, permitiendo tanto la identificación de las proteínas en función de la relación masa/carga, como la determinación de la abundancia conforme a la intensidad de los iones peptídicos (Xie et al., 2011; Parker et al., 2021).

Gracias a esta técnica se identifica la riqueza proteómica y se cuantifican las abundancias relativas de las proteínas presentes, seleccionando aquellas proteínas que resulten de interés dada su correlación negativa con el aumento del IPM (Bonicelli et al., 2022a; Bonicelli et al., 2022b; Mickleburgh et al., 2021; Mizukami et al., 2020; Procopio et al., 2018).

La literatura disponible permite aseverar que las proteínas óseas, principalmente las proteínas colágenas, se preservan de manera eficiente (Wadsworth & Buckley, 2014). Algunas proteínas colágenas y no colágenas tienen una mayor resistencia en el tiempo en comparación con otras moléculas como el ADN (Pérez-Martínez et al., 2017). Se cree que estas proteínas están protegidas de la

degradación en osamentas debido a su asociación con la matriz ósea (Mickleburgh et al., 2021; Procopio et al., 2018). Por lo tanto, los restos óseos son una valiosa fuente de información en investigaciones forenses, y uno de los tejidos más interesantes para el estudio de la descomposición del proteoma dada su prolongada preservación *post mortem* (Zissler et al., 2020; Duong et al., 2021).

1.4. Características de la Composición Ósea y su Aplicabilidad a la Proteómica.

Los huesos son un tipo de tejido conjuntivo especializado que no sólo cumplen funciones de soporte mecánico, sino que también están involucrados en la producción de células sanguíneas y el depósito de minerales (Marieb, 2008). Están constituidos por tejido compacto o cortical y un tejido esponjoso o trabecular. Ambos, se expresan de manera continua en todos los tipos de hueso, aunque la proporción de cada uno de estos tejidos es variable según las necesidades y características intrínsecas de cada pieza ósea (Martini et al., 2009; White & Folkens, 2005).

El tejido compacto presenta una organización clara y definida en estructuras conocidas como osteonas, es menos poroso que su contraparte trabecular, y está presente bajo el periostio de todos los huesos, formando parte fundamental de la diáfisis de huesos largos (Tortora & Derrickson, 2011). Por otro lado, el tejido esponjoso se organiza en láminas irregulares conocidas como trabéculas, y a diferencia del cortical, es irrigado directamente de la sangre circulante próxima a

las cavidades medulares, a su vez se caracteriza por ser más ligero y se dispone mayoritariamente en las epífisis de huesos largos y zonas internas de los huesos (Marieb, 2008; Tortora & Derrickson, 2011), tal como se observa en la **Figura 1**.

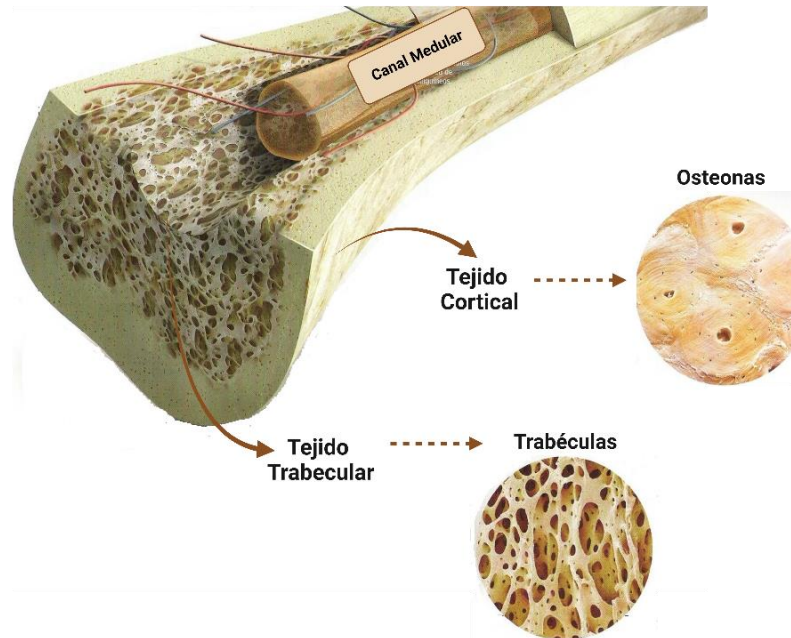


Figura 1. Tipos de tejido óseo y su distribución en el hueso. Esquemización de un corte en hueso largo donde es posible observar el tejido cortical en la zona diafisiaria y externa del hueso, mientras que el tejido trabecular se distribuye a lo largo de la cavidad medular. En detalle se muestra la disposición ordenada en osteonas que sigue el tejido cortical, y en red o trabéculas en el caso del tejido trabecular. (Adaptado de Marieb, 2008).

En términos de composición, el hueso se divide en una porción orgánica, conformada por células propias del tejido óseo y proteínas principalmente fibrilares, que en conjunto constituyen aproximadamente el 30% del hueso. Una gran porción de contenido mineral inorgánico, que representa cerca del 60% de

la estructura ósea, y el 10% restante, está constituido por agua (White & Folkens, 2005; Feng, 2009).

A nivel celular, el tejido óseo está compuesto por cuatro tipos de células especializadas. Siguiendo a Tortora & Derrickson (2011), estas corresponden a: (1) las células osteogénicas, células madre no especializadas derivadas del mesénquima que se encuentran en el endostio (capa interna que recubre las cavidades del hueso) y la parte interna del periostio (capa externa que recubre y nutre los huesos), capaces de diferenciarse en osteoblastos. (2) Los osteoblastos, células formadoras de hueso que secretan la matriz osteoide formada por fibras colágenas y elementos orgánicos que son fundamentales para la matriz, además de ser las encargadas de iniciar la calcificación. (3) Los osteocitos, que son las células encargadas de mantener metabólicamente al hueso. Finalmente, (4) los osteoclastos, células multinucleadas que degradan el hueso por medio de la liberación de lisosomas.

Extracelularmente, el hueso está conformado por la matriz ósea o también conocida como matriz extracelular (MEC), la cual corresponde a una estructura tridimensional que es secretada por las células al espacio extracelular, y es un elemento fundamental para la integridad del tejido óseo (Mouw et al., 2014). Está compuesta por una mezcla de sales de calcio, principalmente fosfato cálcico, que al interactuar con el hidróxido de calcio e iones de sodio, magnesio y fluoruro, forma los cristales de hidroxiapatita (HA) (Martini et al., 2019). La hidroxiapatita

es la molécula inorgánica más abundante en el tejido óseo, que almacena el 90% del calcio y el 85% del fósforo del organismo, aportando rigidez y resistencia al hueso (Martini et al., 2009; Sroga & Vashishth, 2012).

Del mismo modo, la MEC está compuesta por elementos del tipo orgánico, principalmente proteínas, entre ellas el 90% corresponde a colágeno del tipo I y un 10% a proteínas no colágenas, también conocidas como NCP (Morgan et al., 2008).

El colágeno tipo I, que se esquematiza en la **Figura 2**, corresponde una molécula de triple hélice conformada por tres cadenas polipeptídicas, dos del tipo $\alpha 1(I)$ y una $\alpha 2(I)$, que se entrecruzan por medio de puentes de hidrógeno formando moléculas lineales que dan origen a las fibras de colágeno, las que se caracterizan por su gran resistencia dada la composición inusual de aminoácidos de glicina, prolina e hidroxiprolina, poco frecuentes en otras proteínas (Meisenberg & Simmons, 2018). A su vez, en la matriz ósea es posible encontrar otros tipos de colágeno en menores proporciones, tales como, el colágeno tipo III y tipo V, que se relacionarían directamente con el colágeno tipo I, pues se cree que podrían regular tanto el diámetro como la formación de sus fibras (Garnero, 2015; Niyibizi & Eyre, 1989), y el colágeno tipo XII, que se distribuye sobre la superficie de las fibrillas del colágeno tipo I (Meisenberg & Simmons, 2018). En términos generales, la función de las proteínas colágenas se vincula al soporte

mecánico y servir como andamiaje para las células óseas (Saito y Marumo, 2015).

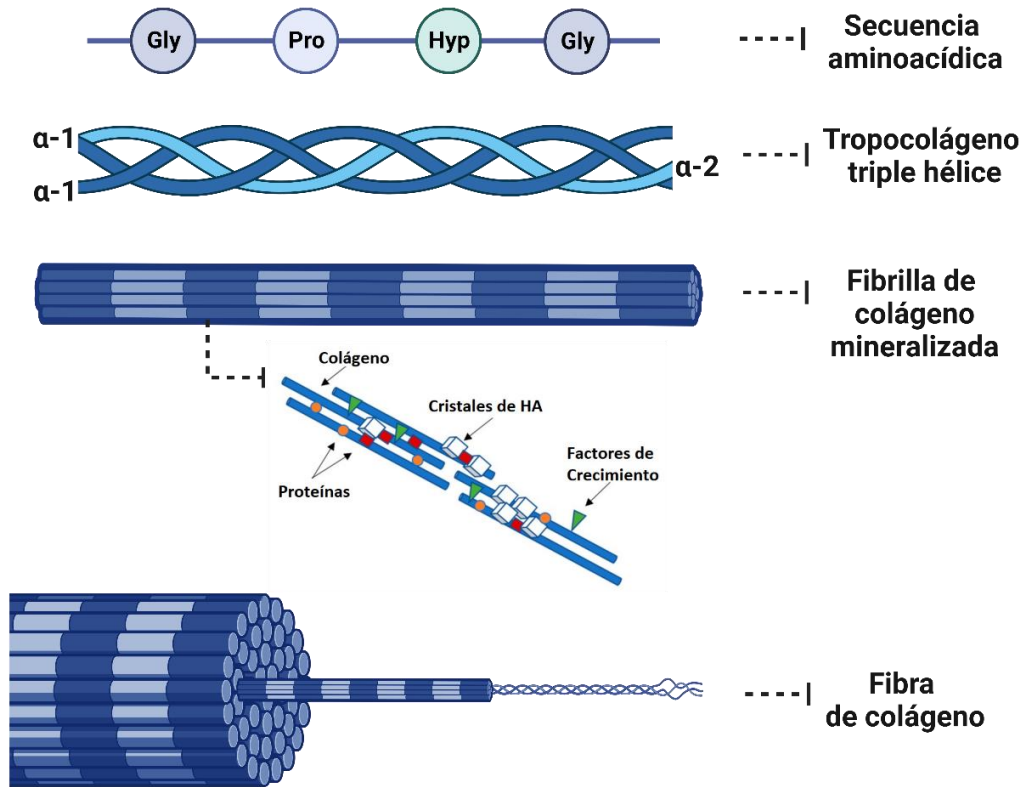


Figura 2. Estructura jerárquica del colágeno tipo I. A nivel de aminoácidos, presenta una configuración repetitiva de Gly-X-Y, es decir, una glicina cada tres posiciones, seguida en su mayoría por residuos de prolina e hidroxiprolina. Estos aminoácidos dan origen a tres cadenas que se entrelazan formando una estructura heterotrímica constituida por dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$. Las moléculas de tropocolágeno se ensamblan y organizan en fibrillas, las cuales están integradas con la fase mineral que se cristaliza a lo largo de su eje longitudinal, y con otras proteínas fibrilares y no colágenas como los proteoglicanos que en conjunto contribuyen a la estabilidad de la fibra de colágeno. (Adaptado de Carvalho et al., 2021; Farokhi et al., 2018).

En cuanto a las proteínas no colágenas, la matriz extracelular contiene cerca de 180 a 200 NCP, las cuales interactúan con las fibras de colágeno mejorando la resistencia ósea ante el estrés mecánico, participando además en el crecimiento, la morfología y orientación de los cristales de hidroxapatita, entre otras funciones (Sroga & Vashishth, 2012). Estas proteínas, en términos generales, se pueden clasificar en distintos grupos (Carvalho et al., 2021; Feng, 2009; Fernández et al., 2006; Lin et al., 2020). (**Figura 3**):

- **Proteoglicanos** : Principalmente, la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP), que incluye al biglicano (**PGS1**), expresado en osteoblastos durante la proliferación y mineralización celular; la decorina (**PGS2**), expresada por osteoblastos, se une a las fibrillas del colágeno tipo I y promueve su fibrillogénesis; el queratocano (**KERA**), expresado en osteoblastos y que participa en la regulación de la formación ósea y el depósito de minerales; y la asporina (**ASPN**), que se une al colágeno tipo I promoviendo su mineralización (Coulson-Thomas, 2015; Kalamajski et al., 2009; Kirby & Young, 2018).
- **Proteínas con ácido g-carboxiglutámico**: Las proteínas de este grupo se distinguen por contener ácido carboxiglutámico, un aminoácido que liga calcio y es dependiente de vitamina K. En la MEC las proteínas de este grupo corresponden a la osteocalcina (**OSTCN**), expresada en osteoblastos y que actúa como regulador del metabolismo de calcio mediante su asociación con la hidroxapatita; la proteína gla de la matriz

(MGP), proteína extracelular sintetizada por osteoblastos, osteocitos y condrocitos, cuyas funciones se vinculan con la inhibición de la formación y mineralización ósea (Hauschka et al, 1989); por último, la periostina **(POSTN)**, secretada por osteoblastos y que participa tanto como molécula de adhesión regulando la proliferación y diferenciación de osteoblastos, así como proteína reguladora del plegamiento del colágeno y la fibrillogénesis (Kudo, 2011).

- **Glicoproteínas:** Proteínas que contienen moléculas de carbohidratos. De este grupo, la **osteonectina (SPRC)** o proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC) representa el 25% de las NCP, contiene distintos dominios de interacción con el colágeno tipo I, el calcio y la hidroxiapatita, por lo que regula los niveles de calcio, la mineralización y el mantenimiento de masa ósea (Delany & Hankenson, 2009). Por otro lado, se encuentran las **trombospondinas (TSP)**, clasificadas de TSP1 a TSP5, y que se expresan en osteoblastos, cumpliendo un rol fundamental en la diferenciación de células óseas, la formación de hueso y el mantenimiento de la masa ósea (Delany & Hankenson, 2009). Finalmente, este grupo está constituido por un subgrupo de cuatro glicoproteínas homólogas secretadas que contienen repeticiones de trombospondina, conocidas como **espondinas R (RSPO)**, y que se caracterizan por regular el desarrollo óseo en la etapa embrionaria, mientras que en la etapa adulta controlan la remodelación ósea (Shi et al., 2017).

- **Proteínas con el tripéptido RGD o SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*)** Corresponden a una familia de glicofosfoproteínas que expresan una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos. Este grupo está constituido por la **sialoproteína ósea (SIAL)**, fosfoproteína altamente glicosilada que regula la actividad de los osteoblastos promoviendo la formación y mineralización ósea (Marinovich et al., 2016). La **osteopontina (OSTP)**, expresada en osteoblastos y osteocitos, actúa regulando la formación y mineralización ósea, sobre todo en la etapa de recambio óseo al controlar la actividad y formación de los osteoclastos (Chellaiah & Hruska, 2003). La **fosfoproteína ácida 1 de la matriz de dentina (DMP1)**, expresada en osteoblastos y osteocitos, actúa en la regulación del metabolismo de fosfato y en la mineralización ósea (Jani et al., 2016). La **fosfoglucopeína extracelular de la matriz (MEPE)**, que también es expresada tanto en osteoblastos como osteocitos, y cumple funciones de regulación de los niveles de fósforo sérico, además de participar en la mineralización ósea (Zelenchuk et al., 2015). También se incluye la **fibronectina (FINC)**, una glicoproteína que se une al colágeno tipo I regulando su depósito, al mismo tiempo que participa en la mineralización de osteoblastos (Grzesik & Robey, 1994). En última instancia, se encuentra la **vitronectina (VTNC)**, otra

glicoproteína abundante en el tejido óseo que funciona como factor de adhesión y propagación celular (Grzesik & Robey, 1994).

- **Proteínas de adhesión celular:** Conformado principalmente la familia de las **integrinas**, proteínas de la superficie celular que han demostrado mediar la interacción entre células y proteínas de la MEC, actuando en diversas funciones celulares como la motilidad, propagación, crecimiento y diferenciación. Asimismo, distintas proteínas de la MEC interactúan con integrinas, por ejemplo, el colágeno tipo I y proteínas con secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), por lo que cumplen un rol fundamental en los procesos de formación ósea (Hynes, 2002).
- **Proteínas plasmáticas:** Grupo constituido por proteínas séricas que no son propias del tejido óseo y que probablemente lleguen al hueso por la incorporación de calcio a la matriz osteoide dado que corresponden a proteínas transportadoras (Garnett & Dieppe, 1990) Las más destacadas son la **albúmina (ALBU)** y **alfa-2-HS-glicoproteína (FETUA)**.
- **Factores de crecimiento:** Polipéptidos que intervienen en los procesos de diferenciación, crecimiento y proliferación celular ósea. Se pueden distinguir factores de origen exógeno que llegan al hueso producto de la circulación, y endógenos que son sintetizados por las células óseas (Delmas & Malaval, 1993). Entre estos se incluyen el factor de crecimiento **similar a la insulina-1 (IGF-1)**, **factor de crecimiento similar a la insulina-2 (IGF-2)**, **factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)**,

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteínas morfogénicas óseas (BMP), y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Carvalho et al., 2021; Delmas & Malaval, 1993).

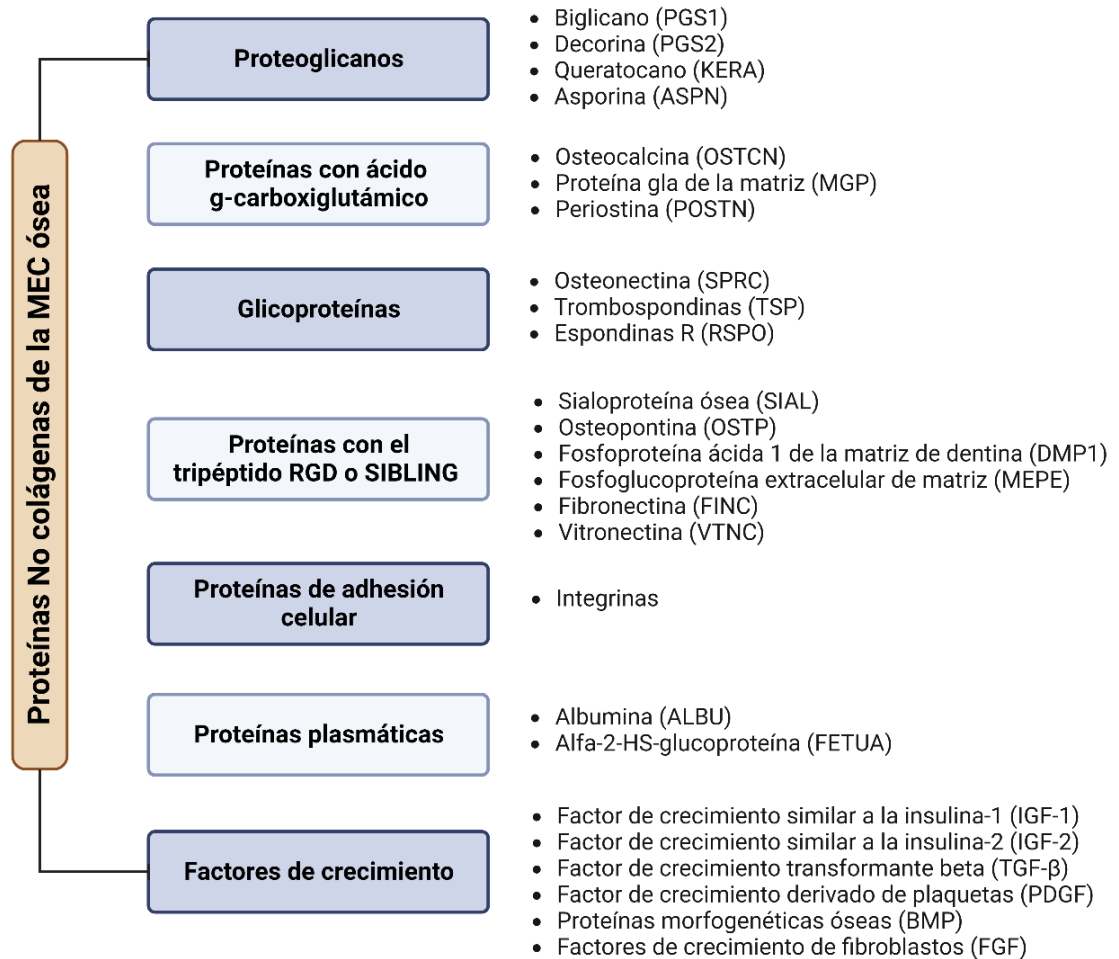


Figura 3. Proteínas no colágenas presentes en la MEC ósea. Se muestran los principales grupos y proteínas no colágenas con mayor presencia en la matriz extracelular ósea.

1.5. Proteínas de la Matriz Ósea y su unión a la Hidroxiapatita.

Las fracciones que componen la matriz ósea descritas anteriormente, es decir, la porción orgánica e inorgánica, se encuentran íntimamente asociadas entre sí en un bloque de construcción común, el colágeno, que actúa como una plantilla para la deposición de la hidroxiapatita, dando origen a la fibrilla de colágeno mineralizada (Weiner & Wagner, 1998).

La literatura señala que tanto el colágeno como las proteínas no colágenas contribuyen a la biomineralización de la hidroxiapatita, ya que los residuos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico) promueven la mineralización de la hidroxiapatita mediante la unión a iones de calcio, interacción que se generaría entre las cadenas laterales cargadas negativamente de dichos aminoácidos y los iones de calcio cargados positivamente en la superficie de los cristales de hidroxiapatita (Chu et al., 2011; George & Veis, 2008). Se ha descrito a las proteínas no colágenas que contienen una gran cantidad de residuos de aminoácidos ácidos, como reguladoras de la morfología del cristal de hidroxiapatita (Xu et al., 2014).

Asimismo, las interacciones entre las proteínas y la hidroxiapatita parecieran además estar mediadas por uniones electrostáticas entre los restos catiónicos y los grupos cargados negativamente en la superficie de los cristales de hidroxiapatita (Duanis-Assaf et al., 2022) (**Figura 4**).

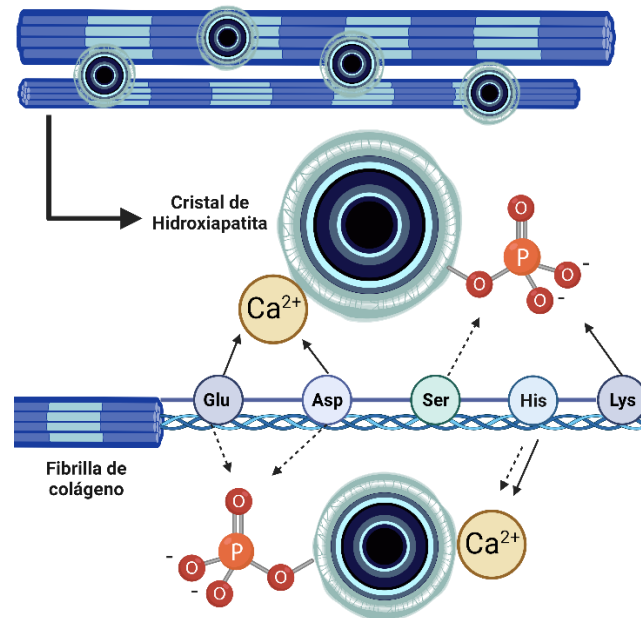


Figura 4. Esquemática de la interacción entre los cristales de hidroxiapatita y las fibrillas de colágeno. Las cadenas laterales cargadas negativamente de los aminoácidos ácidos Glu y Asp interactúan con los iones de calcio cargados positivamente en la hidroxiapatita. A su vez, se generan atracciones electrostáticas entre estos aminoácidos y los iones de fosfato cargados negativamente en la superficie de los cristales. Por otro lado, residuos como serina e histidina pueden formar puentes de hidrógeno con los iones de fosfato y calcio respectivamente. En tanto, la cadena lateral de la histidina puede interactuar con el calcio, y el grupo amino con carga positiva en la cadena lateral de la lisina interactúa iónicamente con los grupos fosfato.

Para comprender el mecanismo de interacción entre las proteínas y la hidroxiapatita, Chung y cols. (2011) utilizaron como sistema modelo péptidos cortos derivados de la presentación de fagos (*phage display*), técnica mediante la cual expresaron un péptido de interés en la cápside de un bacteriófago, para luego examinar la interacción entre este y la hidroxiapatita, descubriendo que aquellos péptidos que presentan una mayor afinidad por la hidroxiapatita se

caracterizan por tener una gran cantidad de residuos hidroxilados, siendo un claro ejemplo de ello, el colágeno. A su vez, determinaron que las secuencias de los péptidos se adhieren a través de enlaces de hidrógeno entre los grupos laterales hidroxilo y los restos de fosfato en el sustrato.

El entorno iónico también ha sido señalado como un mediador en la unión de proteínas a la hidroxiapatita, ya que, por ejemplo, se ha observado que la presencia de calcio podría incrementar la afinidad de la unión a la hidroxiapatita en proteínas como la osteocalcina, la albúmina y la proteína gla de la matriz, mientras que otros elementos como el magnesio, desfavorecerían la unión entre la osteocalcina y la hidroxiapatita, misma situación ocurre con los iones fosfato que reducirían la afinidad en la unión entre la albúmina y la matriz mineral (Roy & Nishimoto, 2002). En general, las propiedades anfóteras de la hidroxiapatita le permiten su unión a distintas proteínas colágenas y no colágenas, lo que resulta provechoso para estas últimas, ya que se ha descrito que la asociación con la matriz mineral les proporcionaría una especie de barrera protectora ante el deterioro hidrolítico *post mortem* (Masters, 1987; Procopio et al, 2021; Smith et al., 2005). Por ende, proteínas colágenas y no colágenas con afinidad por la hidroxiapatita se posicionan como proteínas de interés para estudios sobre la degradación *post mortem* del proteoma.

1.6. Diagénesis Ósea.

El conjunto de modificaciones fisicoquímicos que experimentan los restos óseos en su contexto de depositación es conocido como diagénesis (Hedges et al, 1995; Morales et al., 2021; Trueman & Tuross, 2002).

Se ha definido que los cambios diagenéticos de la estructura ósea se producen por dos procesos principales. La biodegradación, también conocida como bioerosión mediada por la acción de microorganismos y hongos; y la degradación química de la fracción orgánica y mineral del hueso (Turner-Walker, 2008).

Durante el proceso de putrefacción cadavérica, el cúmulo de gases producidos por la acción de bacterias endógenas genera la ruptura abdominal y la exposición de los tejidos internos a la colonización de bacterias exógenas, las que finalmente terminan por reemplazar a las comunidades endógenas. Tal como lo demuestra el estudio de Damann y cols. (2015) quienes, analizando las comunidades bacterianas presentes en costillas provenientes de individuos dispuestos a descomposición controlada, encontraron un predominio de bacterias asociadas al intestino humano durante las primeras etapas de descomposición, es decir, cuando los restos están parcialmente esqueletizados. Estas bacterias endógenas migrarían desde el intestino al resto del cuerpo tras la ruptura de las membranas y la consecuente liberación de los fluidos corporales, alcanzando los huesos dentro de las 48 horas *post mortem* (Jans et al., 2004). Situación completamente diferente se observó en costillas que ya habrían alcanzado por completo la fase

de esqueletización, ya que en esta etapa las bacterias predominantes serían aquellas propias del suelo circundante (Damann et al., 2015).

Ambos tipos de microorganismos son capaces de colonizar y degradar el hueso humano, de hecho, se ha señalado que los microbios son la fuerza motriz de la putrefacción (Zapico & Adserias-Garriga, 2022), cumpliendo un papel clave en la descomposición cadavérica a partir de la acción de enzimas hidrolíticas que desencadenan en la pérdida del colágeno y en una reconfiguración de la porción mineral (Hedges, 2002).

Los procesos diagenéticos, ya sea aquellos impulsados por la actividad microbiana o las fuerzas químicas, están influenciados por diversos factores, tales como el tiempo transcurrido desde la muerte, temperatura, pH, agua, química del suelo y la composición microbiológica propia de cada individuo, generando que inclusive bajo las mismas condiciones ambientales y aún en un mismo tipo de depósito *post mortem*, los restos humanos puedan reaccionar de manera diferente (Caruso et al., 2020).

A nivel histológico, la degradación química en la matriz orgánica, así como la disolución del mineral óseo promovido por la acción microbiana, generan cambios en la porosidad del hueso, existiendo un aumento progresivo en el tamaño de los poros conforme avanza la diagénesis. Lo que sumado a la acción de hongos que se infiltran por dichas microcavidades, provocan la destrucción de las estructuras que conforman la osteona (Caruso et al., 2020). Se cree que la

preservación de biomoléculas y de la integridad ósea, podría vincularse con la composición del tipo de tejido óseo (cortical o trabecular), ya que existiría un cierto consenso en el hecho de que elementos óseos más porosos tienen una mayor presencia bacteriana (Gilbert et al., 2005; Emmons et al., 2020).

En cuanto a la fracción orgánica, en términos generales las proteínas se degradarán en proteosas, peptonas, polipéptidos, y finalmente, en aminoácidos, a velocidades variables y en respuesta a la acción enzimática de bacterias y condiciones desnaturalizadoras de la estructura proteica como la temperatura, pH y humedad del medio circundante. Asimismo, conforme avanza la diagénesis los aminoácidos se verán afectados por procesos de desaminación, decarboxilación y desulfhidratación, permitiendo por completo su reducción a compuestos de nitrógeno, fósforo y azufre (Ioan et al., 2017).

La tasa de descomposición de las proteínas también dependerá del tipo de tejido, produciéndose primero en tejidos blandos y finalmente en tejidos óseos. Un estudio de Procopio y cols. (2018) que analizó la degradación de proteínas por medio de LC-MS/MS en tibias de cerdos dispuestas a descomposición controlada con IPM de 1, 2, 4 y 6 meses, observó que los principales cambios en el proteoma se generan al primer mes *post mortem*. Asimismo, se evidenció que las proteínas plasmáticas y musculares disminuyeron drásticamente su abundancia en dicho período, lo que coincide con los tiempos que tardan en degradarse este tipo de tejidos (Pittner et al., 2020).

En el caso del colágeno, su descomposición se retrasaría dada su resistencia a enzimas hidrolíticas producto de la barrera física que supone su asociación con la fracción inorgánica (Collins et al., 2002). Sin embargo, el desequilibrio en el ambiente circundante genera cambios en la hidroxiapatita, asociados a su disolución y recristalización, permitiendo que microorganismos y enzimas accedan a la fase orgánica y degraden sus componentes, al mismo tiempo que los cambios en la porción orgánica tras la degradación química y biológica, hacen que la hidroxiapatita se torne más vulnerable a las variaciones ambientales, siendo más probable su disolución producto de los espacios en la red cristalina generados por la pérdida del colágeno (Emmons et al., 2020).

Los cambios en la matriz inorgánica se refieren principalmente a una reorganización de los cristales de hidroxiapatita. Cuando estos cristales pierden grupos CO_3^{2-} , adoptan una fase de hidroxiapatita secundaria que es termodinámicamente más estable (Trueman et al., 2008). Se cree que este proceso es promovido por la disminución del contenido de colágeno a medida que avanza la diagénesis. Durante este periodo, la recristalización ósea sigue el proceso de maduración de Ostwald, que implica la disolución de los cristales más pequeños y su posterior deposición en la superficie de los cristales de mayor tamaño, que son más energéticamente favorables (Caruso et al., 2020; Trueman et al., 2004).

1.7. Degradación de Proteínas en Restos Óseos para la Estimación del IPM.

En la actualidad, escasas publicaciones han abordado la estimación del intervalo *post mortem* a partir del análisis proteómico en restos óseos, sin embargo, dichas investigaciones han proporcionado información valiosa para la comprensión de la degradación del proteoma óseo (Zissler et al., 2020).

En este sentido, los estudios en el área sugieren que el aumento del IPM genera cambios en el proteoma óseo asociados principalmente a una pérdida en la diversidad y a una disminución en la abundancia de las proteínas. Prieto-Bonete y cols. (2019) analizando muestras de fémur de individuos femeninos y masculinos exhumados desde nichos de cementerio, identificaron que restos óseos con IPM menores a 12 años conservan proteínas del tipo sanguíneas, colágenas y no colágenas, mientras que a IPM mayores a 12 años, la diversidad proteómica se limita a la presencia de proteínas colágenas y ciertas proteínas asociadas a la matriz ósea. En tanto, Procopio y cols. (2017) al comparar el proteoma a un tiempo inicial y luego de un año en muestras provenientes de huesos largos de cerdo, observaron que las muestras frescas tienen un mayor número de proteínas ubicuas y sanguíneas en relación con las muestras tardías.

En lo que respecta a los cambios en el proteoma en términos de abundancia, Procopio y cols (2018) evaluando tibias de cerdo que fueron puestos a descomposición controlada por un período de hasta 6 meses, evidenciaron que

entre el primer y segundo mes *post mortem* existiría un *peak* de degradación que afecta en su mayoría a proteínas sanguíneas y citoplasmáticas, seguido por un periodo de decaimiento menos pronunciado en la abundancia global de las proteínas durante los meses siguientes. Sin embargo, se desconoce si en restos con mayores datas *post mortem* es posible encontrar un cambio abrupto en la disminución de la abundancia del proteoma en general, y en este sentido, los resultados del estudio de Bonicelli y cols. (2022a) que analizan muestras de fémur provenientes de cementerios con IPM entre 1 a 37 años, dejan entrever que a los 13 años *post mortem* podría encontrarse otro punto de decaimiento, no obstante, esta medición corresponde a un solo individuo y no constituye un aspecto de discusión entre los autores, representando más bien un resultado preliminar que denota una gran variabilidad entre las proteínas analizadas, lo cual requiere ser replicado en mediciones con un mayor tamaño muestral para ser validado.

Siguiendo la línea en torno a la evaluación de los cambios *post mortem* del proteoma en términos de diversidad y/o abundancia, se han identificado distintas proteínas que podrían tener una potencial aplicabilidad para la estimación del intervalo *post mortem* tardío en restos óseos.

Entre las proteínas comúnmente reportadas se encuentra el colágeno tipo I, (COL1A1 y CO1A2) que fue evaluado en muestras de huesos largos de 80 individuos con IPM entre 5 a 47 años por medio de un análisis HPLC-MS/MS,

cuyos resultados demuestran que los péptidos de esta proteína se reducen de forma significativa ($p=0.005$) en IPM superiores a 20 años, pasando de 0.85 ± 1.66 péptidos por gramo de hueso en muestras con IPM menores a 20 años, a 0.08 ± 0.23 péptidos por gramo de hueso para muestras con IPM mayores a 20 años (Pérez-Martínez et al., 2017). A su vez, los autores de este estudio indican que, tras realizar un análisis discriminante, este parámetro es capaz de clasificar correctamente las muestras en un 68,9%, cifra que aumentaría a un 92,0% cuando se trata sólo de muestras con IPM mayores a 20 años, pero que se reduce a un 40% en el caso de restos con datas menores a 20 años (Pérez-Martínez et al., 2017). Por ende, el colágeno tipo I pareciera ser un buen candidato para la evaluación de tiempos *post mortem* de larga data, debido principalmente a su prolongada preservación en la matriz ósea (Prieto-Bonete et al., 2019; Wadsworth & Buckley, 2014).

Otras proteínas colágenas también han demostrado su aplicabilidad en la estimación del IPM, tales como, la proteína 1 de la capa intermedia del cartílago (CILP), cadena de colágeno alfa-1(X) (COAA1), proteína de matriz oligomérica de cartílago (COMP) y potenciador de procolágeno C-endopeptidasa 1 (PCOC1), que fueron identificadas en el estudio de Prieto-Bonete y cols. (2019) que emplea huesos largos humanos provenientes de cementerio, sólo en IPM entre 5 a 12 años, no siendo posible su identificación en muestras con mayor data de muerte. El potenciador de procolágeno C-endopeptidasa (PCOC1) también ha sido señalado por Bonicelli y cols. (2022a) como una proteína que ha demostrado una

correlación negativa conforme aumenta el IPM, en este caso, en muestras de fémures humanos con datas de 1 a 37 años. A su vez, la cadena de colágeno alfa-1(III) (CO3A1) y la cadena de colágeno alfa-2(XI) (COBA2), han demostrado una disminución progresiva y significativa conforme aumenta el IPM desde 7 a 28 meses (Mickleburgh et al., 2021).

Del mismo modo, un gran número de proteínas no colágenas que se encuentran comúnmente en la matriz extracelular ósea, podrían ser empleadas en la estimación del IPM. Se ha reportado que proteoglicanos como la decorina (PGS2), disminuye de forma progresiva en muestras con IPM de 7 a 28 meses provenientes de hueso coxal (Mickleburgh et al., 2021). Al igual que la asporina (ASPN) que disminuyó en muestras de tibia con IPM entre 2 días a 28 meses (Bonicelli et al., 2022b) y en muestras de fémur con datas de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022a). Por último, la proteína central de proteoglicano de sulfato de heparán específica de la membrana basal (PGMB), también mostró una disminución conforme aumenta el IPM de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022a).

Asimismo, proteínas con ácido g-carboxiglutámico, como la periostina (POSTN) y la proteína gla de la matriz (MPG), han evidenciado una drástica disminución posterior a un año *post mortem* en muestras de cerdo (Procopio et al., 2017), lo que también se observó en muestras humanas en el caso de la proteína gla de la matriz, donde esta disminuyó conforme aumentaba el IPM de 7 a 28 meses (Mickleburgh et al., 2021).

Ciertas glicoproteínas como la osteonectina (SPRC), han disminuido su abundancia en muestras de cerdo de un año *post mortem* respecto al punto inicial (Procopio et al., 2017). Al igual que proteínas con el tripéptido RGD, como la osteopontina (OSTP), en la cual se ha observado una disminución en muestras de fémur con IPM de 2 días hasta 28 meses (Bonicelli et al., 2022b).

Las investigaciones en el área también han reportado proteínas séricas, como la alfa-2-HS-glicoproteína (FETUA), que fue propuesta como una proteína discriminante para IPM mayores a 12 años, donde según el estudio de Prieto-Bonete y cols. (2019) no se encontraría presente. Sin embargo, esta proteína fue identificada en muestras de la misma pieza ósea (fémur) pero con IPM de hasta 37 años, periodo en el que su disminución se correlacionó significativamente con el aumento del IPM (Bonicelli et al., 2022a). Situación similar ocurre con la albúmina (ALBU), que demostró una disminución progresiva y significativa conforme aumenta el IPM de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022a), lo que previamente también se observó en muestras de cerdo con IPM de 1 a 6 meses (Procopio et al., 2018); y con la subunidad beta de la hemoglobina (HBB), la cual ha registrado diferencias significativas en su abundancia entre muestras frescas de 2 a 10 días versus aquellas ya esqueletizadas con datos de 7 a 28 meses (Bonicelli et al., 2022b) y en muestras de cerdos con IPM de 1 a 6 meses *post mortem* (Procopio et al., 2018).

Del mismo modo, se han identificado otro tipo de proteínas no colágenas potencialmente útiles a la estimación del IPM, las que si bien, a modo general, no corresponden a las proteínas comúnmente reconocidas para el tejido óseo, su presencia se vincula a que cumplen funciones relacionadas a la formación, desarrollo y remodelación ósea, así como también, a la biomineralización y la fibrillogénesis del colágeno (Berasain & Avila, 2014; Cui & Dong, 2022; Hästbacka et al., 1994; Johnson et al., 2000; Lu et al., 2006; Zhang et al., 2021). Entre estas encontramos el receptor de anexina II (AX2R), mucina-15 (MUC15), factor de osificación que contiene el dominio SUN (SUCO), proteína del gen 2 inducida por insulina (INSI2), homeobox proteína DLX-5 (DLX5), miembro 1 de la familia de ectonucleótidos pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP1), transportador de sulfato (S26A2), anfirregulina (AREG) y la proteína 12 que contiene el dominio CCHC con dedo de zinc (ZCH12), que fueron observadas en el estudio de Prieto-Bonete y cols. (2019), donde se clasificaron como proteínas exclusivas de IPM entre 5 a 12 años. A su vez, la familia de dominios de lectinas de tipo C 11 miembro A (CLC11), fibromodulina (FMOD) y el mimecano (MIME), que mostraron una correlación negativa con el aumento del IPM de 1 a 37 años *post mortem* (Bonicelli et al., 2022a). Lo mismo ocurre con la vimentina (VIME) en muestras con IPM de 2 días a 28 meses (Bonicelli et al., 2022b). En tanto, osteomodulina (OMD) y la serina proteasa HTRA1 (HTRA1), disminuyen su abundancia cuando se comparan muestras de cerdo frescas frente a esqueletizadas con IPM igual a un año (Procopio et al., 2017).

Los distintos trabajos publicados develan que ciertas proteínas que no son propias del tejido óseo también exhiben una correlación negativa conforme aumenta el IPM. Se ha propuesto que su presencia en muestras óseas se debe a su nexos con la matriz mineral por mecanismos aún no definidos (Procopio et al., 2018). Tal es el caso de proteínas que unen iones de zinc como la proteína 12 que contiene el dominio CCHC con dedo de zinc (ZCH12) reportada como una proteína cuya presencia/ausencia en muestras humanas se limita a aquellas con IPM de 5 a 12 años (Prieto-Bonete et al., 2019). O aquellas proteínas que unen iones de calcio, como reticulocalbina-3 (RCN3) y nucleobindina-1 (NUCB1), cuyas abundancias han sido reportadas que disminuyen en IPM de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022a), siendo NUCB1 además informada previamente en otro estudio donde muestras de cerdo a tiempo inicial tienen una mayor abundancia proteica que aquellas de 1 año *post mortem* (Procopio et al., 2017).

A su vez, en este grupo encontramos proteínas asociadas a la respuesta inmune como la proteína del complemento C9 (CO9) y la proteína del complemento C3 (CO3) que asociaron su disminución con el aumento del IPM de 7 a 28 meses (Mickleburgh et al., 2021); la cadena ligera de inmunoglobulina lambda-1 (IGL1) y la beta-2-microglobulina (B2MG) en muestras con IPM de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022a).

Otras clasificaciones corresponden a proteínas de unión al ADN como la subunidad del complejo CST CTC1 (CTC1), prelamin-A/C (LMNA) y el factor de

transcripción Maf (MAF) que se describieron como proteínas exclusivas de IPM menores a 12 años (Prieto-Bonete et al., 2019). La histona 4 (H4), en su rol como componente del nucleosoma, también se asoció como un estimador de IPM en un estudio que evaluó muestras de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022b).

Por último, se ha observado que proteínas vinculadas a procesos glucolíticos podrían tener un potencial para la estimación del IPM, como es el caso del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3P), reportado en muestras con IPM de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022b), y la fructosa-bifosfato aldolasa A (ALDOA) que se ha postulado como un potencial biomarcador de estimación de IPM propio de contextos acuáticos, tras observar que su degradación incrementa significativamente conforme aumenta la data de muerte de 0 a 3 semanas *post mortem* (Mizukami et al., 2020).

Si bien existe un abanico de proteínas que pudiesen tener una aplicabilidad en el desarrollo de metodologías para la estimación del IPM en restos óseos, la mayoría de estas proteínas sólo se ha reportado en estudios de forma aislada (**Figura 5**), a excepción de la **asporina** (ASPN) (Bonicelli et al., 2022a; Bonicelli et al., 2022b), la **proteína gla de la matriz** (MGP) (Mickleburgh et al., 2021; Procopio et al., 2017), la **alfa-2-HS-glicoproteína** (FETUA) (Bonicelli et al., 2022a; Prieto-Bonete et al., 2019), la **albúmina** (ALBU) (Bonicelli et al., 2022a; Procopio et al., 2018) y la **subunidad beta de la hemoglobina** (HBB) (Bonicelli et al., 2022b; Procopio et al., 2018). Proteínas que han sido identificadas en

muestras con un amplio rango de tiempo *post mortem* que abarca desde los 2 días hasta los 37 años, siendo extraídas principalmente desde huesos largos (tibias y fémures) en estudios que analizan especialmente muestras de origen humano. Dichas proteínas debiesen ser consideradas en estudios futuros, teniendo en cuenta que aún no existen candidatos proteicos claramente definidos ni estandarizados para la estimación del IPM tardío.

Del mismo modo, es fundamental establecer grupos de proteínas que puedan proporcionar un mejor rendimiento para estimar la data de muerte en diferentes IPM. En este sentido, los resultados de varias investigaciones indican que es necesario prestar especial atención a las proteínas colágenas y no colágenas que tienen una afinidad por la matriz mineral. Esto se debe a que cada vez hay más evidencia de que esta asociación brinda a las proteínas una mayor resistencia a la hidrólisis (Bonicelli et al., 2022a; Prieto-Bonete et al., 2019; Procopio et al., 2018).

Estudio	Aplicación Estimación IPM	Proteínas
Bonicelli et al., 2022b	Disminución progresiva en muestras con IPM de 2 días a 28 meses	ASP N, H4, HBB , OSTP y VIME
Bonicelli et al., 2022a	Disminución progresiva en muestras con IPM de 1 a 37 años	ALBU , ASP N, B2MG, CLC11, CSPG2, FETUA , FMOD, G3P, IGL1, KNG1, MIME, NUCB1, PCOC1, PGMB y RCN3
Mickleburgh et al., 2021	Disminución progresiva en muestras con IPM de 7 a 28 meses	CO3A1, CO9, COBA2, MGP , PGS2, TTHY y CO3
Mizukami et al., 2020	Disminución progresiva en muestras con IPM de 0 a 3 semanas	ALDOA
Prieto-Bonete et al., 2019	Discriminar entre muestras mayores y menores a 12 años	FETUA , AX2R, CILP, COAA1, COMP, MUC15, PCOLCE, SUCO, SOX6, INS12, CTC1, DLX5, LMNA, MAF, CTNNB, ENPP1, S26A2, AREG y ZCH12
Procopio et al., 2018	Disminución progresiva en muestras con IPM de 1 a 6 meses	ALBU y HBB
Procopio et al., 2017	Discriminar entre muestras frescas (IPM=0) y esqueletizadas (IPM=1 año)	MGP , POSTN, OMD, HTRA1, SPCR y NUCB1
Pérez-Martínez et al., 2017	Discriminar entre muestras menores y mayores a 20 años	CO1A1 y CO1A2

Figura 5. Proteínas con potencial aplicación en la estimación del IPM en restos óseos. En rojo se destacan las proteínas que fueron reportadas por más de un estudio.

Resulta importante ahondar en el hecho de que la gran variabilidad exhibida en el proteoma de las distintas investigaciones y el poco consenso entre las proteínas candidatas a biomarcadores de estimación, probablemente responde a las diferencias en las características de diseño propias de cada estudio. En la **Figura 6** se puede observar que las distintas investigaciones difieren en términos del tipo de muestra analizada, ya que cada una proviene de diferentes especímenes con condiciones de sexo, edad e IPM particulares. Asimismo, las

muestras varían en cuanto a la pieza ósea estudiada y en términos de las condiciones medioambientales en las cuales estuvieron inmersos los restos óseos. Factores que podrían estar induciendo variaciones en el proteoma observado en los distintos estudios.















Muestra	IPM	Procedencia	Depósito	Sexo	Edad	Autores
 24 muestras de Tibias	2 días - 28 meses	 Cadáveres en descomposición controlada	Inhumados / Fosas abiertas	Femeninos	61 a 91 años	Bonicelli et al., 2022b
 14 muestras de Fémur	1 - 37 años	 Osamentas de Cementerio	Inhumados / Nichos	Masculinos	29 a 85 años	Bonicelli et al., 2022a
 16 muestras de Tibia y Coxal	7 - 28 meses	 Cadáveres en descomposición controlada	Inhumados / Fosas abiertas	Femeninos	61 a 91 años	Mickleburgh et al., 2021
39 muestras de huesos largos (sin especificar)	0 a 28 semanas	 <i>Rattus rattus</i> descomposición controlada	Inhumados / Expuestas	No informado	No informada	Procopio et al., 2021
22 muestras de Tibias	0 - 3 semanas	 <i>Mus musculus</i> descomposición controlada	Agua de grifo/ de estanque/ salada / clorada	No informado	No informada	Mizukami et al., 2020
 40 muestras de Fémur	5 - 20 años	 Osamentas de Cementerio	Nichos	Femeninos y Masculinos	20 a 93 años	Prieto-Bonete et al., 2019
40 muestras de Tibias	1 a 12 meses	 <i>Sus scrofa</i> descomposición controlada	Inhumados	Masculinos	3 a 5 semanas	Procopio et al., 2018
15 muestras de Fémur, Tibia, Escápula y Metatarso	0 y 1 año	 <i>Sus scrofa</i> descomposición controlada	Inhumados / Superficie	No informado	12 días a 24 meses	Procopio et al., 2017
 80 muestras de Fémur, Tibia y Húmero	5 - 47 años	 Osamentas de Cementerio	Nichos	Femeninos y Masculinos	20 a 97 años	Pérez-Martínez et al., 2017

Figura 6. Diseño experimental de los estudios sobre la degradación *post mortem* del proteoma en restos óseos. Se enlistan 9 estudios en orden cronológico, de los cuales 5 utilizan muestras de origen humano y 4 de origen animal, con intervalos *post mortem* desde 2 días hasta 47 años. En general, se analizan huesos largos, que difieren en términos de sexo, edad y condiciones de depósito.

En otro ámbito, respecto a los factores que intervienen en la preservación del proteoma óseo, se ha informado que las condiciones de depósito parecieran tener un efecto menor en el nivel de preservación de las proteínas, en comparación a otros agentes comúnmente vinculados a la degradación proteica. Así lo ha sugerido el estudio de Bonicelli y cols (2022a), quienes, luego de evaluar el proteoma de 14 individuos masculinos provenientes de un cementerio en Italia, no identificaron cambios significativos en el proteoma de cadáveres inhumados frente a aquellos que fueron dispuestos en nichos sobre la superficie, indicando que son otros factores los que tendrían un mayor impacto en la degradación de las proteínas. Mickleburgh y cols. (2021) tampoco encontraron diferencias significativas en el proteoma en términos del número ni de las abundancias de las proteínas extraídas, en muestras óseas de cadáveres femeninos dispuestos a descomposición controlada en entierros de poca profundidad versus las muestras provenientes de fosas abiertas. Misma conclusión, propone Mizukami y cols. (2020) tras analizar la descomposición del proteoma en muestras óseas de ratones procedentes de distintos ambientes acuáticos *post mortem*, e identificar que los mayores cambios en el proteoma se debían principalmente al aumento en el IPM y no por los contextos de depósito en el que estuvieron las muestras.

Sin embargo, se ha reportado que existirían variaciones en el proteoma dependiendo de qué tan expuestos o protegidos se encuentren los restos óseos. Un estudio de Procopio y cols. (2021), simuló la descomposición del proteoma

por 28 semanas de huesos de roedores en muestras descarnadas, desmembradas y a cuerpo entero (esto es, huesos largos sin tejido adyacente, sólo el miembro inferior y el cuerpo completo del roedor), las que fueron depositadas en condiciones expuestas en el caso de muestras desmembradas y muestras de cuerpo entero, en tanto las muestras descarnadas fueron enterradas. Sus resultados evidencian que los perfiles proteómicos varían significativamente según el tipo de muestra, siendo las muestras desmembradas las que más difieren de los otros grupos, al presentar una menor abundancia de proteínas plasmáticas y de la médula ósea. Situación que según los autores podría vincularse al hecho de que las muestras de cuerpo entero y las muestras descarnadas, se encuentran protegidas respectivamente por el tejido blando intacto y por la tierra. Restos descarnados estarían influenciados principalmente por la acción de bacterias exógenas, mientras que las muestras expuestas a la superficie estarían sometidos a efectos de la autólisis, acción microbiana externa e interna y a condiciones ambientales fluctuantes que potenciarían la degradación del proteoma, sobre todo, en el caso de las muestras desmembradas que, al tener tejido expuesto en los sitios de corte, serían más permeables a los fenómenos diagenéticos.

Pese a lo anterior, aún no es del todo claro cuáles serían aquellos elementos que inducen una mayor variabilidad en el proteoma óseo ni aquellos que generan una preservación diferencial de las proteínas tras la muerte de un individuo. No obstante, los resultados de los trabajos actuales sugieren que el proteoma óseo

varía según la pieza ósea analizada y la zona anatómica desde la cual se extraen las muestras. La investigación desarrollada por Mickleburgh y cols. (2021), previamente mencionada, que analizó muestras de la diáfisis de tibias y de crestas iliacas de 4 donantes femeninas entre 61 y 91 años dispuestas a descomposición controlada durante 28 meses, concluyó que la abundancia y diversidad del proteoma de osamentas depende de características tales como la irrigación sanguínea y densidad de cada hueso. Es así como restos óseos más porosos y vascularizados (como la cresta ilíaca) tenderán a describir proteomas ricos en proteínas sanguíneas, mientras que piezas óseas con mayor proporción de tejido cortical (como la tibia), presentan un mayor número de proteínas asociadas a la matriz ósea.

Dichos datos, respaldan lo evidenciado previamente en estudios con modelos animales, en donde muestras tomadas de distintas piezas óseas de huesos de cerdo como fémur, tibia, escápula y metatarsos, con un IPM= 1 año, se agruparon de manera diferencial en el análisis de PCA realizado sobre las abundancias de las proteínas extraídas, lo cual indicaría que cada pieza ósea expresa un patrón de abundancia proteómica que es hueso específico. Asimismo, al evaluar la zona anatómica de extracción, se identificaron diferencias entre aquellas muestras extraídas desde las epífisis y diáfisis de huesos largos, siendo esto último, el factor que supuso una mayor variabilidad dentro de este estudio, y que podría estar relacionado con el proceso fisiológico de osificación y elongación ósea, que

conduce a la presencia de distintas poblaciones celulares y tipos de tejido en las diferentes partes del hueso (Procopio et al., 2017).

En definitiva, y considerando los resultados de las distintas investigaciones sobre la degradación del proteoma en restos óseos, es posible señalar que para avanzar hacia el desarrollo de metodologías que permitan la estimación del IPM en función del proteoma óseo, es crucial ampliar los estudios a mayores y nuevas condiciones *post mortem*. Las distintas publicaciones en el área se enfocan principalmente en huesos largos, osamentas con un gran porcentaje de tejido cortical y que se ubican en las extremidades del cuerpo, siendo escasos los trabajos que analizan otras piezas óseas con mayor incidencia de tejido trabecular o que se ubican en el eje axial del cuerpo, área que podría estar influenciada por otros factores diagenéticos como la microbiota intestinal. Del mismo modo, los distintos estudios responden a características de diseño particulares y disímiles entre sí en cuanto al número de muestras, tiempos *post mortem*, condiciones de depósito y tipo de muestra analizada, lo que, sumado a variaciones intrínsecas entre individuos de una misma investigación y los grupos poblacionales evaluados, impiden realizar comparaciones sustantivas que permitan perfilar candidatos proteicos de estimación. Por ende, nuevas condiciones experimentales son necesarias para proporcionar una visión más detallada sobre la degradación del proteoma óseo, y con ello, proporcionar estrategias para su potencial aplicación a la estimación precisa y acotada del intervalo *post mortem* tardío.

2. HIPÓTESIS

Los antecedentes proporcionados por la literatura demuestran que las proteínas colágenas y no colágenas presentes en muestras de tejido óseo, podrían ser empleadas como biomarcadores que aporten información para la estimación del intervalo *post mortem* tardío en restos óseos.

Las distintas investigaciones sobre degradación *post mortem* del proteoma óseo, sugieren que la dinámica que exhiben los restos óseos en cuanto a la diversidad y abundancia proteica conforme aumenta el intervalo *post mortem*, podría tributar a la estimación del IPM tardío, sobre todo, aquellos cambios que se evidencian en proteínas estructurales y funcionales de mantenimiento, modelación y remodelación ósea, asociadas al colágeno o a la matriz mineral presente en huesos. Sin embargo, aún no es del todo claro cuáles son las modificaciones que sufre el proteoma óseo a lo largo del periodo *post mortem*, asimismo, se desconoce si se pudiese establecer un ritmo al cual se degradan las proteínas en los restos óseos, de manera tal que sea factible asignar ya sea un patrón de presencia/ausencia o de abundancia de un grupo de proteínas, a un determinado intervalo de tiempo *post mortem*.

La falta de información en torno a la dinámica de la degradación *post mortem* del proteoma óseo y su potencial aplicación en la estimación del IPM tardío, respondería en parte al reducido número de trabajos en el área y a las limitaciones propias de cada estudio en términos de variabilidad, principalmente

respecto al origen de las piezas óseas estudiadas, el tipo de hueso y las datas de muerte analizadas, así como también el contexto de depósito en el cual estuvieron inmersas las muestras. Elementos que deben ser ampliados a fin de recopilar una mayor cantidad de antecedentes para alcanzar un desarrollo robusto de esta incipiente línea de investigación.

Dado lo anterior, surge la interrogante sobre ¿cómo se comporta el proteoma de osamentas humanas en otro tipo de huesos y condiciones de entierro propias del contexto nacional?, ¿es posible identificar similitudes en el decaimiento del proteoma con respecto a los estudios existentes?, y acaso ¿es esta dinámica del proteoma capaz de proporcionar parámetros que aporten a la estimación del intervalo *post mortem* tardío? Frente a lo cual se propone la siguiente hipótesis:

La dinámica del proteoma de osamentas humanas, en términos de diversidad y abundancia, proporciona información relevante para la estimación del intervalo *post mortem* en individuos esqueletizados, aportando en la identificación de potenciales marcadores proteicos para la estimación de la data de muerte en restos óseos humanos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Explorar la dinámica del proteoma de osamentas humanas a distintos IPM en términos de diversidad y abundancia, a fin de evaluar si esta es informativa para la estimación de la data de muerte en restos óseos a partir de muestras de costillas y tibias humanas.

3.2. Objetivos Específicos.

1. Estandarizar un protocolo de extracción de proteínas a partir de muestras óseas para análisis proteómicos.
2. Caracterizar el proteoma presente en las muestras óseas de costillas y tibias humanas.
3. Identificar candidatos proteicos que den cuenta de los cambios en diversidad y abundancia en el proteoma de osamentas humanas conforme aumenta el IPM.

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención de Material Biológico para Análisis Proteómico.

Se realizó la extracción de los restos óseos a partir de costillas y tibias de 15 individuos masculinos, con edades entre 20 a 50 años provenientes de dos contextos. El primero, denominado como contexto cadavérico, corresponde a muestras de 5 individuos procedentes de donaciones cadavéricas, de los cuales se extrajo una muestra ósea aproximadamente luego de un mes de la muerte del individuo. Para efectos de este trabajo, este contexto es considerado como IPM temprano, ya que los cuerpos estuvieron en condiciones de preservación a temperaturas entre 2°C a 6°C antes de la toma de muestra, por lo que contienen tejidos blandos asociados. De este grupo, sólo fue posible extraer fragmentos de costillas izquierdas, las cuales fueron almacenadas a -20°C durante un año, y se consideraron como muestras control debido a que presentan la data de muerte más reciente.

En tanto, el segundo grupo se caracteriza por ser restos de larga data que ya se encuentran en la fase de esqueletización, los que fueron obtenidos a partir de resacas de cementerios con intervalos *post mortem* de 15 y 20 años, por lo que en este trabajo son referidos en conjunto como IPMs tardíos. De los 5 individuos que conforman el grupo con IPM de 15 años se extrajo un fragmento tanto de costilla como de tibia izquierda, al igual que para los otros 5 individuos que componen el intervalo de 20 años, tal como se muestra en la **Figura 7**.

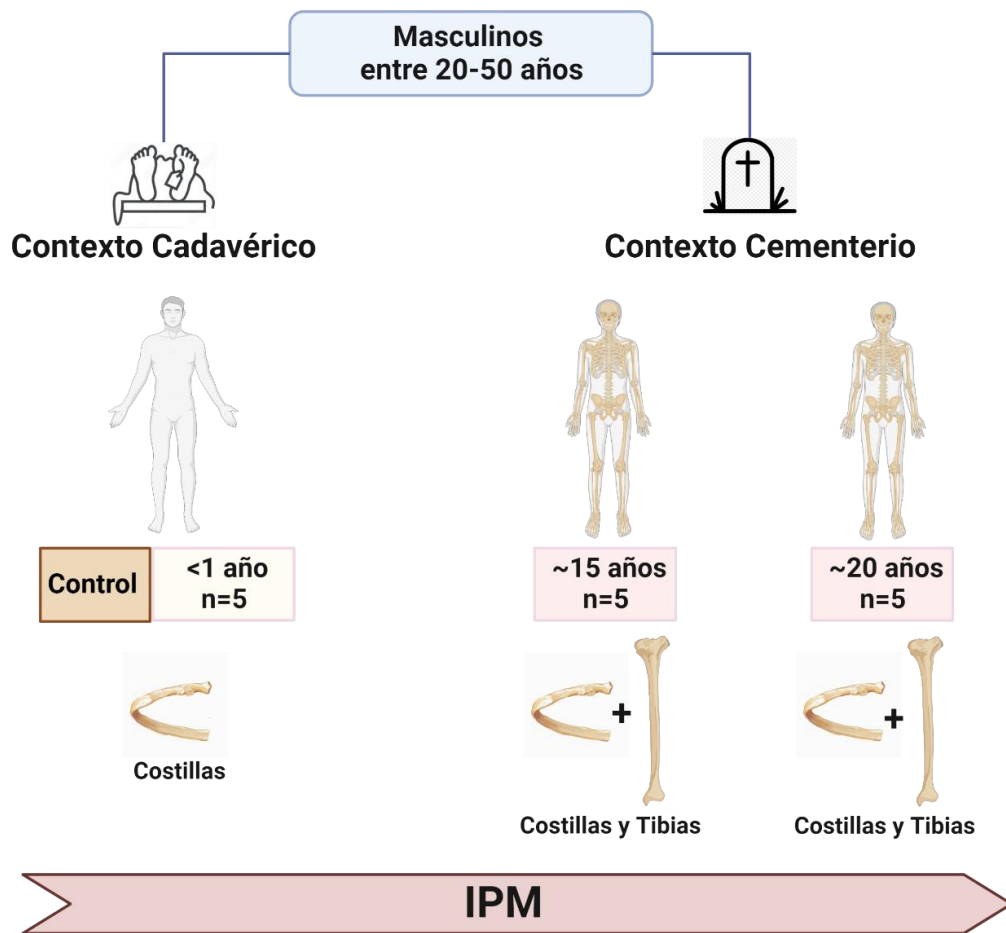


Figura 7. Diseño experimental del estudio. Se extraerán piezas óseas de 15 individuos masculinos de 20 a 50 años, con IPM tempranos (<1 año) provenientes de donaciones cadavéricas, e IPMs tardíos (15 y 20 años) procedentes de resacas de cementerios. De todos ellos se tomará la costilla izquierda y sólo en el caso de individuos provenientes de cementerios también se trabajará con tibia izquierda, de manera tal, que se analizará el proteoma de un total de 25 restos óseos.

En particular, los restos del contexto cadavérico se extrajeron durante el primer semestre del 2021 a partir de donantes cadavéricos que bajo su expresa voluntad ante notario cedieron su cadáver al “Programa de Donantes de Cuerpo a la Ciencia” del Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Chile conforme al Artículo 146 del Decreto 725 correspondiente al Código Sanitario, donde se indica que toda persona plenamente capaz puede disponer de su cadáver, o de partes de él, con la finalidad de que sea utilizado para investigación científica o docencia universitaria.

En tanto, los restos de individuos esqueletizados fueron recopilados a partir de resacas realizadas en el Cementerio General de la comuna de Recoleta en los meses de octubre y diciembre del año 2021, bajo la solicitud, por parte de la misma entidad académica enunciada anteriormente, del Artículo 38 del Decreto Supremo 357/70 que establece el reglamento general de cementerios, en el cual se señala que restos de sepulturas temporales cuyo plazo de ocupación se encuentre vencido, podrán ser entregadas a título gratuito a entidades universitarias para fines de investigación o docencia.

Las muestras recopiladas fueron cedidas por parte del Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Chile bajo la figura de colaboración entre dicha entidad y este proyecto de investigación.

Resulta de gran importancia destacar que se decidió trabajar con muestras provenientes de costillas humanas, puesto que son la única pieza ósea que es

factible de obtener de los distintos contextos y tiempos *post mortem* definidos para este estudio, principalmente en el caso de las muestras provenientes de individuos en fase cadavérica, donde su extracción no supone una alteración en la estética de los individuos. Es por esta razón, que las tibias sólo estarán disponibles en el caso de individuos esqueletizados. Por otro lado, se trabajará en específico con huesos provenientes del lado izquierdo como una forma de estandarizar las extracciones. Del mismo modo, la selección del lado izquierdo se realizó considerando que en términos poblacionales existe una mayor proporción de personas diestras, por lo que estas piezas óseas al no corresponder en principio al lado dominante del individuo, se asume que estarían menos influenciadas por las actividades y modos de vida propios de cada individuo, por ende, presentarían una menor variación en términos de morfología y desarrollo óseo.

Cabe señalar, que debido a la naturaleza acotada de esta propuesta y con el fin de reducir al máximo la variabilidad en el diseño experimental, sólo se consideró una condición de entierro para las muestras de individuos en fase de esqueletización, las que fueron extraídas desde resacas del mismo cementerio, y en particular, de un patio de entierro en específico, a fin de proporcionar condiciones de inhumación lo más idénticas posible, controlando así, parte de la variabilidad ambiental que afecta directamente la degradación del material biológico.

4.1.1. Requerimientos para el Trabajo con Restos Óseos Humanos.

Para llevar a cabo esta investigación, se debieron establecer en primera instancia acuerdos de colaboración con el Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Chile, quienes, como ya se mencionó, donaron al presente trabajo las muestras tanto de contextos cadavéricos como de cementerios. Así como también con el Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Concepción, y el Servicio Médico Legal Sede Concepción, quienes brindaron asesoría técnica en cuanto a las pautas para un adecuado manejo y traslado de los restos. Finalmente, bajo el “convenio marco de colaboración entre MELISA institute, Genomics & Proteomics Research SPA y la Universidad de Concepción”, fue factible llevar a cabo los experimentos de proteómica en el Instituto Melisa.

Por otro lado, la investigación fue sometida a evaluación por parte del comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, quienes determinaron que el estudio cumple con la normativa requerida para su ejecución con fecha 2 de mayo de 2022 (**Anexo N°1**).

4.1.2. Extracción de Muestras Óseas Cadavéricas y Esqueletizadas.

Los restos óseos fueron extraídos de manera diferencial según su contexto de origen siguiendo un protocolo de obtención que se resume en la **Figura 8**. En cada caso, los procedimientos, zonas anatómicas de extracción, condiciones y materiales de almacenamiento y traslado, se definieron en función de las características propias de cada muestra y los lineamientos de bioseguridad.

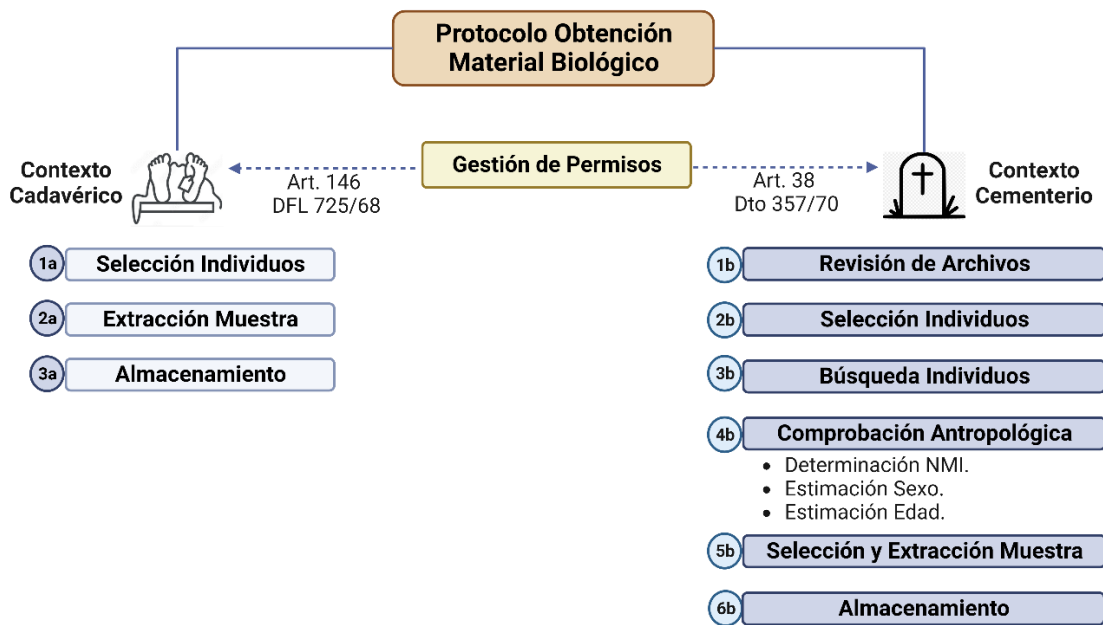


Figura 8. Protocolo para la obtención del material biológico. Muestras cadavéricas se obtuvieron siguiendo etapas de selección, extracción y almacenamiento, mientras que las muestras de cementerio conllevaron una etapa de revisión, selección, búsqueda de individuos, comprobación antropológica de parámetros biológicos, extracción y almacenamiento de muestras. La extracción de restos óseos requiere previamente de la gestión de permisos, como la solicitud del Art. 146 del Decreto con Fuerza de Ley 725 para el caso de donantes cadavéricos, y del Art. 38 del Decreto 357 cuando se trata de restos de individuos provenientes de cementerios.

En detalle, el procedimiento de extracción de las muestras de donantes cadavéricos consistió en: (1a) seleccionar entre los individuos que ingresaran al programa de “Donantes de Cuerpo a la Ciencia” del Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Chile, aquellos que fuesen de sexo masculino con edades entre 20-30 años y con causas de muerte que, en general, no supusieran una enfermedad metabólica o infecciosa significativa. (2a) Extraer un fragmento de la cuarta costilla izquierda y (3a) almacenar la muestra en un frasco plástico con tapa hermética a -20°C con la rotulación y código de identificación correspondiente. Tanto la extracción como el almacenamiento de la muestra, se ejecutó por parte de funcionarios del Programa de donantes cadavéricos del Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Chile, empleando el equipo de protección personal necesario y al interior de las instalaciones del departamento donde se llevan a cabo procedimientos con material cadavérico.

Por otro lado, para las muestras provenientes de resacas de cementerio se (1b) accedió al listado de registro de resaca del Cementerio General de Recoleta, donde se indican los individuos dispuestos a resacas según los distintos patios de entierro asociado a su respectivo código de identificación, el cual permite buscar entre los libros de registros de entierro datos como la edad, fecha y causa de muerte de los individuos. (2b) Se seleccionaron los individuos que cumplían con las características del diseño experimental y se anotó el código asociado a la bolsa mortuoria. Posteriormente, se dio paso a (3b) la búsqueda de las bolsas

que contienen los restos de cada individuo al interior de las bodegas y espacios de cremación, lo que se realizó en conjunto con el personal del cementerio utilizando el equipo de protección personal necesario. Cada bolsa se revisó a fin de identificar si estaba presente o no la pieza ósea de interés. De ser así, se dio paso a (4b) una etapa de comprobación antropológica de los restos para confirmar que efectivamente se estaba trabajando con un solo individuo masculino entre 20 a 50 años por bolsa, a partir de métodos morfognósticos para la determinación del número mínimo de individuos y la estimación del sexo e intervalo etario de los restos óseos, los cuales se describen a continuación:

- **Determinación del Número Mínimo de Individuos:** Para identificar la cantidad de individuos presentes en cada bolsa, se decidió trabajar con el número mínimo de individuos (NMI), correspondiente a la estimación mínima del número de individuos que contribuyen dentro de una muestra (Nikita & Lahr, 2011). El NMI es el método de cuantificación mayormente aplicado en el análisis osteológico de restos provenientes de contextos complejos, ya que permite marcar un límite a partir del cual se puede determinar que hay una posibilidad de que existan más individuos, pero nunca menos (Vaduvesković & y Djuric, 2020). Su cálculo se estableció siguiendo la fórmula:

$$\text{NMI} = \text{MÁX} (L, R)$$

Donde, L corresponde al número de huesos izquierdos, y R al número de huesos derechos. Para estimar el máximo de piezas óseas izquierdas y derechas, se consideraron porciones específicas de huesos pares, por ejemplo, epífisis distal de tibia, a fin de garantizar que fragmentos de un mismo hueso pertenecientes a un mismo individuo no se cuenten como dos individuos distintos. (Adams & Konigsberg, 2004).

- **Estimación del Sexo Biológico:** La estimación del sexo se realizó empleando el análisis morfológico del hueso coxal y del cráneo, priorizando el primero sobre el segundo cuando ambos elementos estuvieran presentes. Estas piezas óseas han demostrado tener un mayor dimorfismo sexual, y cuyas metodologías para la estimación del sexo presentan el mayor porcentaje de confianza con un 96% y un 80-92% respectivamente (Krenzer, 2006).

En el hueso coxal se analizó la región subpúbica siguiendo el método propuesto por Phenice en 1969, el cual analiza el arco ventral, el ángulo subpúbico y la rama isquiopúbica, atribuyendo una calificación de “vacío”, cuando no es posible analizar el hito, “1”, en individuos femeninos, “2”, en casos de indeterminado, y “3”, en individuos masculinos. Cada uno de estos tres aspectos se esquematizan en la **Figura 9A**, donde se observa que el arco ventral y la concavidad subpúbica sólo está presente en individuos femeninos, en tanto, el aspecto medial de la rama isquiopúbica

es ancha y roma en masculinos, mientras que es aguda y estrecha en femeninos.

Otro punto de análisis en coxal fue la escotadura ciática mayor, la cual tiende a ser estrecha y angosta en masculinos, en tanto, es amplia y ancha en individuos femeninos (Buikstra & Ubelaker, 1994), tal como se observa en la **Figura 9B**. Finalmente, en coxal también se analizó la presencia y grado de desarrollo del surco preauricular, el cual está comúnmente presente en individuos femeninos y ausente o con un grado mínimo de desarrollo en individuos masculinos (Buikstra & Ubelaker, 1994). (**Figura 9C**).

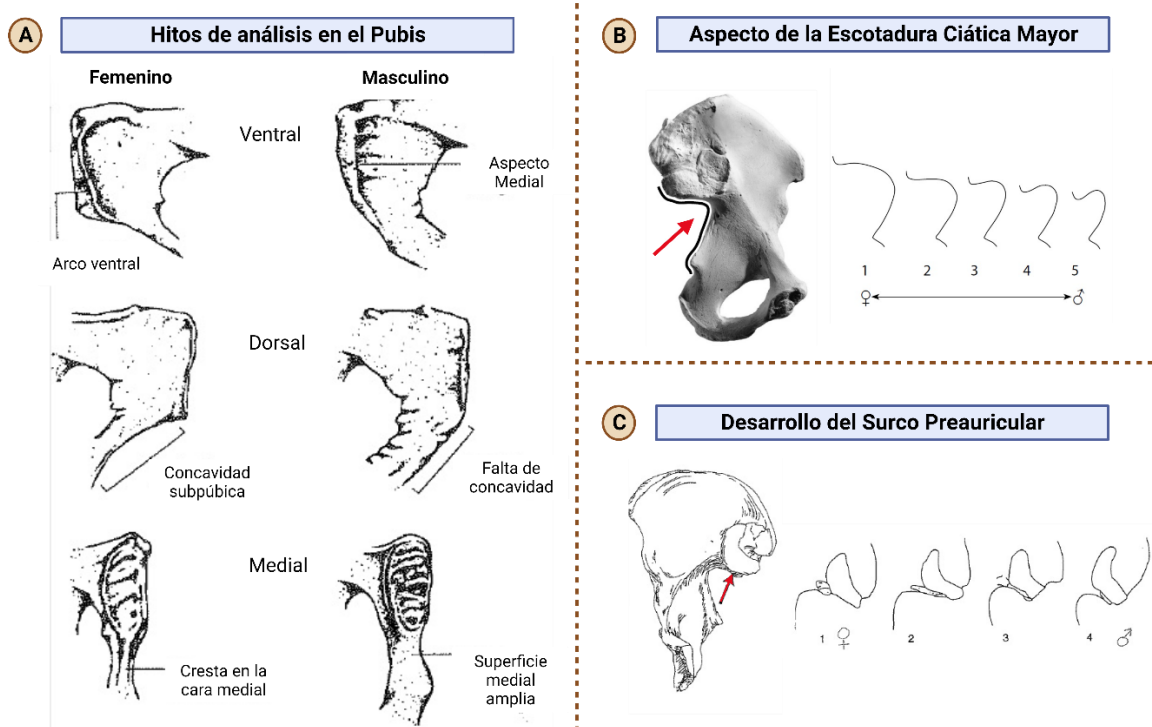


Figura 9. Puntos de análisis morfológico del hueso coxal para la estimación del sexo. (A) Aspectos analizados en el pubis para la estimación de sexo según lo propuesto por el método de Phenice (1969). De superior a inferior, arco ventral, concavidad subpúbica y aspecto medial de la rama isquiopúbica (Buisktra & Ubelaker, 1994). (B) Dimorfismo sexual en la escotadura ciática mayor en una escala de 1 a 5, donde 1 corresponde a individuos hiperfemeninos y 5 a hipermasculinos (White, Black & Folkens, 2012). (C) Grado de desarrollo del surco preauricular en una escala de 1 a 4, donde 1 corresponde a individuos hiperfemeninos y 4 a hipermasculinos (Buisktra & Ubelaker, 1994).

En cuanto al análisis de la estructura del cráneo para la estimación del sexo, se analizó la cresta nugal, el proceso mastoideo, el margen supraorbital, la prominencia de la glabella y la eminencia mentoniana. Estructuras que en general son más robustas y desarrolladas en individuos masculinos que en femeninos, producto de la inserción muscular que se genera en estas áreas (Rodríguez, 2004). La proyección de la cresta nugal es mayor en individuos masculinos, al igual que el volumen y desarrollo del proceso mastoides. El margen supraorbital se caracteriza por ser romo y grueso en masculinos, a diferencia de los femeninos que son filosos y delgados. En tanto, la proyección de la glabella y de la eminencia mentoniana es mayor en individuos masculinos que en femeninos (Buisltra & Ubelaker, 1994). (**Figura 10**).

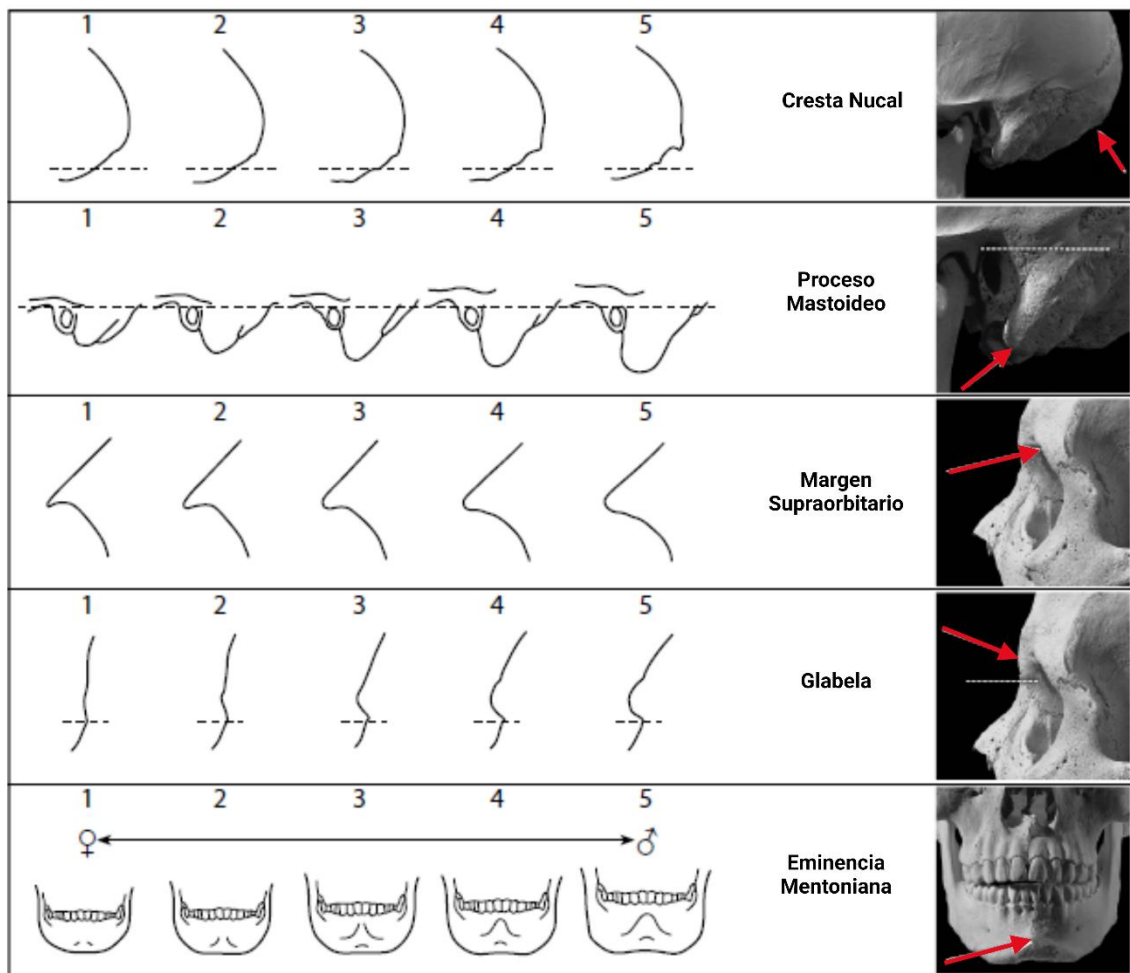


Figura 10. Puntos de análisis morfológico del cráneo para la estimación del sexo. De superior a inferior se observa la cresta nucal en el hueso occipital, proceso mastoides del temporal, margen supraorbital y glabela en el frontal, finalmente la eminencia mentoniana de la mandíbula. Grados de desarrollo del dimorfismo sexual en una escala de 1 a 5, donde 1 corresponde a individuos hiperfemeninos y 5 a hipermasculinos (White et al., 2012).

- **Estimación de la edad:** La estimación de la edad de los individuos se realizó en función del análisis de la sínfisis púbica y de la carilla auricular que están presentes en el hueso coxal.

Se evaluaron los cambios morfológicos de la rampa ventral, dorsal y el aro sinfisial de la sínfisis púbica, en función del método propuesto por Suchey & Brooks (1990) (**Figura 11**), el cual clasifica las edades de los individuos en 6 fases que se encuentran diferencias por sexo, y que además cada una cuenta con un estadio temprano y otro tardío. Individuos con edades más tempranas se caracterizan por presentar ondulaciones, crestas y surcos en la cara sinfisial, las que desaparecen progresivamente conforme se avanza en edad y son reemplazadas por micro y macroporosidades, que se acompañan de la formación de un borde o aro sinfisial que finalmente culmina en una labiación (Rodríguez, 2004).



Figura 11. Fases del método propuesto por Suchey-Brooks (1990) de estimación de edad para individuos masculinos. Se observan los cambios morfológicos de la sínfisis púbica donde las edades promedio para cada etapa corresponden a: Etapa 1: 18.5 ± 2.1 años. Etapa 2: 23.4 ± 3.6 años. Etapa 3: 28.7 ± 6.5 años. Etapa 4: 35.2 ± 9.4 años. Etapa 5: 45.6 ± 10.4 años. Etapa 6: 61.2 ± 12.2 años (White et al., 2012).

Los cambios morfológicos de la carilla auricular fueron evaluados siguiendo el método propuesto por Lovejoy et al. (1985), donde la edad se correlaciona con las variaciones en la ondulación, estrías, granulación superficial, microporosidad, macroporosidad y organización transversal de la superficie auricular. Estas se clasifican en 8 fases, las que se guían bajo la misma lógica de lo ya descrito en el caso de la sínfisis púbica, es

decir, adultos jóvenes presentan ondulaciones que se pierden con la edad, a la vez que se generan procesos erosivos marcados por la aparición de micro y macroporosidades, como es posible observar en la **Figura 12** (White et al., 2012).

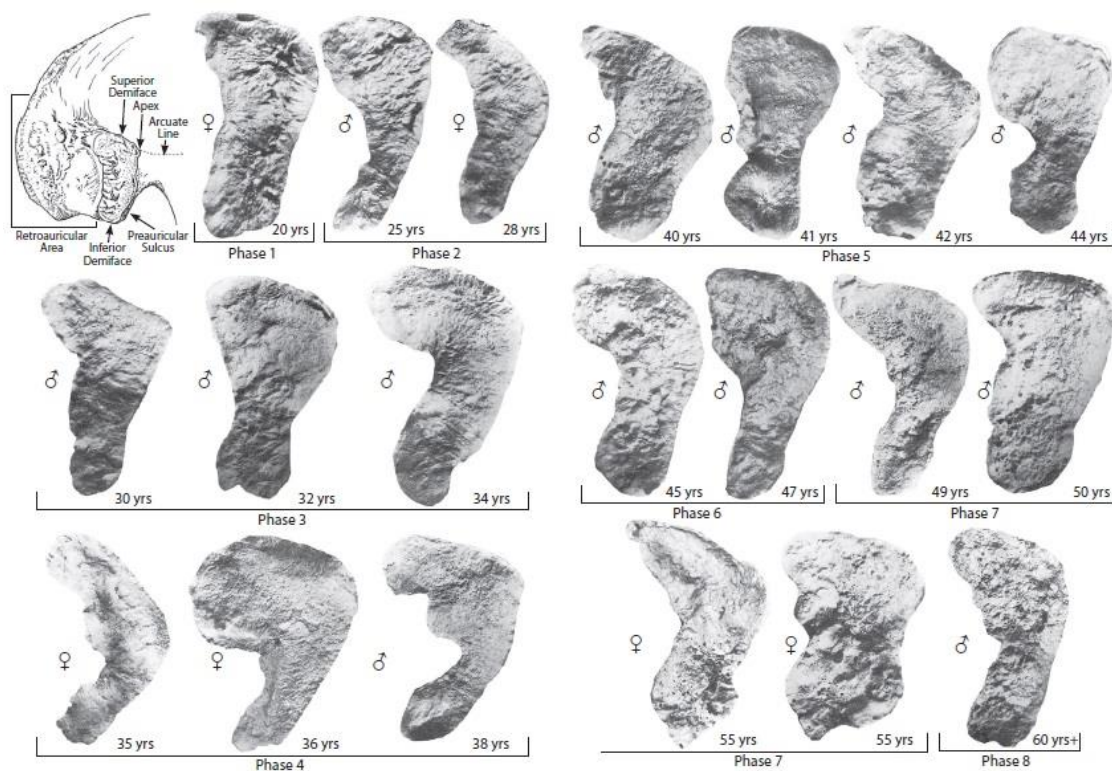


Figura 12. Fases del método propuesto por Lovejoy (1985) para la estimación de edad. Se observan los cambios morfológicos de la carilla auricular donde el intervalo etario para cada etapa corresponde a: Etapa 1: 20-24 años. Etapa 2: 25-29 años. Etapa 3: 30-34 años. Etapa 4: 35-39 años. Etapa 5: 40-44 años. Etapa 6: 45-49 años. Etapa 7: 50-59 años. Etapa 8: >60 años. (White et al., 2012).

Una vez corroborados los parámetros de sexo y edad por cada individuo, así como una estimación del número mínimo de individuos igual a uno, se (5b) seleccionó y retiró el resto óseo de interés correspondiente a la costilla izquierda con el mayor grado de completitud y conservación, y de la tibia izquierda de cada individuo. En general, las costillas extraídas corresponden entre la cuarta y la séptima costilla.

Finalmente, en la etapa de (6b) almacenamiento, cada uno de los elementos óseos obtenidos del contexto de cementerio se depositó en una bolsa hermética de manera individual con el respectivo código y etiquetado de identificación, para luego ser dispuestos en un contenedor plástico sellado herméticamente que fue trasladado por el personal del cementerio en vehículo hasta el Departamento de Anatomía y Medicina Legal de la Universidad de Chile. Una vez en las instalaciones del departamento, que cuentan con mesones de trabajo y ventilación adecuada, las muestras destinadas al proyecto fueron puestas individualmente en bolsas de papel libre de ácido con la rotulación correspondiente y almacenadas en cajas de plástico selladas al interior de las instalaciones a temperatura ambiente. Asimismo, se elaboró una ficha de registro que compila la información de cada individuo en cuanto a la edad, sexo, causa de muerte, contexto de procedencia, pieza ósea extraída con su respectivo código de identificación, fecha de muerte y de enterramiento, resultados de la validación antropológica, entre otros datos. El modelo de ficha se encuentra disponible en el **Anexo N°2**.

Posteriormente, las muestras tanto del contexto cadavérico como aquellas provenientes de resacas de cementerios, fueron trasladadas en vehículo particular hasta las dependencias del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, empleando contenedores tipo cooler con hielo seco para las muestras provenientes de individuos cadavéricos, y contenedores plásticos herméticos para las muestras esqueletizadas. Las que una vez depositadas en las dependencias universitarias, fueron revisadas y registradas fotográficamente, para luego ser almacenadas a -80°C en el caso de las muestras de cadáveres, en tanto las muestras de individuos esqueletizados se dejaron a temperatura ambiente siguiendo la normativa de bioseguridad de la facultad.

4.2. Estandarización de un Protocolo de Extracción de Proteínas a Partir de Muestras Óseas.

A partir de una revisión bibliográfica de protocolos de extracción de proteínas con posterior aplicación a estudios proteómicos, se definieron cinco protocolos de extracción proteica que fueron probados en polvo de hueso de tejido cortical proveniente de costillas de especímenes porcinos, a fin de establecer la metodología más apropiada para la extracción proteica desde muestras óseas. Se decidió testear en primera instancia en restos óseos porcinos para evitar la pérdida de material óseo de las muestras provenientes de restos humanos. Una vez definido el protocolo con mejor rendimiento en términos de número y variedad

de proteínas extraídas, el procedimiento seleccionado fue replicado en una muestra de prueba humana antes de su aplicación en la totalidad de las muestras problema, con el objetivo de corroborar su capacidad de extracción proteica en tejido óseo humano.

4.2.1. Extracción Polvo de Hueso Cortical Porcino.

El material biológico de porcinos se obtuvo desde una carnicería, lugar en el que se adquirió un trozo de costillar de cerdo que fue llevado hasta las dependencias del laboratorio, donde fue lavado con agua destilada y removido tanto el tejido muscular adyacente como el periostio que recubre a todo hueso por medio de un bisturí. Los fragmentos de costillas se secaron en una estufa a 37°C por una hora, para luego, empleando nuevamente el bisturí, retirar todo resto de periostio que pudo haber quedado en una primera instancia. Se obtuvieron fragmentos de tejido cortical de aproximadamente 5x5 mm por medio de un corte sagital con una sierra caladora rotatoria marca Dremel modelo 3000, a lo largo del cuerpo de la costilla, tal como se observa en la **Figura 13**.



Figura 13. Procedimiento de obtención del tejido cortical en muestras óseas de cerdo. (A) Trozo de costillar de cerdo con tejido blando adherido. (B) Se elimina el tejido muscular y cartilaginoso adyacente a la costilla. (C) Se remueve el periostio dando un aspecto de opacidad al hueso. (D) Corte sagital donde se observa la porción interna de la costilla que se compone de tejido trabecular (punto azul) y la capa externa de tejido cortical (punto rojo).

Posteriormente, los fragmentos obtenidos se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 5% por 15 min seguido de 3 lavados con agua de biología molecular por 30 min cada uno, a fin de eliminar contaminantes ambientales y restos de tejido trabecular y medular. Los fragmentos se liofilizaron por 7 días en el equipo HyperCOOL modelo HC3110. Una vez concluido el proceso, se pulverizaron empleando un mortero y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción de proteínas.

4.2.2. Extracción e Identificación de Proteínas en Muestras de Costillas de Cerdo.

Se probaron 5 protocolos sobre 100 mg de polvo de hueso respectivamente, con el fin de aumentar el rendimiento e integridad de las proteínas purificadas, los cuales se resumen en la **Figura 14** y se describen a continuación:

- **Protocolo 1:** Basado en la adaptación por parte de Chan (2018) del método propuesto por Beck et al., (2015). A 100 mg de polvo de hueso de tejido cortical se le agregó 1.5 mL de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 75-89-8) al 100% y 1.5 mL de Tris(hidroximetil)aminometano (Thermo Scientific, N° de catálogo: 17926) 300 mM pH 8.0. Se aplicó vórtex y se dejó en hielo por 10 min. Luego se sonicó por 5 min con una amplitud del 80% en pulsos de 10 segundos utilizando un sonicador digital ultrasónico marca TOPTION modelo TUE-500. Posteriormente se incubó por 15 min a 90°C en equipo de baño seco

(Benchmark modelo BSH1004-E) luego se aplicó nuevamente 10 min de hielo antes de centrifugar a 4600 g por 10 min a 4°C en una centrífuga marca Thermo Scientific™ modelo Megafuge™ 16. Finalmente se tomó el sobrenadante que se almacenó a -80°C.

- **Protocolo 2:** 100 mg de polvo de hueso de tejido cortical se desmineralizaron con ácido trifluoroacético (TFA). Para ello, se adicionó 1 mL de TFA (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 10% por 16 hrs a 4°C, que luego fue centrifugado a 4600 g por 10 min (centrífuga Thermo Scientific™ modelo Megafuge™ 16), descartando la fracción soluble. Posteriormente, sobre la fracción insoluble se utilizó el mismo *buffer* de extracción y procedimiento descrito en el protocolo 1.
- **Protocolo 3:** Basado en la metodología propuesta por Procopio y cols. (2017). Consistió en desmineralizar 100 mg de polvo de hueso de tejido cortical con 1 mL de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 10% por 16 hrs a 4°C, que luego fue centrifugado a 4600 g por 10 min (centrífuga Thermo Scientific™ modelo Megafuge™ 16), descartando la fracción soluble. Sobre la fracción insoluble se utilizó como *buffer* de extracción proteica 1 mL de clorhidrato de guanidina (GuHCL) 6 M (Merck, N° catálogo: 369075) / Tris(hidroximetil)aminometano 7 mM pH 7.4 (Thermo Scientific, N° de catálogo: 17926), que luego se sonicó por 5 min con una amplitud del 80% en pulsos de 10 segundos utilizando un sonicador digital ultrasónico marca TOPTION modelo TUE-500.

Posteriormente se incubó por 18 hrs a 4°C. Lo que una vez finalizado se centrifugó a 4600 g por 10min a 4°C en una centrífuga marca Thermo Scientific™ modelo Megafuge™ 16, para finalmente almacenar el sobrenadante a -80°C.

- **Protocolo 4:** Procedimiento adaptado de lo propuesto por Bai y cols. (2017). Se desmineralizaron 100 mg de polvo de hueso de tejido cortical con 1 mL de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 10% por 16 hrs a 4°C, que luego fue centrifugado a 4600 g por 10 min (centrífuga Thermo Scientific™ modelo Megafuge™ 16), descartando la fracción soluble. Sobre la fracción insoluble se utilizó como *buffer* de extracción proteica 1 mL de urea (Thermo Scientific, N° de catálogo: 29700) 8 M/ sulfato de dodecilo de sodio (SDS) (Merck, N° de catálogo: 151-21-3) al 2% / desoxicolato de sodio (DOC) (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 302-95-4) al 2%/ bicarbonato de amonio (Merck, N° de catálogo: 1066-33-7) 25 mM pH 7.4. Se sonicó por 5 min con una amplitud del 80% en pulsos de 10 segundos utilizando un sonicador digital ultrasónico marca TOPTION modelo TUE-500. Posteriormente se incubó por 18 hrs a 4°C. Lo que una vez finalizado se centrifugó a 4600 g por 10 min a 4°C en una centrífuga marca Thermo Scientific™ modelo Megafuge™ 16, para finalmente almacenar el sobrenadante a -80°C.
- **Protocolo 5:** Basado en la metodología propuesta por Cleland & Vashishth (2015). A 100 mg de polvo de hueso cortical se le agregaron

600 µL de fosfato de amonio dibásico (Merck, N° de catálogo: 7783-28-0) 400 mM/ bicarbonato de amonio (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 1066-33-7) 200 mM/ clorhidrato de guanidina (GuHCL) 4M (Merck, N° catálogo: 369075). Se sonicó por 5 min con una amplitud del 80% en pulsos de 10 segundos utilizando un sonicador digital ultrasónico marca TOPTION modelo TUE-500. Posteriormente se incubó por 24 hrs a 75°C en equipo de baño seco (Marova, modelo MiniT-100). Lo que una vez finalizado, se centrifugó a 4600 g por 10 min a 4°C en una centrífuga marca Thermo Scientific™ modelo Megafuge™ 16, para finalmente almacenar el sobrenadante a -80°C.

Las proteínas extraídas fueron cuantificadas por fluorometría empleando el dispositivo Invitrogen Qubit 4, seguido de un análisis por SDS-Page con gel de corrida al 10% y gel concentrador al 5% al que se cargaron 30 µg de proteína. Previo a ello, con el objetivo de eliminar los detergentes presentes en el protocolo 4 que interfieren en el resultado de la cuantificación por fluorometría, así como también de eliminar sales y contaminantes presentes en cada uno de los cinco protocolos que pudiesen intervenir en la corrida electroforética, las proteínas extraídas se precipitaron en 5 volúmenes de 50% acetona (JT.Baker, N° de catálogo: 67-64-1) / 50% etanol (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 64-17-5) / ácido clorhídrico (Merck, N° de catálogo: 100317) 1 mM, durante toda la noche a -80°C. Lo que una vez concluido, se centrifugó a 19.000 g por 10 min a 4°C (Centrífuga Eppendorf™ 5424 R) descartando el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados del

pellet con 5 volúmenes de 50% acetona (JT.Baker, N° de catálogo: 67-64-1) / 50% etanol (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 64-17-5) / ácido clorhídrico (Merck, N° de catálogo: 100317) 1 mM, que se centrifugaron a 19.000 g, esta vez por 5 min a 4°C (Centrífuga Eppendorf™ 5424 R) descartando el sobrenadante. El pellet se secó en SpeedVac (marca Hanil Scientific modelo HyperVAC VC2200) a 2000 rpm y 80°C por 15 min.

Para la cuantificación por fluorimetría el pellet del protocolo 4 se resuspendió en 50 µL de urea (Thermo Scientific, N° de catálogo: 29700) 8 M. En tanto, para la corrida electroforética, los pellets resultantes de los cinco protocolos se resuspendieron en *buffer* de carga 1X.

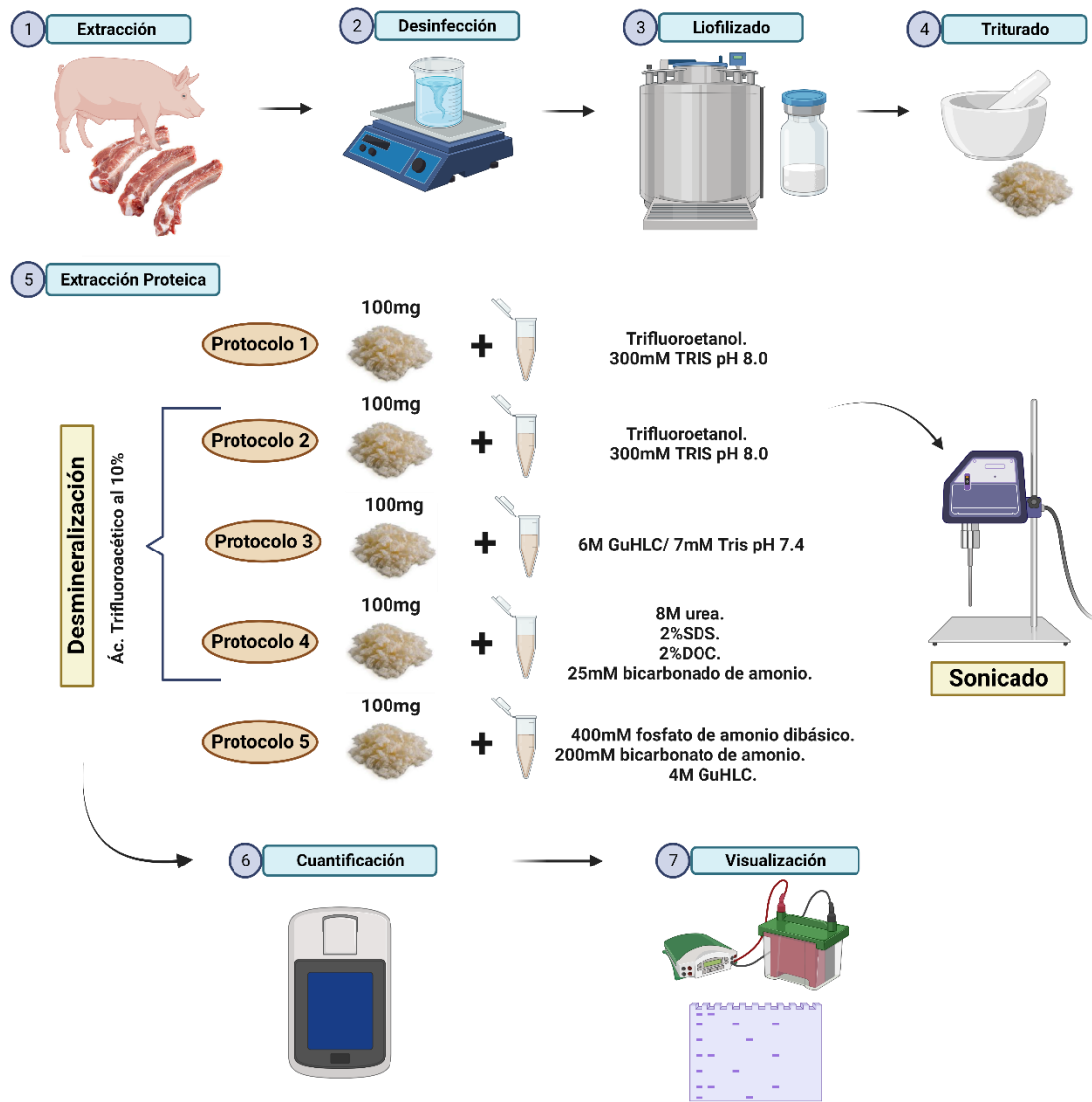


Figura 14. Estandarización de la extracción proteica utilizando muestras óseas de cerdo.

Representación esquemática del proceso de estandarización de la purificación desde muestras óseas, que comprende las etapas de (1) extracción, (2) desinfección, (3) liofilizado, (4) pulverizado, (5) protocolos de extracción proteica con los principales reactivos utilizados, (6) cuantificación por fluorometría y (7) visualización por SDS-Page. TRIS: (hidroximetil)aminometano. GUHCL: clohidrato de guanidina. SDS: sulfato de dodecilo de sodio. DOC: desoxicolato de sodio.

Las proteínas fueron preparadas para ser inyectadas al sistema LC-MS/MS como se describe a continuación. En primer lugar, 30 µg de proteínas se precipitaron en 5 volúmenes de 50% acetona / 50% etanol / ácido clorhídrico 1 mM, siguiendo el procedimiento ya descrito con anterioridad. Luego fueron resuspendidas en 50µL de urea (Thermo Scientific, N° de catálogo: 29700) 8 M/ bicarbonato de amonio (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 1066-33-7) 25 mM. La totalidad de las muestras se redujeron con ditiotreitól (Calbiochem®, N° de catálogo: 3483-12-3) 25 mM por 20 min a 37°C y se alquilaron con 2-cloro-acetamida (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 79-07-2) 25 mM por 20 min en oscuridad a T° ambiente. Se empleó como *buffer* de digestión, un volumen de 2,2,2-trifluoroetanol (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 75-89-8) al 10% para protocolo 1 y protocolo 2, y 400 µL de bicarbonato de amonio (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 1066-33-7) 25 mM para el protocolo 3, protocolo 4 y protocolo 5. Las muestras fueron digeridas con tripsina en una proporción 1:50 w/w (Promega, N° de catálogo: V5111) por 16 hrs a 37°C. Después se adicionó ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) a una concentración final de 0,5% para detener la digestión.

La limpieza de los péptidos se llevó a cabo de manera diferencial siguiendo el protocolo establecido por la unidad de proteómica del instituto Melisa, empleando para el primer y segundo protocolo, columnas MCX (OASIS, N° de catálogo: 186000252), en tanto, en el tercer, cuarto y quinto protocolo se trabajó con columnas Sep-Pak C18 (Sep-Pak, N° de catálogo: WAT054955).

El protocolo de limpieza ocupando las columnas MCX consiste en acondicionar la columna con 1 mL de metanol (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 67-56-1), equilibrar con 1 mL de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 0.2%, cargar la muestra 3 veces por el filtro, luego lavar con 2 mL de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 0.2% y 2 mL de metanol (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 67-56-1), para finalmente eluir dos veces con 300µL de amoniaco (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 338818) al 5%/ metanol (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 67-56-1). Mientras que en el caso de las columnas Sep-Pak C18, estas se acondicionaron con 1 mL de acetonitrilo (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 75-05-8) al 100%, fueron equilibradas con 2 mL de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 0,2%, la muestra se pasó 3 veces por el filtro, siendo lavada con 1 mL de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 0,2% y se eluyó con 500 µL de acetonitrilo (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 75-05-8) al 40% / ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 0,2% y 500 µL de acetonitrilo (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 75-05-8) al 80% / ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) al 0,2%.

Posteriormente, todas las muestras fueron centrifugadas a 19.000 g por un minuto a 4°C (centrífuga Eppendorf™ 5424 R) y se secaron en el Speed Vac (marca Hanil Scientific modelo HyperVAC VC2200) por 2 hrs a 2000 rpm y 80°C. Luego, se resuspendieron en 20 µL de ácido fórmico (Thermo Scientific, N° catálogo: 85171) al 0,1% y se dejaron por 5 min en un equipo de baño ultrasónico

(marca Baku, modelo BK-1200) con pulsos de 5 segundos. Se centrifugó a 19.000 g por 1.5 min (centrífuga Eppendorf™ 5424 R) y se midió la concentración mediante espectroscopía infrarroja con el equipo Direct Detect® Spectrometer marca Merck, para finalmente preparar los viales con una concentración de 200 ng/μL de péptidos diluidos con ácido fórmico (Thermo Scientific, N° catálogo: 85171) al 0,1%.

Los péptidos fueron inyectados en un nanoUHPLC nanoElute (Bruker Daltonics) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (“Trapped Ion Mobility Spectrometry – Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometer”, Bruker Daltonics) utilizando una columna Aurora UHPLC (25 cm x 75 μm ID, 1.6 μm C18, IonOpticks, Australia), la cromatografía líquida se realizó utilizando un gradiente de 90 minutos de 2% al 35% de tampón B (acetonitrilo 99,9% + 0,1% ácido fórmico). La colección de resultados fue realizada utilizando el software TimsControl 2.0 (Bruker Daltonics) bajo 10 ciclos de PASEF, con un rango de masas de 100-1.700 m/z, una ionización del capilar 1.500 V y una temperatura de 180°C, la frecuencia del TOF de 10 kHz se ejecutó en una resolución de 40.000 FWHM.

Utilizando la interfaz gráfica de Fragpipe versión 18.0, se efectuó la identificación de las proteínas mediante el motor de búsqueda MSFragger versión 3.5 al cual se le suministró como base de datos las secuencias aminoacídicas en formato FASTA que están disponibles para *Sus scrofa* en Swiss-Prot (consultada el 8 de

agosto del 2022, que incluye 1.458 secuencias¹). Los parámetros establecidos para la tolerancia de masa iónica de los precursores (PMT) y la masa iónica de los fragmentos (FMT) fueron de 0,05 Da y 20 ppm respectivamente. Se asumió digestión con tripsina del tipo enzimático estricto, que trabaja en base a péptidos trípticos, y del tipo semiespecífica, con péptidos semitrípticos (en adelante corrida tríptica y semitríptica), con un máximo de 2 pérdidas de corte por péptido y con un largo mínimo de 6aa por péptido. Se consideró la carbamidometilación de la cisteína como modificación post-traducciona fija, en tanto, la Oxidación de Metionina (M), Acetilación N-terminal, Deaminación de Asparagina y Glutamina (NQ), se definieron como modificaciones post-traduccionales variables. Philosopher versión 4.4, específicamente, su herramienta Peptideprophet, se utilizó para el cálculo del nivel de confianza, considerando péptidos a un FDR de 0,1%. El resto de los parámetros se mantuvieron por defecto.

El total de proteínas identificadas se visualizó en el programa Excel versión 2211. Bajo el cual se aplicó un filtro sobre las proteínas identificadas en función de la columna de péptidos únicos que se fijó en un mínimo de 1. De esta forma, se aumenta la confianza en la identificación, ya que las proteínas identificadas corresponden a aquellas que mediante LC-MS/MS se les logró asignar una secuencia peptídica exclusiva de un grupo de proteínas (péptidos que son comunes a las proteínas de un grupo de proteínas y que no se encuentran en las

¹ Dirección web secuencias aminoacídicas *Sus scofra*:
<https://rest.uniprot.org/uniprotkb/stream?compressed=true&format=fasta&query=%28PIG%29%20AND%20%28reviewed%3Atrue%29>

proteínas de ningún otro grupo). Posteriormente, para cada protocolo se unificó el listado de las proteínas identificadas, donde se incluyen las proteínas identificadas en la corrida tríptica y semitríptica, descartando los valores duplicados.

A continuación, utilizando la herramienta Interactive Venn (<http://www.interactivenn.net/>) se compararon las proteínas identificadas a partir de los cinco protocolos de extracción testeados. Asimismo, con la herramienta para la anotación funcional de secuencias de proteínas basadas en relaciones de ortología, EggNOG-mapper (<http://eggnog-mapper.embl.de/>), se asignó una categoría funcional a las proteínas identificadas en función de su mejor grupo ortólogo coincidente en la base de datos Clusters of Orthologous Groups (COG).

Finalmente, el protocolo que generó los resultados óptimos se replicó en una muestra de costilla humana con un IPM de 20 años (MR2_11C), siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Sin embargo, en esta oportunidad los parámetros establecidos para la identificación de las proteínas se hicieron utilizando los mismos programas, pero considerando como base de datos las secuencias aminoacídicas para *Homo sapiens* obtenidas desde Swiss-Prot (consultada el 22 de septiembre del 2022 e incluye 20.423 secuencias)². El resto

²Dirección web secuencias aminoacídicas *Homo sapiens*:
<https://rest.uniprot.org/uniprotkb/stream?format=fasta&query=%28HUMAN%29%20AND%20%28reviewed%3Atrue%29>

de los parámetros y procedimientos se replicó tal y como se describió en muestras de costillas de cerdo.

4.3. Extracción Proteica en Muestras de Tejido Cortical Provenientes de Costillas y Tibias Humanas.

La obtención de polvo de hueso cortical para las muestras humanas provenientes de individuos cadavéricos se llevó a cabo replicando el procedimiento descrito en cerdos, concerniente a la fase de eliminación de tejidos blandos adyacentes y obtención de fragmentos de tejido cortical (para más detalle revisar sección 4.2.1).

En el caso de las muestras de individuos esqueletizados, el primer paso para la obtención del polvo de hueso cortical consistió en lijar la primera capa de hueso a fin de eliminar restos de polvo, pelo y otros contaminantes generados en el proceso de inhumación. Posteriormente se cortaron fragmentos de tejido cortical de 5x5 mm a lo largo del cuerpo de la costilla y de 20x10 mm a mitad de la diáfisis anterior de las tibias. En la **Figura 15**, se aprecia el proceso de obtención de los fragmentos según cada hueso, destacando la zona anatómica de extracción.

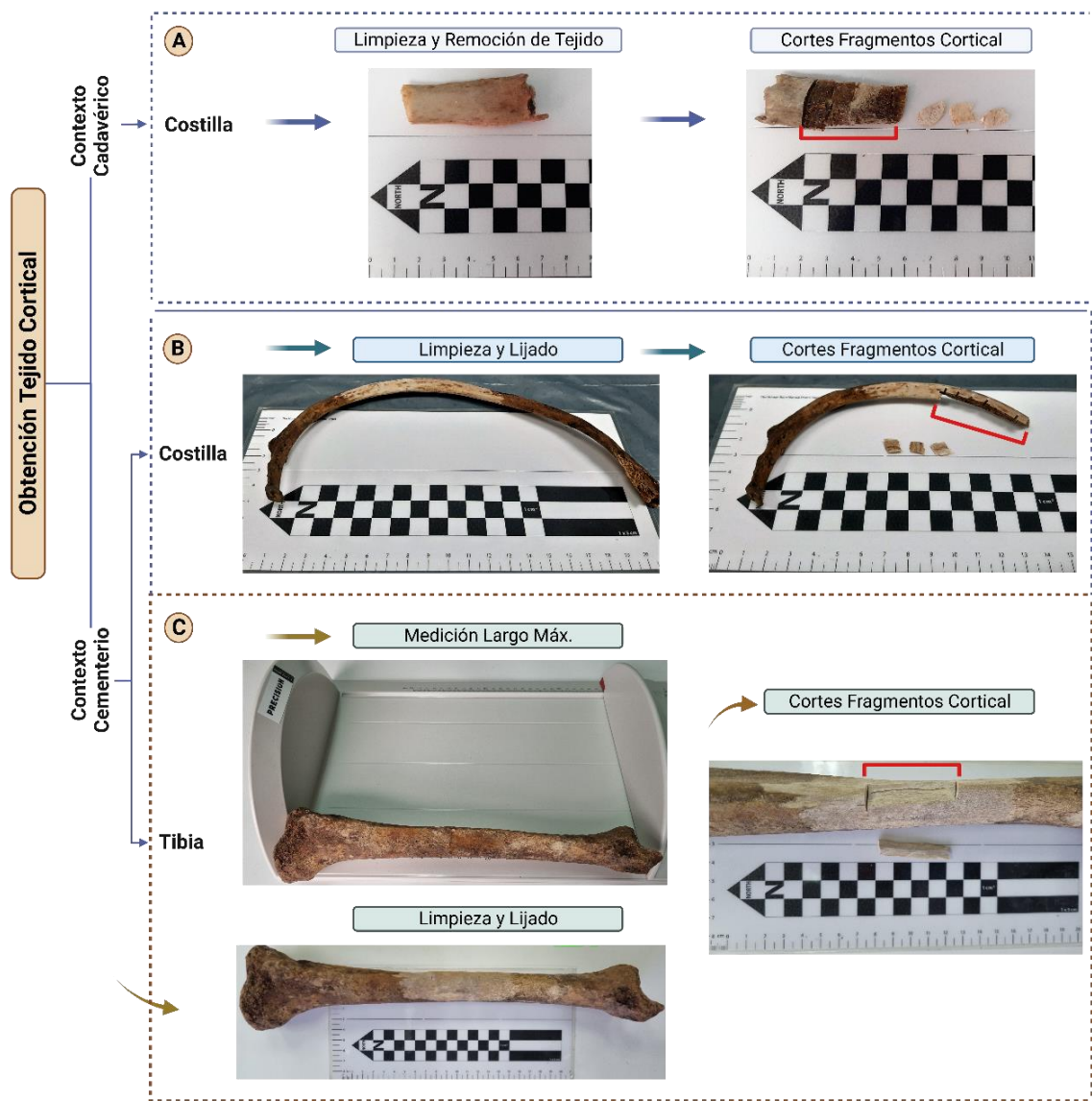


Figura 15. Obtención de fragmentos de tejido cortical humanos. (A) Fragmento de costilla de donación cadavérica, de izquierda a derecha se observa el fragmento sin tejido muscular ni periostio, luego 3 fragmentos de tejido cortical extraídos desde el cuerpo de la costilla (zona en rojo). **(B)** Costilla proveniente de cementerio que primero fue limpiada con un proceso de lijado evidente en el cambio de coloración del cuerpo de la costilla (zona roja), desde donde se extrae cada fragmento. **(C)** Tibia proveniente de cementerio que primero fue medida en su largo máximo

para determinar la zona de mitad de diáfisis, área que luego fue lijada y de la cual se extrajo el fragmento de tejido cortical (marcado en rojo).

Todos los fragmentos, tanto de costilla como de tibias, fueron desinfectados en hipoclorito de sodio al 5% por 15 min seguido de 3 lavados con agua de biología molecular por 30 min cada uno en agitación. Los fragmentos se liofilizaron por una semana en el equipo HyperCOOL modelo HC3110, para luego ser pulverizados en un mortero, y almacenados a -80°C hasta el posterior proceso de extracción proteica.

La extracción de proteínas se llevó a cabo en 25 muestras humanas replicando el procedimiento del Protocolo 1 descrito para la extracción de proteínas en muestras de costillas de cerdo (sección 4.2.2). Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se midió la concentración por medio de fluorometría en el dispositivo Invitrogen Qubit 4. El resto del extracto fue almacenado a -80°C para análisis posteriores de LC-MS/MS.

4.3.1. Preparación y Análisis de Muestras Óseas Humanas para análisis LC-MS/MS.

Se tomaron 30 µg de proteína por muestra, las que se redujeron con ditioneitol (Calbiochem®, N° de catálogo: 3483-12-3) 25 mM por 20 min a 37°C. Se alquiló con iodoacetamida (Cytiva, N° de catálogo: 144-48-9) 25 mM por 20 min en oscuridad a T° ambiente. Luego se añadió un volumen de 2,2,2-trifluoroetanol (Sigma Aldrich, N° de catálogo: 75-89-8) al 10% como *buffer* de digestión y se

digirieron con tripsina en una proporción 1:50 w/w (Promega, N° de catálogo: V5111) por 16 hrs a 37°C. Después, se adicionó ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, N° catálogo: 76-05-1) a una concentración final de 0,5% y se centrifugó a 19.000 g por 1 min a 4°C (centrífuga Eppendorf™ 5424 R), antes de llevar al Speed Vac (marca Hanil Scientific modelo HyperVAC VC2200) a 2000 rpm por 2 hrs a 80°C.

La limpieza de los péptidos se realizó con columnas MCX (OASIS, N° de catálogo: 186000252). La preparación de los viales, cromatografía y el análisis por LC-MS/MS, se ejecutó tal y como se describió en la sección 4.2.2 para las muestras provenientes de restos porcinos.

4.3.2. Identificación de las Proteínas Presentes en las Muestras de Costilla y Tibias Humanas.

La identificación de las proteínas se llevó a cabo utilizando la interfaz gráfica de Fragpipe versión 18.0 mediante el motor de búsqueda MSFragger versión 3.5 al cual se le suministró como base de datos las secuencias aminoacídicas disponibles en formato FASTA para *Homo sapiens* obtenidas desde Swiss-Prot (consultada el 1 de diciembre del 2022 que incluye 20.423 secuencias)³. La identificación se realizó nuevamente en base a una corrida tríptica y semitrípica bajo los mismos parámetros descritos en la sección 4.2.2. No obstante, en esta

³ Dirección web secuencias aminoacídicas *Homo sapiens*:
<https://rest.uniprot.org/uniprotkb/stream?format=fasta&query=%28HUMAN%29%20AND%20%28reviewed%3Atrue%29>

oportunidad se ejecutó una cuantificación sin etiqueta (*label free*) basada en la intensidad de precursores de MS1 para datos timsTOF (en adelante cálculo de abundancia relativa), que se realizó con Ionquant versión 1.8.0. trabajando sobre los parámetros seteados por defecto.

Se consideró que una proteína fue identificada cuando se le reconoció a lo menos un péptido único. Posteriormente, para cada muestra se unificó el listado de las proteínas identificadas, donde se incluyen las proteínas identificadas en la corrida tríptica y semitrípica, descartando los valores duplicados. Lo cual se realizó en el programa Excel versión 2211.

A continuación, a través de la herramienta Interactive Venn (<http://www.interactivenn.net/>) se evaluaron proteínas exclusivas y compartidas entre replicas biológicas para las cinco condiciones en estudio (costillas de IPM<1, IPM=15 e IPM=20 años; y tibias de IPM=15 e IPM=20 años). Además, se establecieron proteínas representativas para cada intervalo *post mortem*, que corresponden a proteínas identificadas en común para muestras que comparten un mismo intervalo *post mortem*.

Utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.2, se realizaron análisis estadísticos sobre el número de proteínas identificadas, aplicando pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y pruebas de hipótesis, ya sea paramétricas o no paramétricas según el resultado de la prueba de normalidad.

4.3.3. Caracterización in silico de las Proteínas Identificadas.

Las proteínas definidas como representativas de los distintos IPMs fueron caracterizadas utilizando la herramienta EggNOG-mapper (<http://eggnog-mapper.embl.de/>) para la anotación funcional de proteínas ortólogas, por medio de la cual se asignaron *clusters of orthologous groups* (COGs) a cada una de las proteínas identificadas.

Por otro lado, a través de la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) se estableció el peso molecular y la composición aminoacídica de las proteínas identificadas. Cuyos resultados fueron graficados en GraphPad Prism versión 8.0.2., programa que también fue utilizado para realizar pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y pruebas de hipótesis.

4.3.4. Análisis Estadístico Multivariado. MCA y PCA.

Se ejecutaron análisis estadísticos multivariados en el programa R versión 4.2.2 por medio de los paquetes FactoMineR y Factoextra, específicamente, un análisis de correspondencia múltiple (MCA) y un análisis de componentes principales (PCA), sobre el listado de proteínas consideradas como representativas de los diferentes intervalos *post mortem* definidos.

Para el MCA se generó una tabla de contingencia, que se completó con “Y” cuando la proteína estaba presente en una muestra y con “N” cuando se encontró

ausente. Por otro lado, para el PCA se generaron dos matrices donde se trabajó sobre las intensidades únicas de las proteínas identificadas en la corrida tríptica y semitrípica respectivamente. Los comandos utilizados en cada análisis se encuentran disponibles en el **Anexo 3**.

4.3.5. Análisis de Abundancias Relativas.

Los valores de abundancia relativa determinadas mediante la cuantificación *label free* basada en la intensidad de precursores MS1 (revisar sección 4.3.2.), fueron sometidos a un proceso de imputación para completar los valores de intensidad faltantes entre replicas biológicas, ya que se asumió que producto de la variabilidad entre las muestras analizadas, ciertas proteínas no fueron posibles de identificar y/o cuantificar aun cuando es esperable que estén presentes en la mayoría de las muestras. Dicha imputación, permite no sólo aumentar el número de proteínas analizadas, sino que también, realizar comparaciones estadísticas válidas en torno a la abundancia de proteínas entre las diferentes condiciones de estudio, preservando la integridad de los datos.

Para ello, las intensidades únicas del global de proteínas identificadas fueron procesadas utilizando el paquete MissForest en el programa R versión 4.2.2. (comandos disponibles en el **Anexo 4**), siguiendo los pasos que se describen a continuación:

- **Paso 1:** Se construyeron dos matrices que consideran el total de las proteínas identificadas con sus respectivas intensidades únicas para la corrida tríplica y otra para la semitripleta.
- **Paso 2:** Los valores de intensidad de cada matriz fueron normalizados en función del logaritmo base diez.
- **Paso 3:** En cada matriz se reemplazaron los valores de intensidad de una proteína iguales a 0 por NA, ya que se consideraron como valores perdidos.
- **Paso 4:** Para cada matriz se generaron agrupaciones en función de las réplicas biológica de cada condición en estudio, de manera tal, que los valores de intensidad de una proteína estarán agrupados según el tipo de hueso y su respectivo IPM (costillas con IPM<1, costillas con IPM=15, costillas con IPM=20, tibias con IPM=15 y tibias con IPM=20 años).
- **Paso 5:** Para cada proteína se calculó la cantidad de valores perdidos entre réplicas biológicas, y se descartaron aquellas proteínas con más de dos valores perdidos.
- **Paso 6:** Se realizó una imputación de los valores perdidos para cada agrupación usando el paquete MissForest, que utiliza el algoritmo de aprendizaje automático Random Forest.
- **Paso 7:** Las distintas agrupaciones se unieron para generar nuevas matrices que contienen los valores de intensidad de proteínas propios e imputados. Matrices que están diferenciadas por el tipo de hueso (costilla

y tibia) y por las intensidades únicas trabajadas (trípticas y semitripticas), cuyos resultados fueron exportados a un archivo Excel.

Finamente, utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.2, se graficaron los cambios en la abundancia relativa (intensidad) de las proteínas, en función del intervalo *post mortem* tanto para costillas como para tibias. Se aplicaron pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) que fueron seguidas por pruebas de hipótesis paramétricas (T de student) cuando los datos tuvieran distribución normal, y pruebas no paramétricas (Mann Whitney) cuando los datos no seguían una distribución normal, a fin de identificar diferencias significativas entre los grupos de análisis.

5. RESULTADOS

5.1. Obtención de Restos Óseos Humanos para Análisis Proteómicos.

Siguiendo el protocolo de obtención de material biológico (revisar sección 4.1.2. para más información), se obtuvieron 5 muestras de costillas provenientes de 5 donantes cadavéricos masculinos con una edad promedio de 32 ± 12 años, cuyas datas de muerte no superan los 30 días a la fecha de la extracción del resto óseo, sin embargo, estuvieron cerca de un año almacenadas a -20°C hasta que fueron procesadas para los análisis de LC-MS/MS. Con respecto a los individuos provenientes de resacas de cementerios, de 15 individuos masculinos se obtuvieron 14 muestras de costillas y 15 muestras de tibia. De estos individuos, 8 tienen un IPM de 15 años con una edad promedio de 44 ± 6 años, mientras que otros 7 individuos tienen IPM de 20 años y un promedio de edad de 41 ± 7 años.

En cuanto a las causas de muerte, estas se detallan en la **Tabla 1**, donde además se entrega información relativa al número de individuo, contexto de origen, hueso de procedencia, la edad al momento de la muerte, el IPM y condición de almacenamiento para cada muestra.

Tabla 1. Listado y descripción de las muestras recopiladas en el estudio.

Muestra	Individuo	Hueso	Contexto	Edad	IPM	Almacenamiento	Causa de Muerte
MD4C_1	1C	Costilla	Cadavérico	31	<1 año	Congelada	Herida cortopunzante cardiaca
MD4C_2	2C	Costilla	Cadavérico	40	<1 año	Congelada	Trauma abdomino pelviano por PAF
MD4C_3	3C	Costilla	Cadavérico	21	<1 año	Congelada	Trauma por PAF
MD4C_4	4C	Costilla	Cadavérico	22	<1 año	Congelada	Trauma por PAF (Tórax)
MD4C_5	5C	Costilla	Cadavérico	48	<1 año	Congelada	Trauma por PAF (Cervical)
MR1_1C	1R	Costilla	Cementerio	35	15 años	T° ambiente	Indeterminado
MR1_1T		Tibia	Cementerio				
MR1_2C	2R	Costilla	Cementerio	35	15 años	T° ambiente	Traumatismo craneoencefálico y facial
MR1_2T		Tibia	Cementerio				
MR1_3C	3R	Costilla	Cementerio	43	15 años	T° ambiente	Accidente cerebrovascular hemorrágico
MR1_3T		Tibia	Cementerio				
MR1_4C	4R	Costilla	Cementerio	43	15 años	T° ambiente	Indeterminado
MR1_4T		Tibia	Cementerio				
MR1_5C	5R	Costilla	Cementerio	47	15 años	T° ambiente	Bronconeumonía bilateral
MR1_5T		Tibia	Cementerio				
MR1_6C	6R	Costilla	Cementerio	48	15 años	T° ambiente	Sepsis por herida penetrante cortante cervical derecha
MR1_6T		Tibia	Cementerio				
MR1_7C	7R	Costilla	Cementerio	49	15 años	T° ambiente	Hematoma subdural agudo extenso
MR1_7T		Tibia	Cementerio				
MR1_8T	8R	Tibia	Cementerio	49	15 años	T° ambiente	Encefalopatía hepática
MR2_9C	9R	Costilla	Cementerio	30	20 años	T° ambiente	Politraumatismo por atropello
MR2_9T		Tibia	Cementerio				
MR2_10C	10R	Costilla	Cementerio	35	20 años	T° ambiente	Traumatismo craneoencefálico
MR2_10T		Tibia	Cementerio				
MR2_11C	11R	Costilla	Cementerio	39	20 años	T° ambiente	Anemia Aguda por hemorragia
MR2_11T		Tibia	Cementerio				
MR2_12C	12R	Costilla	Cementerio	42	20 años	T° ambiente	Edema pulmonar agudo
MR2_12T		Tibia	Cementerio				
MR2_13C	13R	Costilla	Cementerio	45	20 años	T° ambiente	Infarto agudo al miocardio
MR2_13T		Tibia	Cementerio				
MR2_14C	14R	Costilla	Cementerio	47	20 años	T° ambiente	Asfixia por ahorcamiento
MR2_14T		Tibia	Cementerio				
MR2_15C	15R	Costilla	Cementerio	49	20 años	T° ambiente	Paro cardiorrespiratorio
MR2_15T		Tibia	Cementerio				

5.2. Estandarización de un Protocolo de Extracción de Proteínas a partir de Muestras Óseas para Análisis Proteómicos Utilizando Costillas de Cerdo.

Con el objetivo de establecer un protocolo óptimo para la extracción de proteínas a partir de restos óseos, cinco protocolos de extracción fueron testeados en polvo de hueso de tejido cortical proveniente de costillas de cerdo.

La cantidad total de proteínas extraídas a partir de 100mg de polvo de hueso fue de 0,62 mg para el protocolo 1, 0,89 mg en el caso del protocolo 2, 0,29 mg para el protocolo 3, 0,52 mg en el protocolo 4 y 4,05 mg para el protocolo 5.

Los extractos se visualizaron en un gel SDS-Page al 10%, cargando 30 µg de proteína por cada protocolo testado. Los resultados se muestran en la **Figura 16A**, donde es posible apreciar la banda de colágeno alrededor de los 150 kDa y una serie de bandas con menor tamaño molecular. Situación que es visible desde el protocolo 1 hasta el protocolo 4, mientras que en el protocolo 5 se observa un alto nivel de degradación.

Se realizó LC-MS/MS para las proteínas extraídas con cada uno de los cinco protocolos, a fin de determinar el procedimiento de extracción que permite identificar el mayor número y variedad de proteínas. La identificación de péptidos trípticos para el primer protocolo resultó en la identificación 44 proteínas, 38 proteínas para el segundo protocolo, 28 proteínas en el tercer protocolo, 30 proteínas en el cuarto protocolo y 22 proteínas en el quinto protocolo. En tanto, en base a los péptidos semitrípticos, el número de proteínas identificadas fue de

42 proteínas en el primer protocolo, 29 proteínas en el segundo protocolo, 37 proteínas en el tercer protocolo, 34 proteínas en el cuarto protocolo y 19 proteínas en el quinto protocolo.

El número total de proteínas identificadas considerando la identificación tríplica y semitríplica por cada protocolo, fue de 51 proteínas con el primero, 39 proteínas con el segundo, 39 proteínas con el tercero, 36 proteínas utilizando el cuarto y finalmente 27 proteínas con el quinto protocolo. Por tanto, el protocolo 1 obtuvo el mejor rendimiento en cuanto al número de proteínas extraídas (**Figura 16B**).

En términos de diversidad, a partir de los cinco protocolos se lograron identificar un total de 56 diferentes proteínas, de las cuales el 41% (correspondiente a 23 proteínas del total de 56), fueron identificadas por los cinco protocolos probados. Tal como se observa en la **Figura 16C**, utilizando únicamente el protocolo 1, es posible identificar el 91% del total de estas proteínas, que equivale a 51 proteínas de 56. Cifra que es seguida por el protocolo 2 y protocolo 3, con los cuales es posible identificar el 70% de dicho total de proteínas (39 proteínas de 56). Asimismo, el protocolo 1, identifica un mayor número de proteínas exclusivas que no son factibles de reconocer empleando el resto de los protocolos (8 proteínas), las que corresponden a la proteína acónito hidratasa, mitocondrial (ACON), ATPasa 1 transportadora de calcio de la membrana plasmática (AT2B1), proteína asociada a adenilil ciclasa 1 (CAP1), oxidasa dual 2 (DUOX2), subunidad delta de proteína quinasa tipo II dependiente de calcio/calmodulina (KCC2D), proteína-

lisina 6-oxidasa (LYOX), 40S proteína ribosómica S21 (RS21) y la proteína ribosómica S28 40S (RS28).

Por otro lado, tras realizar una clasificación funcional de las 57 proteínas mediante la asignación de un *Clusters of Orthologous Groups* (COGs), se evidenció que el protocolo 1 permitió identificar proteínas que cumplen diversos roles funcionales dentro de los procesos celulares. En este sentido, y tal como se plasma en la **Figura 16D**, bajo este protocolo se logró extraer principalmente proteínas asociadas a mecanismos de transducción de señales (12 proteínas), la producción y conversión de energía (9 proteínas) y al citoesqueleto (6 proteínas). En la **Tabla 2**, se detallan las categorías COGs asignadas al total de las proteínas identificadas con los cinco protocolos, destacando las categorías de las 23 proteínas comunes, que se vinculan en su mayoría nuevamente con mecanismos de transducción de señales (4 proteínas), la producción y conversión de energía (4 proteínas), pero esta vez, se asocian además al transporte y metabolismo de carbohidratos (4 proteínas). Del mismo modo, se destacan las categorías COGs de las 8 proteínas identificadas exclusivamente con el protocolo 1, que se relacionan principalmente al mecanismo de transducción de señales y a la traducción, estructura ribosomal y biogénesis.

En definitiva, el protocolo 1 no sólo obtuvo el mejor rendimiento en cuanto al número de proteínas identificadas, sino que también, permitió el reconocimiento de una mayor diversidad proteómica en términos de funciones celulares.

Considerando lo anterior, y con el propósito de evaluar la eficacia en la extracción de proteínas del protocolo 1 aplicado a muestras humanas, se replicó el procedimiento de extracción utilizando como prueba de concepto la muestra de costilla MR2_11C. La que fue seleccionada por presentar un IPM=20 años, intervalo que se asumió como el punto crítico de extracción al corresponder a la data de muerte que presenta mayor tiempo. Se hipotetizó que este IPM podría presentar mayor degradación de proteínas y, por ende, suponer un menor rendimiento en la extracción proteica.

Una vez replicado el protocolo 1, el extracto proteico se cuantificó por fluorometría y se analizaron 200 ng de péptidos de las proteínas extraídas mediante LC-MS/MS, para finalmente, filtrar las proteínas identificadas en función de sus péptidos únicos con un mínimo de uno, a fin de aumentar la confianza en la identificación.

Como resultado, la cantidad total de proteínas extraídas a partir de 100 mg de polvo de hueso cortical fue de 0,35 mg. Logrando identificar 8 proteínas a partir de la corrida tríptica, y 19 proteínas en base a la corrida semitríptica. Tras conjugar ambas corridas y eliminar los valores duplicados, se obtuvo un total de 19 proteínas, las que corresponden en su totalidad a las mismas proteínas identificadas en semitrípticos, y cuyos códigos de identificación en Uniprot se encuentran disponibles en la **Figura 16E**.

Los resultados obtenidos, demuestran que el protocolo 1 es factible de ser aplicado en muestras humanas al posibilitar la extracción e identificación exitosa de proteínas a partir de muestras óseas de tejido cortical de larga data *post mortem*, por lo que fue utilizado como método de extracción proteico en los siguientes experimentos.

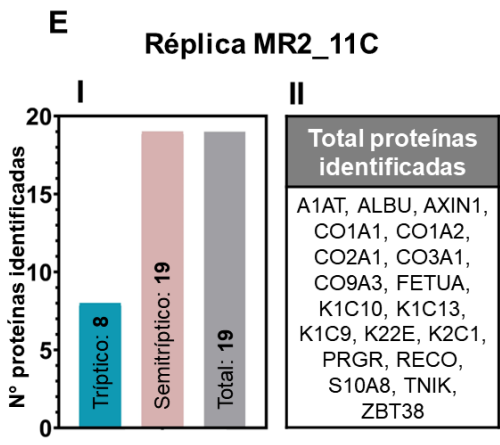
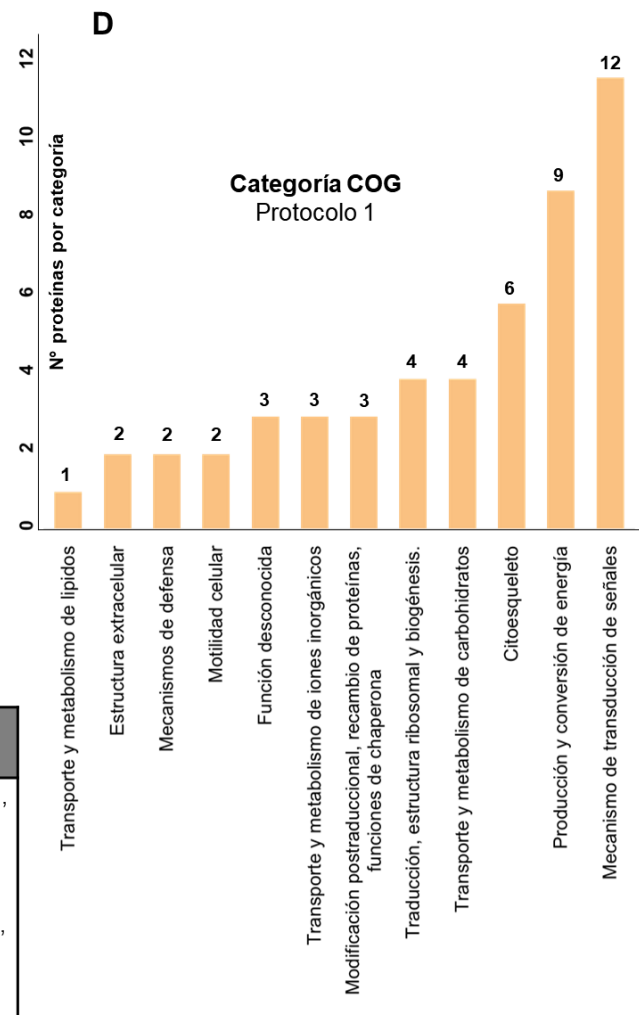
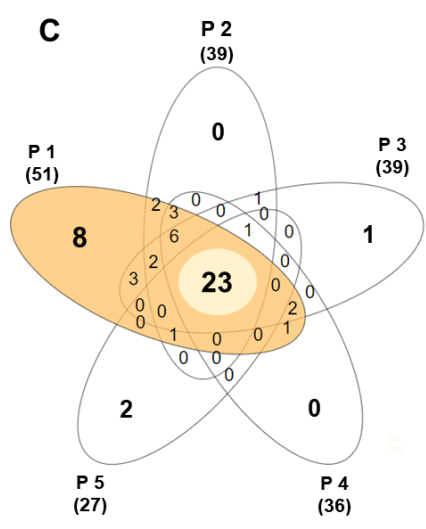
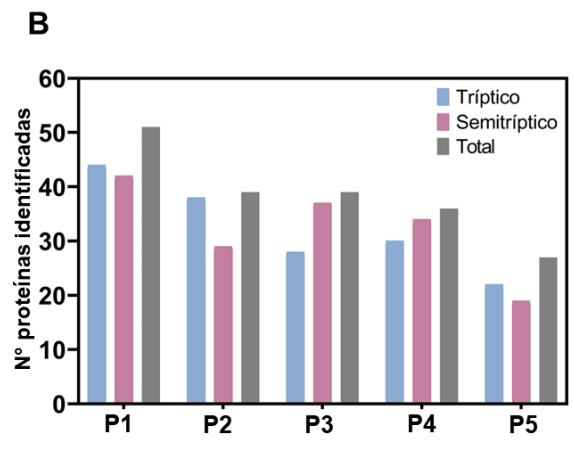
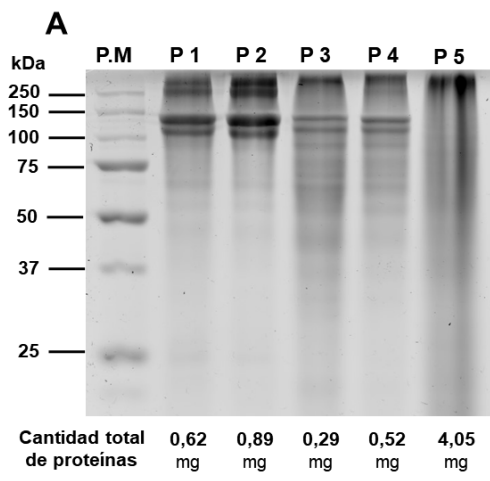


Figura 16. Estandarización de un protocolo de extracción de proteínas para identificación por LC-MS/MS desde osamentas humanas. (A) SDS-Page de los protocolos testeados en restos óseos de cerdo. De izquierda a derecha, el carril 1 contiene el marcador de peso molecular en kDa. Los carriles 2 al 6, corresponden a las proteínas extraídas empleando el protocolo 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En la parte inferior, se detalla la cantidad total de proteínas extraídas para cada protocolo. **(B)** Número de proteínas identificadas en cada protocolo en cerdos diferenciadas según el tipo de corrida y el resultado global de proteínas que se lograron identificar tras conjugar la corrida tríptica y semitriptica. **(C)** Diagrama de Venn con el número de proteínas que fueron identificadas en común y en particular para los cinco protocolos. Entre paréntesis, el total de proteínas identificadas por cada protocolo. En elipse naranja, se destacan los resultados del protocolo 1. **(D)** Clusters of Orthologous Groups (COGs) de las proteínas identificadas a partir del protocolo 1, detallando el número de proteínas identificadas por cada categoría. **(E)** Replicación del protocolo 1 en muestra humana MR2_11C, (I) se muestra el número de proteínas identificadas para ambas corridas y general. (II) El total de proteínas identificadas tras conjugar las proteínas identificadas en la corrida tríptica y semitriptica, con sus respectivos códigos de acceso en Uniprot.

Tabla 2. Clusters of Orthologous Groups (COGs) de las 56 diferentes proteínas identificadas en muestras de cerdos a partir de los protocolos testeados.

Código	Nombre de la proteína	COG	Protocolo
SMD2	Ribonucleoproteína nuclear pequeño Sm D2	Procesamiento y modificación del ARN	P5
ACON	Acónito hidratasa, mitocondrial	Producción y conversión de energía	P1
ADT3	ADP/ATP translocasa 3		P1, P2 y P4
AL9A1	4-trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa		P1 y P2
ATPA	ATP sintasa subunidad alfa, mitocondrial		Todos
HBA	Subunidad alfa de la hemoglobina		Todos
HBB	Subunidad beta de la hemoglobina		Todos
KCRB	Creatina quinasa tipo B		Todos

MDHM	Malato deshidrogenasa, mitocondrial		P1, P2 y P3
VDAC1	Proteína de canal selectiva de aniones dependiente de voltaje 1		P1, P2, P3 y P4
ENOB	Beta-enolasa	Transporte y metabolismo de carbohidratos	Todos
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Transporte y metabolismo de carbohidratos Transporte y metabolismo de lípidos	Todos
G6PI	Glucosa-6-fosfato isomerasa		Todos
TPIS	Triosafofosato isomerasa		Todos
ACBP	Proteína de unión a acil-CoA		P1 y P3
RL29	60S proteína ribosomal L29	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis.	P1, P2 y P4
RL31	60S proteína ribosomal L31	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis. Motilidad celular	P1, P2 y P4
RS21	40S proteína ribosómica S21		P1
RS28	Proteína ribosómica S28 40S		P1
RS19	Proteína ribosómica 40S S19		P3
TYB10	Timosina beta-10		Todos
TYB4	Timosina beta-4	Motilidad celular Modificación postraduccional	Todos
GSTP1	Glutación S-transferasa P	recambio de proteínas, funciones de chaperona	Todos
PPIA	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	Modificación postraduccional, recambio de proteínas, funciones de chaperona	P1, P2, P3 y P4
VTNC	Vitronectina		Todos
CRYAB	Cadena B alfa-cristalina		P5
AT1A2	Subunidad alfa-2 de la ATPasa transportadora de sodio/potasio	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	P1 y P2
AT2B1	ATPasa 1 transportadora de calcio de la membrana plasmática	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos Función desconocida	P1
CAH3	Anhidrasa carbónica 3		P1, P3 y P4
CYTB	Cistatina-B		Todos
LAC	Región C de la cadena Ig lambda	Función desconocida Mecanismo de transducción de señales	P1, P2, P3 y P4
MYPR	Proteína proteolípídica de mielina		Todos
ALBU	Albúmina		Todos
B2MG	Beta-2-microglobulina	Mecanismo de transducción de señales Mecanismos de defensa	P1, P3 y P4
DUOX2	Oxidasa dual 2		P1
FETUA	Alfa-2-HS-glicoproteína		Todos
KCC2D	Subunidad delta de proteína quinasa tipo II dependiente de calcio/calmodulina		P1
LYOX	Proteína-lisina 6-oxidasa		P1
MGP	Proteína Gla de la matriz		Todos

OSTCN	Osteocalcina		P1 y P4
PR39	Proteína antibacteriana PR-39		P1 y P3
RNAS4	Ribonucleasa 4		P1 y P3
THRB	Protrombina		Todos
CAP1	Proteína asociada a adenilil ciclasa 1		P1
APOC3	Apolipoproteína C-III		P2 y P3
TTHY	Transtiretina		P2, P3, P4 y P5
ILEU	Inhibidor de la elastasa leucocitaria		P1, P2, P3 y P4
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos	Mecanismos de defensa	Todos
DERM	Dermatopontina	Estructura extracelular	P1, P2 y P5
LEG1	Galectina-1	Estructura extracelular	Todos
COF1	Cofilina-1	Citoesqueleto	Todos
TBA1A	Cadena de tubulina alfa-1 ^a	Citoesqueleto	Todos
TBA1B	Cadena de tubulina alfa-1B		P1, P2, P3 y P4
TBB	Cadena beta de tubulina		Todos
TBB5	Cadena beta de tubulina		P1, P2 y P3
VIME	Vimentina		P1, P2, P3 y P4

5.3. Identificación de Proteínas Presentes en Muestras de Costillas y Tibias Humanas a Diferentes Intervalos *Post mortem*.

La extracción de proteínas se llevó a cabo utilizando los restos óseos de sólo 15 individuos del total de 20 (5 individuos provenientes de donaciones cadavéricas y 10 procedentes de cementerio), ya que las osamentas de los individuos restantes se dejaron como una reserva preventiva ante cualquier eventualidad. De esta forma, se trabajó con 15 muestras que corresponden a tejido cortical de costillas con 5 muestras por cada IPM (<1, 15 y 20 años), y 10 muestras que corresponden a tejido cortical de tibia con IPM de 15 y 20 años (la muestra tibia no considera IPM<1 año).

El proceso de extracción de proteínas se realizó replicando el procedimiento previamente estandarizado del protocolo 1. El extracto resultante se cuantificó por fluorometría y se analizó con LC-MS/MS mediante una corrida en base a péptidos trípticos y semitrípticos, para lo cual se consideró que una proteína fue identificada sólo cuando se le asignó a lo menos un péptido único. Posteriormente, las proteínas identificadas en ambas corridas fueron unificadas eliminando los valores duplicados.

En la **Tabla 3**, se detalla la cantidad de proteínas extraídas para cada muestra. Los resultados indican que, en promedio, la cantidad total de proteínas extraídas desde muestras de costillas fue de $1,13 \pm 0,15$ mg de proteína en muestras con $IPM < 1$ año, $0,63 \pm 0,07$ mg de proteína en muestras con $IPM = 15$ años, y $0,82 \pm 0,29$ mg de proteína en muestras con $IPM = 20$ años. Mientras que, para muestras de tibias la cantidad promedio de proteínas extraídas fue de $0,72 \pm 0,07$ mg de proteína en muestras con $IPM = 15$ años y $0,78 \pm 0,17$ mg de proteína en muestras con $IPM = 20$ años. En general, se logró extraer una mayor cantidad de proteínas en aquellas muestras que tienen un menor IPM.

Mediante el análisis por LC-MS/MS para muestras de costillas se lograron identificar en promedio 40 ± 12 proteínas en muestras con $IPM < 1$ año, 21 ± 4 proteínas en muestras con $IPM = 15$ años y 22 ± 4 proteínas en aquellas con $IPM = 20$ años. En tanto, para muestras de tibia, se identificó en promedio 17 ± 4 proteínas en muestras con $IPM = 15$ años y 19 ± 5 proteínas en muestras con

IPM=20 años. Tal como se observa en la **Figura 17**, luego de realizar una prueba Shapiro Wilk y determinar que los datos siguen una distribución normal (valores de p obtenidos mayores a 0,05), al aplicar una prueba T de Student, sólo se encontraron diferencias significativas para el número de proteínas identificadas entre muestras de costillas de IPM<1 año y aquellas de IPM=15 y 20 años, tanto para muestras de costilla como de tibia, con valores de $p=0,0113$ cuando se comparó con muestras de costillas con IPM=15, y valor de $p=0,0133$ al comparar con muestras de costillas con IPM=20. Mientras que, al comparar con muestras de tibia, los valores de p fueron de 0,0035 y 0,0066 tras comparar con muestras de IPM=15 e IPM=20 años respectivamente.

No fue posible identificar diferencias significativas entre condiciones con IPM=15 años frente a IPM=20 años, tanto en muestras de costillas como de tibias. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas para un mismo intervalo *post mortem* entre muestras procedentes de distinto hueso, particularmente entre aquellas muestras de costilla y tibia con un IPM=15 años, donde el resultado de la prueba T de Student fue de $p=0,0234$, por lo que el número de proteínas identificadas en muestras de costillas fue significativamente mayor que el número de proteínas identificadas en muestras de tibias de dicho IPM.

La **Tabla 4** muestra el número de proteínas identificadas en cada una de las 25 muestras para cada corrida (tríptica y semitríptica) y el número de proteínas

totales identificadas tras conjugar ambas corridas y eliminar los valores duplicados.

En base a los resultados obtenidos, es posible afirmar que en muestras con un IPM temprano (IPM<1 año), desde los 100 mg de polvo de hueso cortical se extrae una mayor cantidad de proteínas y a la vez, se identifica un mayor número de proteínas que de aquellas muestras cuyo IPM es más tardío (IPM=15 e IPM=20).

Tabla 3. Cantidad de proteínas extraídas en cada una de las muestras óseas humanas.

Cantidad total de proteínas extraídas en mg									
IPM<1 año		IPM=15 años				IPM=20 años			
Costillas		Costillas		Tibias		Costillas		Tibias	
MD4C_1	0,92	MR1_1C	0,65	MR1_1T	0,76	MR2_9C	1,03	MR2_9T	0,88
MD4C_2	1,30	MR1_2C	0,73	MR1_2T	0,68	MR2_11C	0,53	MR2_11T	0,91
MD4C_3	1,04	MR1_3C	0,62	MR1_3T	0,81	MR2_12C	0,75	MR2_12T	0,71
MD4C_4	1,16	MR1_4C	0,60	MR1_4T	0,69	MR2_14C	0,59	MR2_14T	0,51
MD4C_5	1,22	MR1_7C	0,53	MR1_7T	0,65	MR2_15C	1,22	MR2_15T	0,89
Promedio	1,13	Promedio	0,63	Promedio	0,72	Promedio	0,82	Promedio	0,78
Desviación	0,15	Desviación	0,07	Desviación	0,07	Desviación	0,29	Desviación	0,17

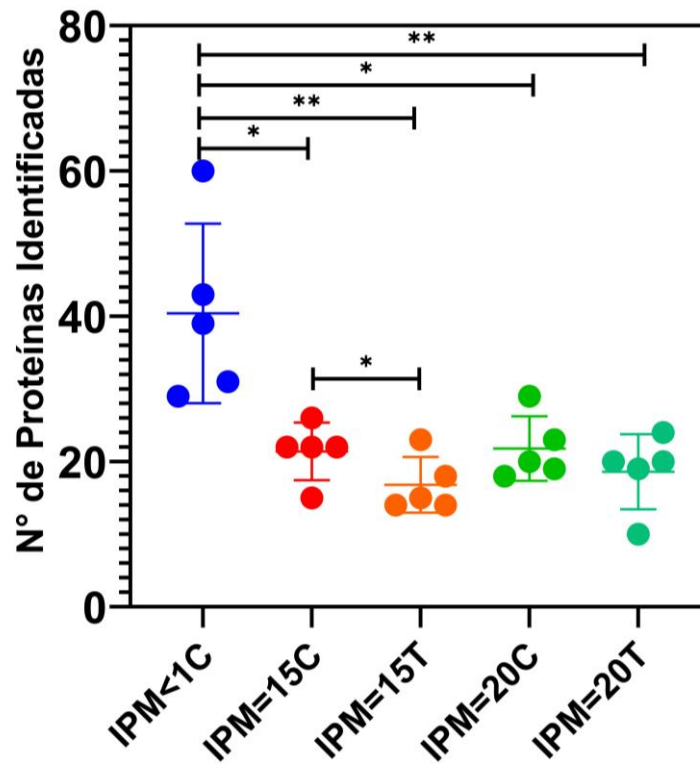


Figura 17. Número de proteínas identificadas en muestras humanas. Se presenta el número de proteínas identificadas agrupadas según su hueso de procedencia (C: costilla y T: tibias) y su respectivo IPM (<1, 15 y 20 años para muestras de costillas, y 15 y 20 años para muestras de tibias). Los resultados de la prueba T de Student al comparar los distintos IPM corresponden a $p=0,0113$ entre IPM<1C e IPM=15C, $p=0,0133$ para IPM<1C e IPM=20C, $p=0,0035$ para IPM<1C e IPM=15T, $p=0,0066$ para IPM<1C e IPM=20T, $p=0,8844$ para IPM=15C e IPM=20C, $p=0,5495$ para IPM=15T e IPM=20T. En tanto, los resultados para la comparativa entre huesos con un mismo IPM son de $p=0,0234$ para IPM=15C e IPM=15T, y $p=0,1501$ para IPM=20C e IPM=20T.

Tabla 4. Número de proteínas identificadas para cada muestra diferenciadas según el tipo de corrida y el resultado global por condición en estudio. (ID: Proteínas identificadas).

	Muestras	ID por Péptidos Tripticos	ID por Péptidos Semitripticos	Todas las ID	ID Total por grupo de IPM	
IPM<1 año	MD4C_1	27	38	39	91	
	MD4C_2	44	49	60		
	MD4C_3	32	39	43		
	MD4C_4	22	28	29		
	MD4C_5	18	31	31		
IPM=15 años	MR1_1C	18	19	22	36	50
	MR1_2C	12	15	15		
	MR1_3C	16	22	22		
	MR1_4C	17	19	22		
	MR1_7C	22	22	26		
	MR1_1T	5	14	14	37	
	MR1_2T	10	13	14		
	MR1_3T	14	12	18		
	MR1_4T	13	10	15		
	MR1_7T	14	23	23		
IPM=20 años	MR2_9C	20	22	29	41	57
	MR2_11C	15	12	18		
	MR2_12C	15	19	20		
	MR2_14C	12	18	19		
	MR2_15C	14	23	23	42	
	MR2_9T	15	23	24		
	MR2_11T	15	11	19		
	MR2_12T	14	15	20		
	MR2_14T	9	8	10		
MR2_15T	16	16	20			

En términos generales, el proteoma extraído desde muestras de costillas y tibias en los distintos IPM definidos, corresponden a 132 diferentes proteínas, las que se enlistan según su respectivo intervalo *post mortem* en el **Anexo 5**, donde además se detalla para cada proteína, el código de acceso en Uniprot y la función molecular obtenida desde InterPro.

Cabe destacar que dichas proteínas no son compartidas entre las distintas condiciones en estudio, por lo que para proporcionar información con sentido biológico respecto al proteoma conforme aumenta el intervalo *post mortem*, se identificaron aquellas proteínas que eran comunes entre réplicas biológicas. De esta manera, y tal cual como se aprecia en la **Figura 18**, se reconocieron 19 proteínas comunes entre las 5 muestras con un IPM<1 año derivadas de costillas. En tanto, aquellas muestras con IPM=15 años procedentes de costillas comparten 12 proteínas, y muestras con IPM=15 años provenientes de tibia comparten 8 proteínas. Mientras que, aquellas muestras con IPM=20 años procedentes de costillas comparten 12 proteínas, y muestras con IPM=20 años provenientes de tibia comparten 7 proteínas. Dichas proteínas, se enlistan en la columna "Proteínas comunes entre réplicas biológicas". Posteriormente, se definieron proteínas representativas por IPM, para lo cual se unificaron las proteínas identificadas en huesos con un mismo IPM, resultando en un total de 19 proteínas para el IPM<1, 13 proteínas para el IPM=15 años y 14 proteínas para el IPM=20 años. Las cuales corresponden a 22 diferentes proteínas que se detallan en la **Tabla 5**.

		Proteínas comunes entre réplicas biológicas	Proteínas representativas por IPM
A	<p>Muestras Costillas IPM<1</p>	<p>ALBU, CO1A1, CO1A2, FABP5, FETUA, H10, H12, H14, HBA, HBB, K1C10, K1C13, K2C1, K2C4, S10A8, S10A9, S10AB, SEMG1 y THR.B.</p>	<p>ALBU, CO1A1, CO1A2, FABP5, FETUA, H10, H12, H14, HBA, HBB, K1C10, K1C13, K2C1, K2C4, S10A8, S10A9, S10AB, SEMG1 y THR.B.</p>
B	<p>Muestras Costillas IPM=15</p>	<p>ALBU, CO1A1, CO1A2, FETUA, G3P, K1C13, K2C1, K2C4, S10A8, S10A9, SEMG1 y THR.B.</p>	<p>ALBU, CO1A1, CO1A2, CO3A1, FETUA, G3P, K1C13, K2C1, K2C4, S10A8, S10A9, SEMG1 y THR.B.</p>
C	<p>Muestras Tibias IPM=15</p>	<p>CO1A1, CO1A2, CO3A1, FETUA, K1C13, K2C1, S10A8 y SEMG1.</p>	
D	<p>Muestras Costillas IPM=20</p>	<p>ALBU, CO1A1, CO1A2, CO3A1, FETUA, G3P, K1C10, K1C13, K2C1, K2C4, S10A8 y SEMG1.</p>	
E	<p>Muestras Tibias IPM=20</p>	<p>CO1A1, CO1A2, FETUA, K1C13, PGS1, S10A8 y THR.B.</p>	<p>ALBU, CO1A1, CO1A2, CO3A1, FETUA, G3P, K1C10, K1C13, K2C1, K2C4, PGS1, S10A8, SEMG1 y THR.B.</p>

Figura 18. Proteínas compartidas entre muestras de un mismo intervalo *post mortem* y hueso de procedencia. Para cada condición se detalla el código de la muestra analizada con el número total de proteínas identificadas entre paréntesis. **(A)** Muestras provenientes de costillas con IPM<1 año. **(B)** Muestras de costillas con IPM=15 años. **(C)** Muestras de tibias con IPM=15 años. **(D)** Muestras de costillas con IPM=20 años. **(E)** Muestras de tibias con IPM=20 años.

Tabla 5. Nombre y función de las 22 proteínas definidas como representativas de cada IPM.

Identificador	Nombre	Función.
ALBU	Albúmina	Regulación de la presión osmótica coloidal de la sangre y transportador de calcio, sodio, potasio, zinc y magnesio en el plasma.
CO1A1	Cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo I	Se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón, la dentina y la córnea. Es formador de fibrilares y su función se asocia a la resistencia al estiramiento.
CO1A2	Cadena de colágeno alfa-2 del colágeno tipo I	Se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón, la dentina y la córnea. Es formador de fibrilares y su función se asocia a la resistencia al estiramiento.
CO3A1	Cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo III	Se produce en la mayoría de los tejidos conectivos blandos junto con el colágeno tipo I. Participa en la regulación del desarrollo cortical y función como sostén de los órganos expandibles.
FABP5	Proteína de unión a ácidos grasos 5	Portador intracelular de ácidos grasos de cadena larga y lípidos activos relacionados.
FETUA	Alfa-2-HS-glucoproteína	Promueve la endocitosis, posee propiedades opsónicas e influye en la fase mineral del hueso. Muestra afinidad por los iones de calcio y bario
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Cataliza el primer paso de la vía glucolítica y modula la organización y ensamblaje del citoesqueleto

H10	Histona H1.0	Condensación de cadenas de nucleosomas en estructuras de orden superior.
H12	Histona H1.2	Condensación de cadenas de nucleosomas en estructuras de orden superior.
H14	Histona H1.4	Condensación de cadenas de nucleosomas en estructuras de orden superior.
HBA	Subunidad alfa de la hemoglobina	Participa en el transporte de oxígeno desde el pulmón a los distintos tejidos periféricos.
HBB	Subunidad beta de la hemoglobina	Participa en el transporte de oxígeno desde el pulmón a los distintos tejidos periféricos.
K1C10	Queratina, tipo I citoesquelética 10	Participa en el mantenimiento del desarrollo de la capa celular y los haces de filamentos de queratina en las células suprabasales del epitelio.
K1C13	Queratina, tipo I citoesquelética 13	Mantiene la homeostasis de las células de la mucosa de la lengua posnatal y la organización de los tejidos en respuesta al estrés mecánico.
K2C1	Queratina, tipo II citoesquelética 1	Puede regular la actividad de quinasas como PKC y SRC mediante la unión a la integrina beta-1 (ITB1) y el receptor de la proteína C quinasa 1 activada (RACK1).
K2C4	Queratina, tipo II citoesquelética 4	Proteína formadora de filamentos intermedios que se expresan en las células epiteliales.
PGS1	Biglicano	Involucrado en el ensamblaje de la fibra de colágeno, modula la adherencia celular y media en la calcificación de la matriz orgánica.
S10A8	Proteína S100-A8	Proteína de unión a calcio y zinc que desempeña un papel destacado en la regulación de los procesos inflamatorios y la respuesta inmunitaria. Se encuentra predominantemente como calprotectina, actuando en la modulación del citoesqueleto dependiente de tubulina durante la migración de los fagocitos.
S10A9	Proteína S100-A9	Proteína de unión a calcio y zinc que juega un papel destacado en la regulación de los procesos inflamatorios y la respuesta inmune. Se encuentra predominantemente

		como calprotectina, actuando en la modulación del citoesqueleto dependiente de tubulina durante la migración de los fagocitos.
S10AB	Proteína S100-A11	Facilita la diferenciación y la cornificación de los queratinocitos. Une dos iones de calcio por molécula con una afinidad similar a la de las proteínas S-100.
SEMG1	Semenogelina-1	Participa en la formación de una matriz de gel que atrapa las secreciones de las glándulas accesorias y los espermatozoides eyaculados. La alfa-inhibina-92 y la alfa-inhibina-31, derivadas de la degradación proteolítica de la semenogelina, inhiben la secreción de la hormona estimulante del folículo pituitario.
THRB	Protrombina	Escinde los enlaces después de Arg y Lys, convierte el fibrinógeno en fibrina y activa los factores V, VII, VIII, XIII y, en combinación con la trombomodulina, la proteína C.

5.4. Caracterización in Silico de las Proteínas Identificadas en Muestras Humanas.

Se determinó la clasificación funcional, peso molecular y tipo de aminoácido de las 22 proteínas que se establecieron como representativas de cada uno de los intervalos *post mortem* definidos en el estudio, con el propósito de caracterizar a las proteínas identificadas en los distintos IPM.

La **Figura 19A** muestra el resultado de la asignación del *clusters of orthologous groups* (COGs) a través de la herramienta EggNog-Mapper, donde se evidencia que las proteínas identificadas están asociadas principalmente a mecanismos de transducción de señales, proteínas citoesqueléticas y vinculadas a la estructura

de la cromatina. Cabe destacar, que la base de datos sólo asignó una clasificación funcional a 19 de las 22 proteínas identificadas, quedando sin clasificación la cadena de colágeno alfa-1(I) (CO1A1), cadena de colágeno alfa-2(I) (CO1A2) y la cadena de colágeno alfa-1(III) (CO3A1), no obstante, dados los roles de estas proteínas, podemos afirmar que se encuentran vinculadas a una función de soporte.

Se ha postulado que la estabilidad *post mortem* de las proteínas podría deberse a propiedades estructurales (Prieto-Bonete et al., 2019). Por lo que se compararon e identificaron variaciones en el peso molecular y la composición aminoacídica de las proteínas identificadas en muestras tempranas con un IPM < 1 año frente a aquellas que perduran hasta tiempos *post mortem* más tardíos, en primera instancia, se realizó un diagrama de Venn para identificar proteínas exclusivas y compartidas en los distintos IPM.

En la **Figura 19B** se observa que 7 proteínas, entre ellas la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5), histona H1.0 (H10), histona H1.2 (H12), histona H1.4 (H14), subunidad alfa de la hemoglobina (HBA), subunidad beta de la hemoglobina (HBB) y la proteína S100-A11 (S10AB), sólo fueron identificadas en el IPM menor a un año. En tanto, 10 proteínas se mantienen a través del tiempo preservándose hasta los intervalos *post mortem* más tardíos (IPM=15 e IPM=20 años), proteínas que corresponden a la albúmina (ALBU), cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo I (CO1A1), cadena de colágeno alfa-2 del colágeno tipo

I (CO1A2), alfa-2-HS-glicoproteína (FETUA), queratina tipo I citoesquelética 13 (K1C13), queratina tipo II citoesquelética 1 (K2C1), queratina tipo II citoesquelética 4 (K2C4), proteína S100-A8 (S10A8), semenogelina-1 (SEMG1) y protrombina (THRB).

El peso molecular y composición aminoacídica para las proteínas de IPM < 1 año y de IPM ≥ 15 años determinado con la herramienta ProtParam, se presenta en la **Figura 19C**. Las proteínas presentes sólo en muestras con IPM < 1 año tienen en promedio un peso molecular de 17465 ± 3899 kDa, mientras que las proteínas halladas en IPM mayores o iguales a 15 años, su peso molecular promedio es de 68171 ± 38899 kDa. Tras realizar una prueba de hipótesis T de Student para datos con distribución normal (previamente determinado por una prueba Shapiro Wilk con resultados de p mayores a 0,05), se obtuvo que el peso molecular de proteínas que perduran hasta IPM tardíos, es significativamente mayor que el de las proteínas que sólo se hallan en muestras con IPM tempranos (valor de $p = 0,0039$).

Por otra parte, en cuanto a la composición aminoacídica se evidenció que el porcentaje de aminoácidos ácidos (Asp y Glu) para proteínas presentes sólo en IPM menor a un año es en promedio de un $8,1 \pm 4,6\%$, en tanto, para proteínas que perduran hasta IPM mayores o iguales a 15 años, el promedio es de un $12,2 \pm 2,8\%$. Por otro lado, el porcentaje de aminoácidos básicos (Lys, Arg e His) en proteínas presentes sólo en IPM menor a un año promedia un $21,9 \pm 8,4\%$,

mientras que, proteínas que perduran hasta IPM mayores o iguales a 15 años exhiben un promedio del $13,7 \pm 4,1\%$. Se estableció que estas diferencias de porcentaje eran significativas luego de realizar una prueba de hipótesis para datos con distribución normal T de Student, donde se evidenció que aquellas proteínas que permanecen en tiempos *post mortem* tardíos ($IPM \geq 15$) tienen una proporción significativamente mayor ($p=0,0386$) de aminoácidos ácidos en comparación con proteínas de tiempos *post mortem* tempranos ($IPM < 1$). Asimismo, estas proteínas tienen una proporción significativamente menor ($p=0,0159$) de aminoácidos básicos que proteínas de tiempos *post mortem* tempranos (**Figura 19D**).

Los resultados observados permiten concluir que aquellas proteínas con una prolongada preservación *post mortem*, se caracterizan por cumplir funciones vinculadas al citoesqueleto y a mecanismos de transducción de señales. A su vez, en términos de estructura presentan un mayor peso molecular y una mayor proporción de aminoácidos ácidos en el global de su secuencia aminoacídica. Por el contrario, proteínas identificadas en intervalos *post mortem* tempranos, se asocian a funciones principalmente de estructura y dinámica de la cromatina, y a la producción y conversión de energía. Al mismo tiempo que se les describe un menor peso molecular y una estructura primaria marcada por la presencia de aminoácidos básicos.

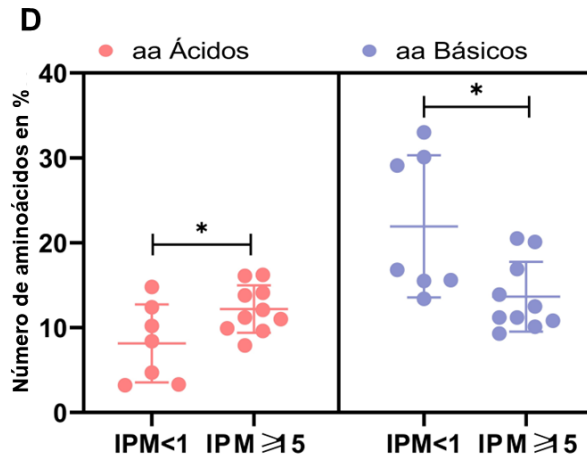
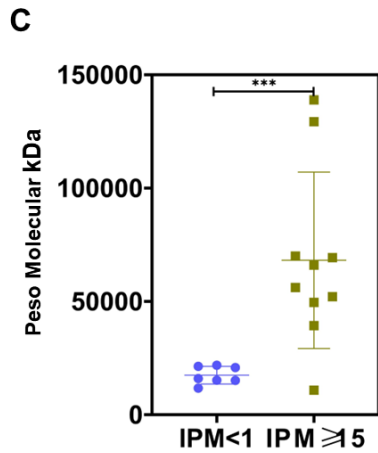
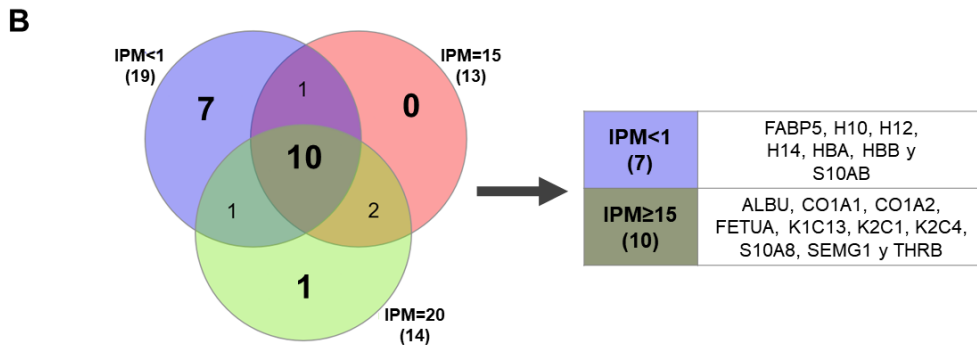
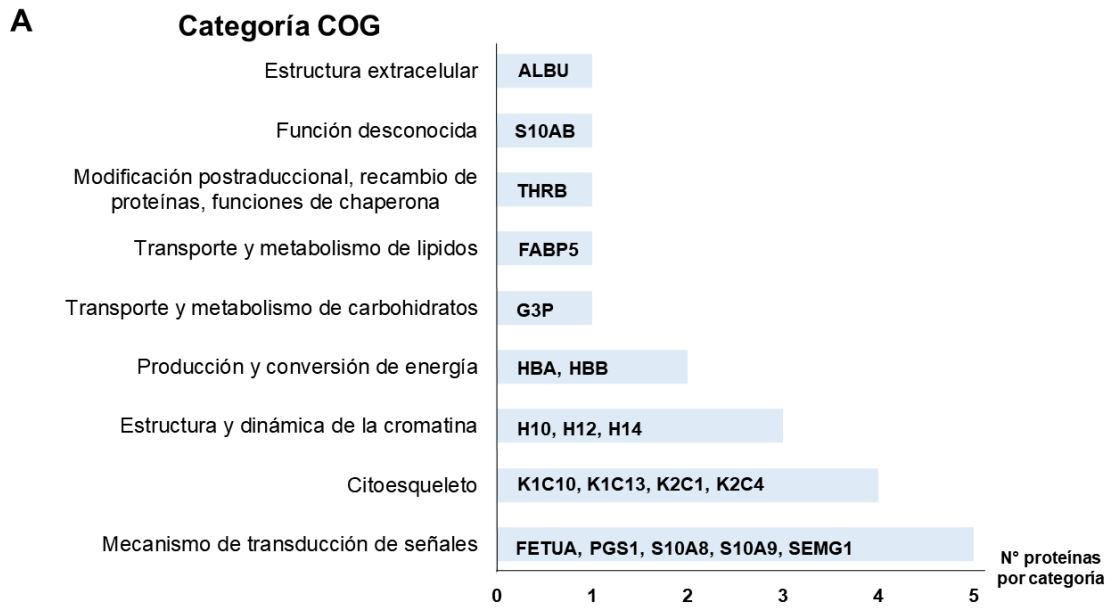


Figura 19. Propiedades de las proteínas establecidas como representativas de los distintos tiempos *post mortem*. **(A)** Clusters of Orthologous Groups (COGs) de las 19 de 22 proteínas identificadas en común para los tres tiempos *post mortem* en estudio. **(B)** Diagrama de Venn entre las proteínas de cada IPM. El IPM<1 se compone de 19 proteínas, el IPM=15 de 13 y el IPM=20 de 14. Un total de 7 proteínas (FABP5, H10, H12, H14, HBA, HBB y S10AB) son exclusivas del IPM<1. En tanto 10 proteínas (ALBU, CO1A1, CO1A2, FETUA, K1C13, K2C1, K2C4, S10A8, SEMG1, y THRB) se identifican en los tres IPM. **(C)** Pesos moleculares en kDa de las proteínas presentes en IPM<1 año e IPM≥15 años. **(D)** Composición de aminoácidos ácidos y básicos de las proteínas presentes en IPM<1 año e IPM≥15 años. En rosa aminoácidos ácidos con promedios de IPM<1= 12,2±2,8%; IPM≥15=8,1±4,6%. Valor p=0,0386 prueba T de Student unpaired. En lila aminoácidos básicos con promedios de IPM<1= 13,7±4,1%; IPM≥15=21,9±8,4%. Valor p=0,0159 prueba T de Student unpaired.

5.5. Análisis Estadístico Multivariado. MCA y PCA.

A fin de comprender las relaciones entre las múltiples variables en estudio e identificar patrones entre las mismas a lo largo de los distintos tiempos *post mortem*, se llevaron a cabo análisis estadísticos multivariados sobre las 22 proteínas definidas como representativas. En primera instancia, se ejecutó un análisis de correspondencia múltiple sobre variables categóricas para evaluar la dinámica del proteoma *post mortem* en función de la presencia y ausencia de proteínas. Por otra parte, se ejecutaron análisis de componentes principales trabajando sobre variables cuantitativas, específicamente, los valores de intensidades (abundancia relativa) obtenidos para cada proteína a partir de la identificación de péptidos trípticos y semitrípticos.

Como resultado del MCA, las dos principales dimensiones son suficientes para explicar el 58,4% de la varianza total de los datos.

En la Figura **20A** se observa que las muestras de individuos con IPM<1 año (códigos MD4C) se agrupan de manera similar, y la diversidad de proteínas en este grupo hace que sean diferentes a las muestras con IPM=15 e IPM=20 años (códigos MR1 y MR2 respectivamente). En cuanto a los intervalos tardíos, no es posible evidenciar un conglomerado claramente definido entre muestras con data de muerte igual a 15 años respecto a las de 20 años. Sin embargo, para estos intervalos se aprecia una diferenciación según el tipo de hueso, ya que las muestras provenientes de costillas se encuentran agrupadas entre sí y marcadamente separadas de las muestras de tibia, con excepción de la muestra MR1_7T la cual es más similar al grupo de las muestras procedentes de costillas. Por su parte, muestras de tibia también exhiben una agrupación entre ellas, siendo, como ya se mencionó, las muestras MR1_7T y la muestra MR2_15T las que exhiben una mayor variabilidad.

Al analizar las proteínas cuya presencia/ausencia contribuyen en mayor medida a la variabilidad total, se observa en la **Figura 20B** que las proteínas histona H1.0 (H10), histona H1.2 (H12), histona H1.4 (H14), proteína S100-A11 (S10AB), subunidad beta de la hemoglobina (HBB), subunidad alfa de la hemoglobina (HBA) y la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5), se correlacionan fuertemente con la Dimensión 1 que retiene el 42,8% de la varianza global. En

particular, la presencia de estas proteínas permitiría distinguir aquellas muestras tempranas (IPM<1 año) respecto a muestras tardías (IPM=15 e IPM=20 años).

Por su parte, en los análisis de PCA las dimensiones uno y dos explican el 37,8% y el 38.3% de la varianza total del conjunto de datos generados por los valores de intensidades de cada proteína a partir de péptidos trípticos y semitrípticos respectivamente.

Tomando en consideración las intensidades de las proteínas generadas por péptidos trípticos, el resultado del PCA en cuanto a la agrupación de las muestras, revela que no es posible generar una categorización claramente diferenciada según los tres tiempos *post mortem* definidos. Tal y como se observa en la **Figura 21A**, las muestras de individuos con IPM<1 año tienden a separarse del resto, pero no se encuentran agrupadas entre sí, a excepción de MD4C_4 y MD4C_5 que serían similares entre sí y a su vez, más parecidas a las muestras de costillas procedentes de IPMs tardíos en términos de la abundancia relativa de sus proteínas. Por su parte, muestras con IPM=15 años y aquellas que tienen un IPM=20 años no generan conglomerados notoriamente definidos, no obstante, es posible diferenciar entre aquellas que fueron extraídas desde fragmentos de costillas y las que provienen de restos de tibia.

Ahora bien, al trabajar con intensidades de proteínas generadas por péptidos semitrípticos, las muestras con IPM<1 año se alejan y diferencian de los otros IPM, siendo las muestras MD4C_1, MD4C_4 y MD4C_5 las más parecidas entre

sí. Una vez más, las muestras de IPMs tardíos se agrupan según el hueso de procedencia. Sin embargo, no son marcadas las diferencias entre aquellas con datas de muerte de 15 años respecto a las de 20 años, aunque se observan ciertas tendencias en el caso de muestras procedentes de costillas, donde las que tienen un IPM=20 años se agrupan cerca del punto de origen a excepción de MR2_11C, mientras que las con IPM=15 años se disponen alrededor de estas **(Figura 21B)**.

En el caso de las intensidades de péptidos trípticos, las proteínas histona H1.4 (H14), subunidad beta de la hemoglobina (HBB), proteína S100-A11 (S10AB) y la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5) son las que más se correlacionan con la dimensión 1 que explica el 20,3% de la varianza, en tanto, las proteínas histona H1.2 (H12), subunidad alfa de la hemoglobina (HBA), queratina tipo II citoesquelético 4 (K2C4) y queratina tipo I citoesquelético 13 (K1C13) expresan la mayor asociación con la dimensión 2 que retiene el 17,5% de la varianza **(Figura 21A)**. Mientras que para el análisis de PCA sobre las intensidades provenientes de péptidos semitrípticos, las proteínas queratina tipo I citoesquelético 13 (K1C13), histona H1.4 (H14), proteína S100-A11 (S10AB), semenogelina-1 (SEMG1), queratina tipo I citoesquelético 10 (K1C10) y subunidad beta de la hemoglobina (HBB), se correlacionan principalmente con la dimensión 1 que contiene el 26,5% de la varianza. En tanto, las proteínas subunidad alfa de la hemoglobina (HBA), queratina tipo II citoesquelético 4

(K2C4), histona H1.0 (H10) y queratina tipo I citoesquelético 10 (K1C10), se relacionan con la dimensión 2 que explica el 11,8% de la varianza (**Figura 21BII**).

En términos generales, los resultados de los análisis estadísticos multivariados permiten aseverar que, en primer lugar, muestras con IPMs tempranos exhibirían un patrón proteómico en términos de presencia/ausencia y de abundancia relativa diferente al de muestras con IPMs tardíos. Lo cual no ocurre entre muestras con IPMs tardíos (IPM=15 versus IPM=20 años). Sin embargo, muestras de costillas presentarían un proteoma claramente diferenciado respecto al de muestras de tibias. Asimismo, las proteínas histona H1.0 (H10), histona H1.2 (H12), histona H1.4 (H14), proteína S100-A11 (S10AB), subunidad beta de la hemoglobina (HBB), subunidad alfa de la hemoglobina (HBA) y la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5), serían las principales proteínas limítrofes entre muestras tempranas y muestras tardías. Por último, las intensidades generadas a partir de péptidos semitripticos, permitiría plasmar de mejor manera el patrón de abundancia proteica entre muestras tempranas y muestras tardías.

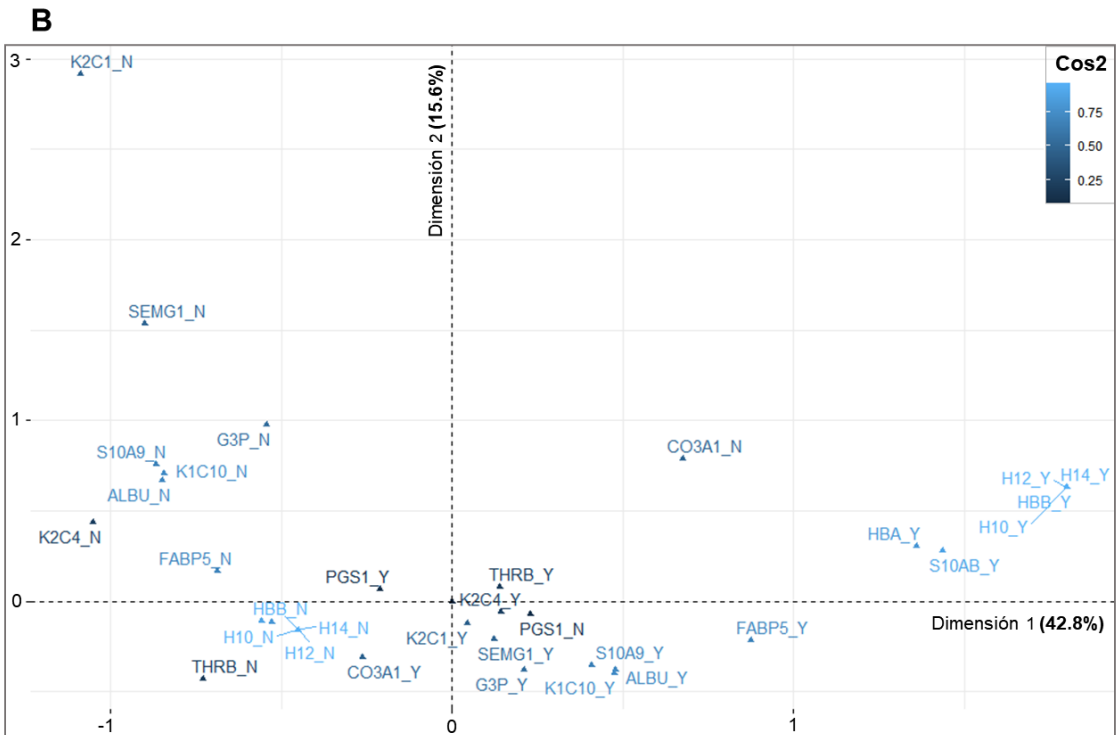
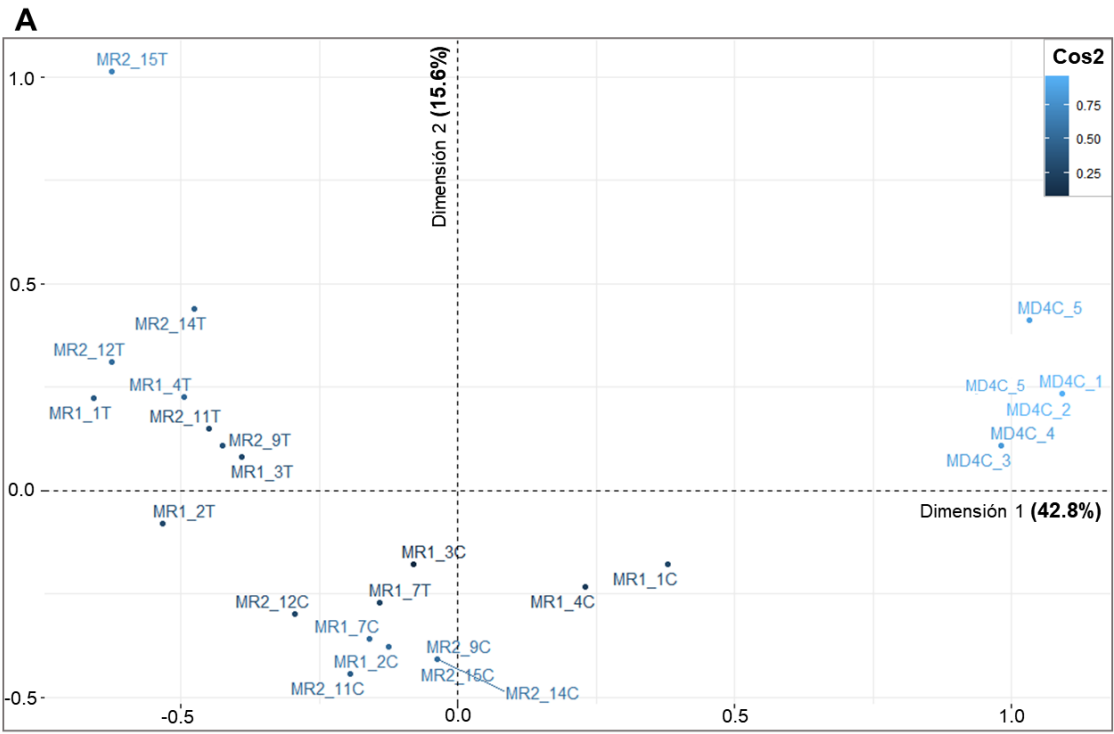
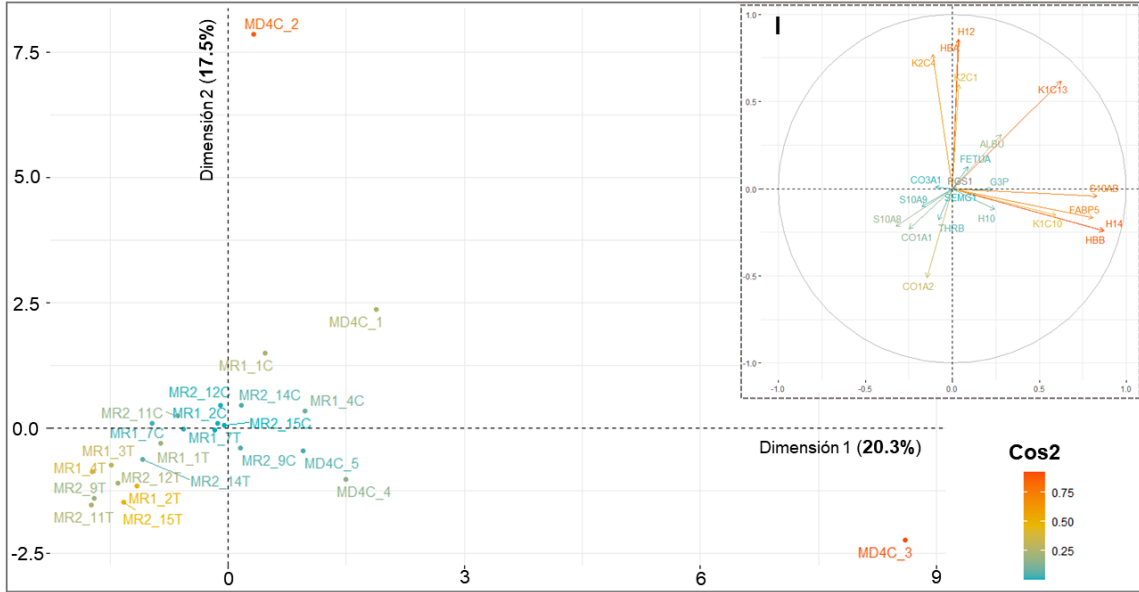


Figura 20. Dinámica del proteoma *post mortem* establecido por la presencia/ausencia de proteínas mediante análisis de MCA. (A) Gráfico de MCA según las distintas muestras con sus respectivos valores de Cos2 (calidad de la representación), el cual mide el grado de asociación entre las categorías de variables y un eje particular. **(B)** Proteínas con sus respectivos valores de Cos2. Las etiquetas “Y” y “N” denotan presencia y ausencia de una proteína respectivamente. Tanto muestras como proteínas en color celeste presentan el mayor valor de Cos2, por lo que se encuentran mejor representadas en ambas dimensiones y son las más relevantes para explicar la variabilidad en el conjunto de datos.

A PCA Tríptico



B PCA Semitrípico

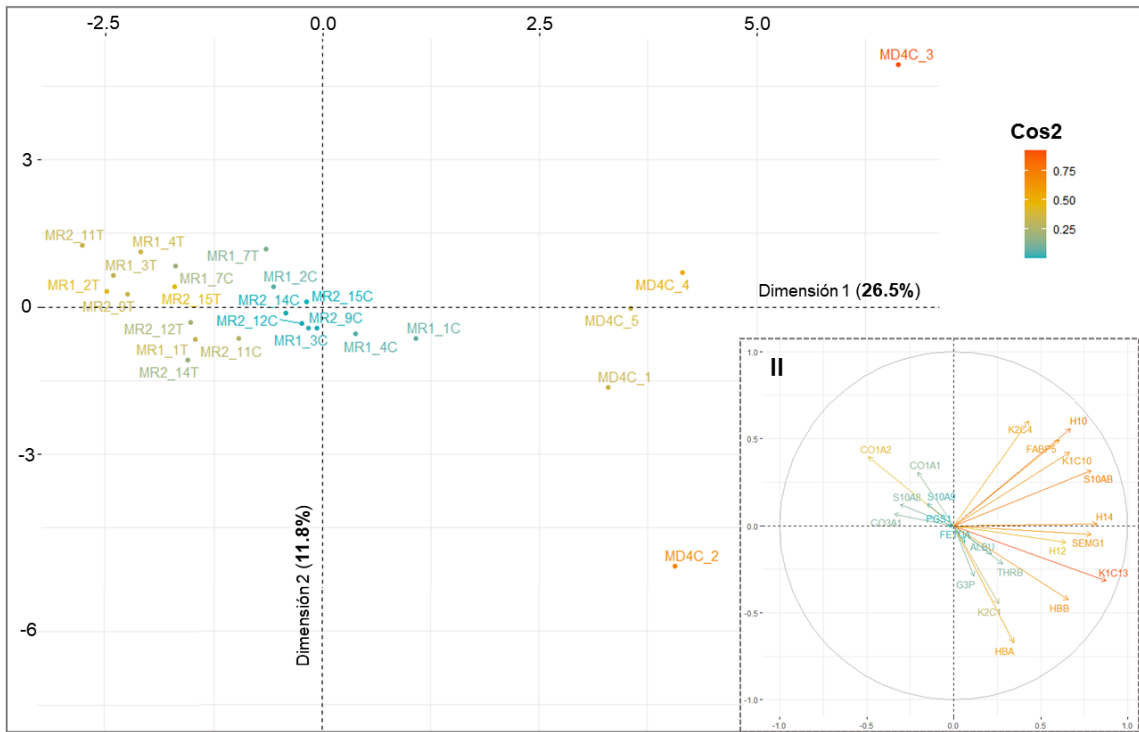


Figura 21. Dinámica del proteoma *post mortem* establecido por la abundancia relativa de proteínas mediante análisis de PCA. (A) Gráfico de PCA según las distintas muestras con sus respectivos valores de Cos2 generados a partir de intensidades de péptidos trípticos. **(I)** Círculo de correlación entre las proteínas y los componentes principales para las intensidades con péptidos trípticos. **(B)** Gráfico de PCA según las distintas muestras con sus respectivos valores de Cos2 generados a partir de intensidades de péptidos semitrípticos. **(II)** Círculo de correlación entre las proteínas y los componentes principales para las intensidades con péptidos semitrípticos.

5.6. Análisis de Abundancias Relativas.

A razón de evaluar cambios en la abundancia relativa tanto en el proteoma de costillas como en el de tibias conforme aumenta el intervalo *post mortem*, se analizaron los valores de intensidad de cada proteína generados a partir de péptidos trípticos y semitrípticos.

En primer lugar, se identificaron proteínas cuyos valores de intensidad estuvieran disponibles en a lo menos 3 réplicas biológicas, para luego imputar los datos faltantes. Posteriormente, se aplicaron pruebas estadísticas Shapiro Wilk para identificar si los datos exhibían o no distribución normal (resultados disponibles en el **Anexo 6**), seguido de pruebas de hipótesis T de Student cuando los datos tenían distribución normal, y pruebas de Mann-Whitney cuando no existía normalidad entre los datos, a fin de identificar diferencias entre las condiciones analizadas. Los valores de p de las distintas pruebas empleadas se detallan en

la **Tabla 6** para el análisis en muestras de costillas y en la **Tabla 7** para las de tibia.

Como resultado del análisis en muestras provenientes de costillas para los tres IPMs en estudio, se examinó la abundancia relativa de 14 proteínas luego del proceso de imputación. Estas corresponden a la cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo I (CO1A1), cadena de colágeno alfa-2 del colágeno tipo II (CO1A2), albúmina (ALBU), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3P), proteína inducible por prolactina (PIP), proteína S100-A8 (S10A8), proteína S100-A9 (S10A9), queratina tipo I citoesquelético 10 (K1C10), queratina tipo I citoesquelético 13 (K1C13), queratina tipo II citoesquelético 1 (K2C1), queratina tipo II citoesquelético 4 (K2C4), que fueron analizadas tanto en la corrida tríplica como semitríplica; y las proteínas alfa-2-HS-glicoproteína (FETUA), semenogelina-1 (SEMG1) y protrombina (THRB) analizadas sólo en la corrida semitríplica.

Dichas proteínas demostraron una tendencia a disminuir su abundancia conforme aumenta el IPM, a excepción del CO1A1 en el análisis tríplico, CO1A2 en el análisis sobre intensidades tríplicas y semitríplicas, así como también, en el caso de THRB en el análisis con semitrípicos.

Tal como es posible de apreciar en la **Figura 22**, las proteínas PIP, S10A9 y K1C13 evidenciaron una abundancia relativa significativamente mayor en muestras con IPM<1 año respecto a aquellas de IPM=15 e IPM=20 años, lo cual

fue observable tanto en el análisis sobre intensidades semitrípticas como trípticas, a excepción de PIP que no mostró diferencias significativas entre IPM<1 e IPM=15 para el análisis sobre intensidades trípticas.

Asimismo, las proteínas ALBU y G3P, aunque exhiben una tendencia progresiva a disminuir su abundancia conforme aumenta el IPM, sólo fue posible identificar diferencias significativas entre la abundancia del IPM<1 años e IPM=20 años para ambas corridas.

En tanto, la proteína K1C10 exhibió una abundancia significativamente menor en muestras con IPM=20 años respecto a muestras de IPM<1 e IPM=15 años, tanto en el caso de la corrida tríptica como semitríptica.

Sólo para las proteínas K2C1 y K2C4 se identificaron cambios significativos en los tres tiempos *post mortem* en estudio. En particular, K2C1 mostró una disminución significativamente progresiva en la corrida tríptica, y sólo entre muestras con IPM<1 año frente a IPM=15 e IPM=20 años para la corrida semitríptica. Mientras que K2C4 mostró una disminución significativamente progresiva en la corrida semitríptica, en el caso de la corrida tríptica los cambios significativos de abundancia sólo se observaron entre muestras con IPM<1 frente a IPM=20 años y en muestras con IPM=15 respecto a las de IPM=20 años.

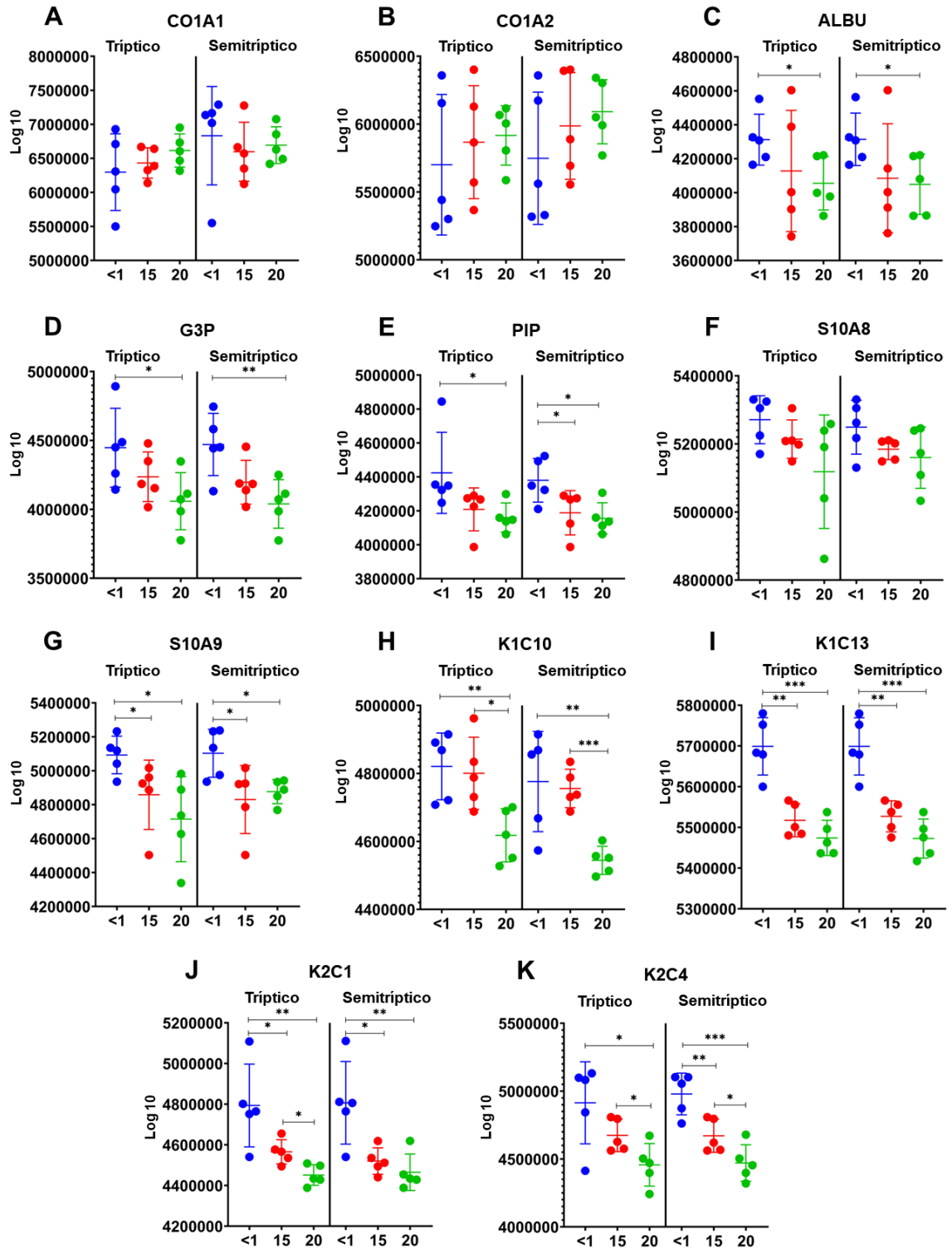
En general, es posible señalar que la abundancia relativa en muestras de costillas es mayor en IPM tempranos (IPM<1 año). IPM tardíos (IPM=15 e IPM=20 años)

exhiben una menor abundancia conforme aumenta el IPM, mas, no es posible establecer cambios significativos en este rango de 5 años *post mortem*.

Los resultados del análisis en muestras provenientes de tibias para los intervalos *post mortem* de 15 y 20 años, se muestran en la **Figura 23**. En estas muestras se evaluaron los cambios de abundancia *post mortem* de 9 proteínas, la cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo I (CO1A1), cadena de colágeno alfa-2 del colágeno tipo II (CO1A2), alfa-2-HS-glicoproteína (FETUA), proteína S100-A8 (S10A8), queratina tipo II citoesquelético 1 (K2C1), y queratina tipo I citoesquelético 13 (K1C13), que se analizaron tanto en el modo trípico como semitrípico. En tanto, la cadena de colágeno alfa-1 del colágeno tipo III (CO3A1) y la protrombina (THRB) fueron analizadas exclusivamente en la corrida semitrípica. Mientras que la queratina tipo II citoesquelético 4 (K2C4) se analizó sólo para la corrida trípica.

En términos generales, para la mayoría de las proteínas identificadas en muestras de tibia, la abundancia relativa es mayor en muestras con IPM=20 años respecto a las de IPM=15 años, identificando diferencias significativas en las abundancias de la corrida semitrípica de las proteínas FETUA, CO3A1 y THRB. Sólo la proteína K1C13 demostró una tendencia a la baja con el aumento del IPM en ambas corridas, para la que inclusive en el caso del análisis sobre la corrida semitrípica, se encontró una abundancia significativamente menor en el IPM=20 respecto al IPM=15 años (**Figura 23F**). Asimismo, la proteína K2C4 expresa una

tendencia a disminuir su abundancia conforme aumenta el IPM, pero sin exhibir diferencias significativas. Por ende, en muestras de tibias sólo las proteínas K1C13 y K2C4 se correlacionan negativamente con el aumento del intervalo *post mortem*.



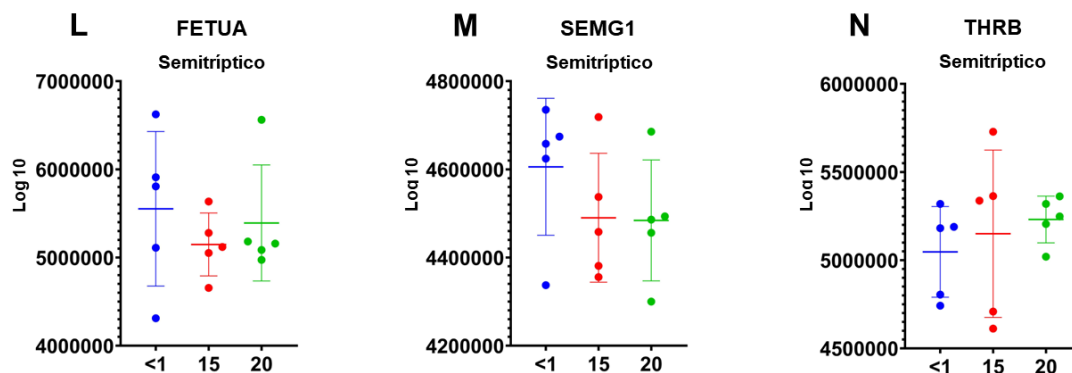


Figura 22. Cambios en la abundancia relativa de proteínas extraídas desde muestras de costillas a distintos IPM. A la izquierda se muestra la gráfica con las abundancias analizadas en la corrida tríptica y a la derecha los resultados para la corrida semitriptica, de las siguientes proteínas: (A) CO1A1, (B) CO1A2, (C) ALBU, (D) G3P, (E) PIP, (F) S10A8, (G) S10A9, (H) K1C10, (I) K1C13, (J) K2C1, (K) K2C4, (L) FETUA, (M) SEMG1 y (N) THR B. Las diferencias significativas se marcan con asterisco, siendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,0005$.

Tabla 6. Resultados de las pruebas de hipótesis en proteínas identificadas en muestras de costillas. (T: prueba T de Student, M: prueba Mann-Whitney).

Proteína	Tripticos				Semitripticos			
	Test	IPM<1 vs IPM=15	IPM<1 vs IPM=20	IPM=15 vs IPM=20	Test	IPM<1 vs IPM=15	IPM<1 vs IPM=20	IPM=15 vs IPM=20
CO1A1	T	0,6330	0,2815	0,2520	M	0,4206	0,2222	0,6905
CO1A2	T	0,5916	0,4160	0,8192	T	0,4199	0,1944	0,6229
ALBU	T	0,3186	0,0295	0,6868	T	0,1879	0,0356	0,8333
G3P	T	0,2008	0,0396	0,1865	T	0,0574	0,0098	0,1765
PIP	M	0,0556	0,0159	0,5476	T	0,0479	0,0131	0,6595
S10A8	T	0,1962	0,0957	0,2581	T	0,1260	0,1353	0,5820
S10A9	M	0,0317	0,0159	0,4206	T	0,0378	0,0127	0,6378
K1C10	T	0,7640	0,0069	0,0147	T	0,7792	0,0095	0,0001
K1C13	T	0,0011	0,0003	0,1401	T	0,0014	0,0003	0,0813
K2C1	T	0,0431	0,0065	0,0113	T	0,0170	0,0080	0,2981
K2C4	T	0,1373	0,0171	0,0395	T	0,0080	0,0005	0,0390
FETUA	-	-	-	-	T	0,4206	0,6905	0,8413
SEMG1	-	-	-	-	T	0,2602	0,2261	0,9486
THRB	-	-	-	-	T	0,6817	0,1934	0,7225

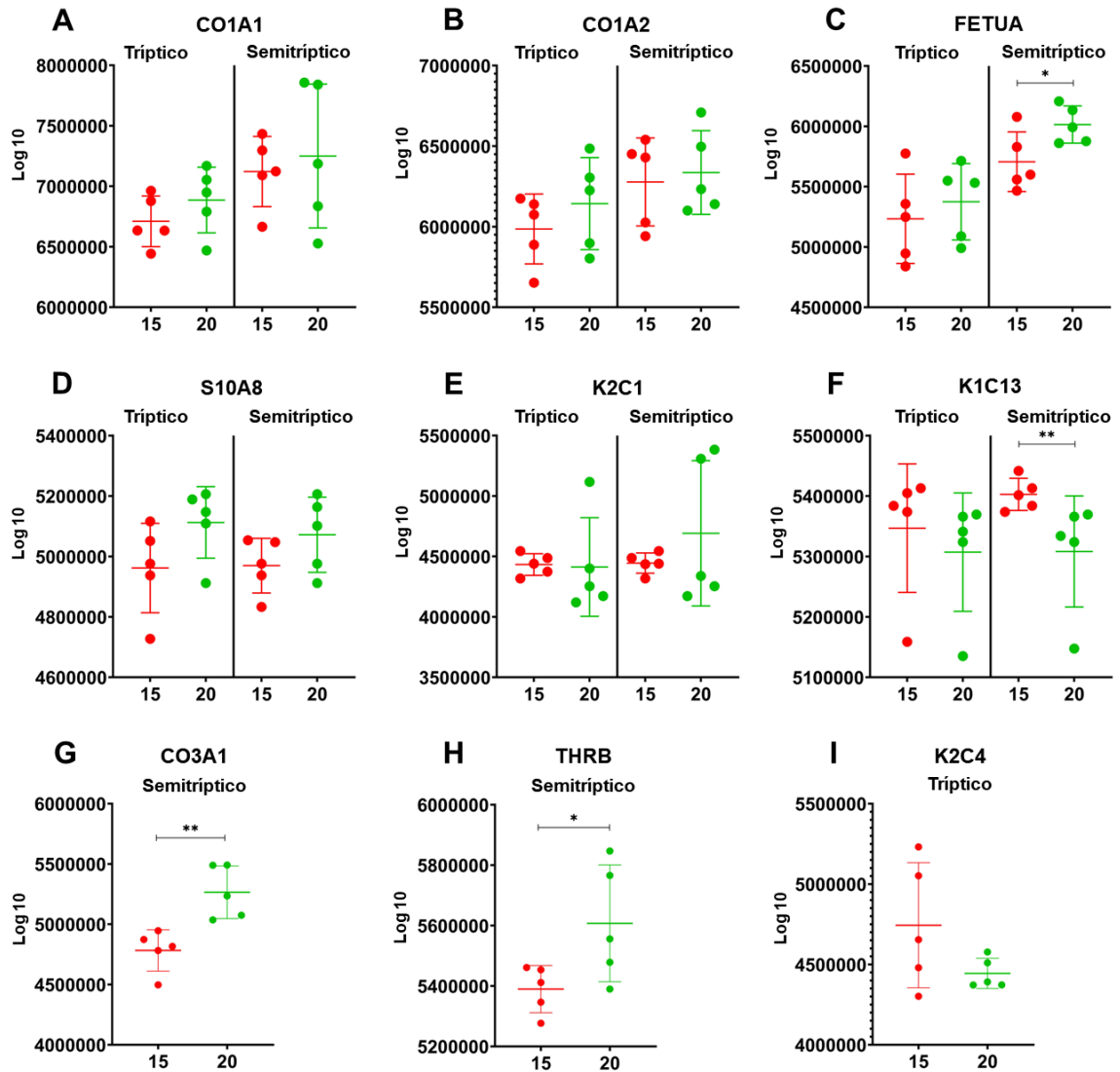


Figura 23. Cambios en la abundancia relativa de proteínas extraídas desde muestras de tibias con IPM=15 e IPM=20 años. A la derecha se muestra la gráfica con las abundancias analizadas en la corrida triptico y a la izquierda los resultados para la corrida semitriptico para las proteínas (A) CO1A1, (B) CO1A2, (C) FETUA, (D) S10A8, (E) K2C1, (F) K1C13, (G) CO3A1, (H) THRB e (I) K2C4. Las diferencias significativas se marcan con asterisco, siendo * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$.

Tabla 7. Resultados de las pruebas de hipótesis en proteínas identificadas en muestras de tibias. (T:prueba T de Student, M: prueba Mann-Whitney).

Proteína	Trípticos		Semitrípticos	
	Test	IPM=15 vs IPM=20	Test	IPM=15 vs IPM=20
CO1A1	T	0,2842	T	0,6769
CO1A2	T	0,3553	T	0,7377
FETUA	T	0,5334	T	0,0456
S10A8	T	0,1127	T	0,1747
K2C1	T	0,1331	T	0,3909
K1C13	M	0,0952	M	0,0079
CO3A1	-	-	T	0,0047
THRB	-	-	T	0,0478
K2C4	T	0,1331	-	-

6. DISCUSIÓN

En el último tiempo, la degradación *post mortem* de las proteínas se ha transformado en un foco de atención entre las investigaciones tafonómicas con fines de datación humana, sobre todo, para aquellos contextos de larga data donde el material disponible corresponde casi únicamente a restos óseos. Sin embargo, el conocimiento en la temática aún es limitado, existiendo grandes vacíos en torno al curso que sigue la degradación del proteoma en el tejido óseo y su posible correlación con el tiempo transcurrido después de la muerte. En este sentido, y en post de avanzar hacia futuras aplicaciones en la estimación del intervalo *post mortem*, el presente estudio ha explorado la dinámica del proteoma en muestras óseas humanas de costillas y tibias a tres tiempos *post mortem*.

Teniendo en cuenta que la extracción de proteínas desde restos óseos representa un desafío dada la amplia mineralización del tejido óseo, se probaron cinco protocolos de extracción en muestras óseas de cerdo, con el objetivo de estandarizar el proceso y determinar el procedimiento más efectivo en cuanto a cantidad, número y diversidad de proteínas extraídas e identificadas. Algunos estudios han utilizado la desmineralización de la matriz ósea antes de la solubilización de las proteínas como estrategia para acceder a un mayor número de proteínas, (Bonicelli et al., 2022a; Bonicelli et al., 2022b; Mickleburgh et al., 2021; Prieto-Bonete et al., 2019; Procopio et al., 2018). En la presente investigación, se alternaron metodologías con y sin desmineralización antes de la aplicación de los reactivos para la extracción proteica.

Los resultados evidenciaron que el uso de trifluoroetanol (TFE) como buffer de extracción, no sólo es capaz de extraer una mayor cantidad de proteínas que otros protocolos, particularmente más que el protocolo 3 y el protocolo 4, los cuales emplean reactivos tradicionalmente aplicados en los procesos de extracción, como el cloruro de guanidinio, el bicarbonato de amonio y la urea (Cleland et al., 2012). Sino que, al mismo tiempo, el protocolo que utiliza el reactivo TFE permite identificar un mayor número de proteínas en el análisis por LC-MS/MS.

El mejor rendimiento de extracción se obtuvo con el protocolo 5 que extrajo 4,05 mg de proteína total mediante el uso de fosfato de amonio 400 mM, bicarbonato de amonio 200 mM y clorhidrato de guanidina 4 M. Sin embargo, la exposición prolongada de las proteínas a altas temperaturas durante el proceso de incubación de este protocolo condujo a una mayor degradación del proteoma, tal como se observó en el análisis de SDS-Page, lo que posteriormente se tradujo en una menor cantidad de proteínas identificadas a partir de LC-MS/MS. A diferencia de lo ocurrido con los protocolos 1 y 2 que utilizaron trifluoroetanol, donde a pesar de obtener 0,62 mg y 0,89 mg de proteína total respectivamente, permitieron identificar en promedio 18 proteínas más que el protocolo 5.

Por otro lado, los resultados demostraron que desmineralizar la matriz ósea con ácido trifluoroacético al 10%, no es un punto crítico para lograr la extracción de las proteínas, ya que con los protocolos donde no se aplicó este paso previo

(protocolo 1 y protocolo 5), se obtuvo una mayor cantidad de proteínas totales que para aquellos protocolos donde se incluyó una fase de desmineralización, tales como los protocolos 3 y 4. El rendimiento de la extracción de las proteínas no sólo depende de la desmineralización, sino que además, de los procedimientos físicos aplicados, como la temperatura, y de las propiedades de los reactivos contemplados en los distintos protocolos (Bhat et al., 2018).

En este sentido, el efecto de la desmineralización en el proceso de extracción pudo ser observado tras comparar los resultados obtenidos en el protocolo 1 y en el protocolo 2, para los cuales se emplearon los mismos reactivos y procedimientos, diferenciándose exclusivamente en la aplicación de una fase previa de desmineralización de la matriz ósea, la que sólo fue contemplada en el caso del protocolo 2. Los resultados evidenciaron que a pesar de que la desmineralización posibilita extraer una mayor cantidad de proteínas totales (0,89 mg versus 0,62 mg), la integridad de estas proteínas se ve comprometida luego ser sometidas a un medio ácido por un periodo de 16 hrs. Lo cual se evidenció de manera cualitativa en la reducción de bandas en el gel de SDS-Page para el protocolo 2 en comparación con el protocolo 1, sobre todo en aquellas bandas de menor peso molecular. Asimismo, la mayor degradación inducida por el protocolo 2, significó un menor número de proteínas identificadas con 12 proteínas menos que en el protocolo 1. Se han reportado protocolos que extraen proteínas sin la necesidad de desmineralizar el tejido, alcanzando una buena cobertura del proteoma mediante espectrometría de masas y evitando, además,

daños colaterales de la desmineralización como la hidrólisis de las proteínas (Cleland & Vashishth, 2012).

Los datos obtenidos, permitieron comparar los distintos protocolos en términos de integridad y rendimiento. Si bien la desmineralización da acceso a una mayor cantidad de proteínas, se reduce la capacidad de identificación, por lo que se debe optar por protocolos que no generen mayores daños a las proteínas.

Considerando lo anterior, el protocolo 1 permitió obtener altos rendimientos de extracción e identificación de proteínas. Así como también, acceder a una mayor diversidad de proteínas en cuanto a funciones celulares. Estos resultados son indicativos de que el uso del trifluoroetanol y de los distintos procedimientos que se incluyen en este protocolo, son efectivos para lograr una extracción e identificación de proteínas procedentes de distintos compartimientos celulares y no sólo del citoesqueleto, como se podría pensar en una primera instancia, al no ser un protocolo que recurre a una fase de desmineralización.

El buen rendimiento obtenido por este protocolo podría explicarse debido a las características del trifluoroetanol, un solvente orgánico con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, que es efectivo para unir residuos de aminoácidos polares y no polares. El trifluoroetanol promueve la formación de estructuras α -helicoidales al estabilizar las interacciones de enlaces de hidrógeno entre los residuos de aminoácidos. También es capaz de desnaturalizar las proteínas al interrumpir las interacciones hidrofóbicas entre los residuos de aminoácidos no polares,

haciéndolos más solubles en el solvente polar y exponiendo las regiones hidrofóbicas de la proteína al solvente. (Deshusses et al., 2003; Hossain et al, 2022).

El efecto caotrópico de este reactivo podría ser clave para permitir la extracción de proteínas sin la necesidad de pasos adicionales de desmineralización, ya que liberaría las proteínas de la matriz ósea al interrumpir las interacciones proteína-proteína y proteína-matriz. Además, los procedimientos físicos de elevación y disminución de la temperatura aplicados en el protocolo contribuyeron a desestabilizar la estructura de las proteínas, posibilitando su posterior solubilización sin afectar en gran medida su integridad para los análisis posteriores.

La aplicación del TFE como método de extracción de proteínas óseas aquí propuesto, supone una gran ventaja no sólo porque permite la extracción e identificación de distintas proteínas, sino porque además se reducen los tiempos de extracción. Mientras que en este protocolo la extracción de las proteínas se logra en menos de una hora, los otros protocolos tardan días en ejecutarse. Esto es beneficioso para aplicaciones forenses, donde se requieren resultados oportunos para la toma de decisiones en investigaciones. Asimismo, este protocolo no requiere de procesos de limpieza posteriores como en el caso de sales o detergentes que pueden interferir en el análisis de LC-MS/MS,

metodología que demanda de métodos de extracción limpios y eficientes obtener datos de alta calidad (Cleland et al., 2012).

En otro ámbito, el protocolo 1 demostró ser eficiente en la extracción e identificación de proteínas de una muestra de prueba humana, lo que indica que es factible de aplicar en restos óseos de larga data post mortem. Como resultado del proceso de estandarización de protocolos para la extracción proteica en restos óseos, se concluyó que el protocolo 1 ofreció los mejores resultados y, por lo tanto, fue seleccionado como el método a seguir para la extracción de proteínas en las muestras de interés en la presente investigación. Los resultados obtenidos también sugieren que este protocolo podría ser un procedimiento prometedor para futuros estudios en el área.

Tras replicar el protocolo de extracción en las 25 muestras de tejido cortical humano, en general, se logró extraer una mayor cantidad total de proteínas en muestras tempranas con un IPM < 1 año, que en aquellas muestras tardías cuyos IPMs corresponden a 15 y 20 años. Para estas últimas, no se observaron diferencias sustanciales en la cantidad de proteínas extraídas según el hueso de procedencia (costillas y tibias) ni por intervalo post mortem (IPM=15 e IPM=20 años).

Resultados similares se obtuvieron luego del análisis por LC-MS/MS, en donde la identificación de proteínas nuevamente fue significativamente mayor en muestras tempranas. En tanto, muestras tardías no exhiben diferencias

significativas entre sí en cuanto a la data de muerte, identificando un número similar de proteínas entre aquellas muestras con IPM=15 y muestras con IPM=20 años. La mayor cantidad de proteínas totales extraídas y de número de proteínas identificadas en muestras tempranas frente a muestras tardías, resulta esperable considerando que las muestras tempranas proceden de individuos aún en fase cadavérica, donde la presencia de tejidos blandos podría proteger a las proteínas de la hidrólisis producto de factores exógenos (Procopio et al., 2021). Asimismo, el avance de la descomposición cadavérica conduce a una degradación generalizada del organismo, por lo que a mayor data de muerte existirá una mayor degradación y, por tanto, una menor disponibilidad de estructuras de análisis (Lee Goof, 2009).

Por otro lado, se observó una variación en el número de proteínas identificadas según el tipo de hueso, ya que en las muestras de costillas se identificó un mayor número de proteínas que en muestras de tibia para un mismo intervalo *post mortem*, existiendo inclusive diferencias significativas entre muestras de costillas y muestras de tibias con IPM=15 años. Lo anterior se genera aun cuando las muestras analizadas de costillas y tibias en intervalos *post mortem* tardíos proceden de un mismo individuo respectivamente.

En particular, las proteínas identificadas en las 25 muestras corresponden a 132 diferentes proteínas, varias de la cuales pertenecen a las agrupaciones de proteínas clásicamente asociadas a la matriz ósea, como proteoglicanos,

proteínas con el tripéptido RGD, factores de crecimiento, entre otros. A pesar de que esta cifra supone un número muy por debajo de lo que se acostumbra a identificar mediante la técnica de LC-MS/MS en otros tipos de tejidos, es concordante con el número de proteínas extraídas desde muestras óseas humanas para otros estudios en el área, como el de Bonicelli y cols. (2022a) con 90 proteínas identificadas, Mickleburgh y cols. (2021) con 133 proteínas identificadas y Prieto-Bonete y cols. (2019) que pudieron identificar un total de 275 proteínas.

Del global de proteínas identificadas, fue necesario establecer proteínas representativas para cada IPM definido, con la finalidad de que en función de un grupo selecto de proteínas, se proporcionase información relevante sobre la dinámica del proteoma óseo conforme aumenta el intervalo *post mortem*. Para ello se identificaron las proteínas comunes entre réplicas biológicas e intervalos *post mortem*, seleccionando un total de 22 proteínas cuyas funciones se vinculan mayoritariamente al mecanismo de transducción de señales y al citoesqueleto.

En particular, entre el listado se encuentran proteínas estructurales propias del hueso como el colágeno tipo I en con sus dos subunidades (CO1A1 y CO1A2) y el colágeno tipo III (CO3A1). Proteínas séricas, entre ellas la albúmina (ALBU) que se acumula en hueso mineralizado dada su gran afinidad a la hidroxapatita (Alves et al., 2011); la Alfa-2-HS-glicoproteína (FETUA) que tiene afinidad por los iones de calcio y bario y se ha señalado que participa en la regulación de la

mineralización ósea al inhibir la osteogénesis (Bourebaba & Marycz, 2019); las subunidades alfa y beta de la hemoglobina (HBA y HBB) que se ha indicado como una proteína abundante en el tejido óseo (Kim et al., 2013); y la protrombina (THRB), para la cual estudios han reportado que es sintetizada y procesada proteolíticamente en el hueso, participando en la generación del tejido óseo en estrecha asociación con los osteoclastos (Karlström et al., 2011).

Proteínas ubicuas como las histonas (H10, H12 y H14) que posiblemente derivan de la médula ósea o de la circulación sanguínea (Alves et al., 2013). También, se incluyen proteínas como el biglicano (PGS1) que es un proteoglicano rico en leucina involucrado en el ensamblaje de las fibras de colágeno y que se ha correlacionado previamente con el IPM (Bonicelli et al., 2022a; Procopio et al., 2018); el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3P) involucrado en el metabolismo de la glucosa (Chaves et al., 2012), y la semenogelina-1 (SEMG1) que, si bien cumple funciones asociadas a la motilidad de los espermatozoides, se ha señalado que este tipo de proteínas podrían estar presentes en la matriz extracelular ósea, ya que esta contiene una amplia gama de proteínas que no sólo desempeñan funciones cruciales para la formación y mantención del tejido óseo, sino que también tienen roles metabólicos y endocrinos asociados a la fertilidad masculina como es el caso de la osteocalcina, una proteína ampliamente difundida en la matriz extracelular ósea (Alves et al., 2011; Karsenty & Oury, 2014).

A su vez, se identificaron otras proteínas estructurales que no son propias del tejido óseo como las queratinas (K1C10, K1C13, K2C1 y K2C4), pero que han sido reportadas en extracciones de tejido óseo trabecular a partir de muestras de fémur, posiblemente derivadas de la lámina basal (Habuka et al., 2015; Uhlén et al., 2015).

Por último, dentro del listado se incorporan proteínas como la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5), y otras tres proteínas de unión a iones de calcio (S10A8, S10A9 y S10AB), siendo estas últimas, por primera vez reportadas en las investigaciones del área, y cuya función probablemente sea el factor que les confiere afinidad por la matriz mineral.

De las 22 proteínas señaladas anteriormente, se identificó que FABP5, H10, H12, H14, HBA, HBB y S10AB corresponden a proteínas exclusivas de IPM tempranos (IPM<1 año). Que se caracterizan por cumplir funciones asociadas a la estructura y dinámica de la cromatina, así como también a la producción y conversión de energía. En tanto, las proteínas ALBU, CO1A1, CO1A2, FETUA, K1C13, K2C1, K2C4, S10A8, SEMG1 y THRB, son proteínas que perduran hasta IPMs tardíos (IPM=15 e IPM=20 años), y cuyas funciones estarán vinculadas principalmente al citoesqueleto y al mecanismo de transducción de señales. Prieto-Bonete y cols. (2019), ya habrían observado que las proteínas que perduran en IPM mayores a 12 años serían principalmente aquellas del tipo estructural, en tanto, proteínas séricas sólo se limitarían a IPMs tempranos, que para dicho estudio

correspondían a muestras con datas de muerte menores a 12 años. En la presente investigación, reportamos que proteínas estructurales son identificables aún en intervalos de hasta 20 años *post mortem*.

Los análisis posteriores sobre las características de estas proteínas revelaron que las proteínas más estables a la degradación *post mortem* son aquellas que presentan una mayor masa molecular, puesto que las 10 proteínas identificadas como propias de IPMs tardíos, tienen un peso molecular significativamente mayor al de proteínas que sólo se encuentran en IPMs tempranos. Datos que apoyan lo planteado por Prieto-Bonete y cols. (2019), quienes también observaron un mayor peso molecular en proteínas que perduran por larga data, por lo que es posible sugerir que la estructura molecular es un factor clave para la preservación *post mortem* de las proteínas.

Por otro lado, se ha propuesto que las proteínas básicas se ven mayormente afectadas por la degradación *post mortem* que aquellas proteínas del tipo ácidas (Prieto-Bonete et al., 2019). Lo cual se ha intentado explicar en función a la vinculación de las proteínas con la hidroxiapatita y su posible efecto retardante de los procesos hidrolíticos *post mortem* en el proteoma. En este sentido, los grupos ácidos y básicos juegan un rol crucial en la interacción entre proteínas y la hidroxiapatita, ya que, en el caso de las proteínas básicas, estas requieren de la presencia de una alta densidad de grupos cargados positivamente para unirse firmemente a la hidroxiapatita. A diferencia de lo que ocurre con proteínas ácidas

que interaccionan con los iones cargados positivamente en la superficie de los cristales de hidroxiapatita (Gorbunoff, 1984).

En este trabajo, se encontró que las proteínas de IPMs tempranos presentan secuencias enriquecidas en aminoácidos básicos, con una proporción significativamente mayor de residuos básicos que el observado en las proteínas de IPMs tardíos. En tanto, las proteínas de IPMs tardíos presentan alrededor de un 4% más de aminoácidos ácidos en su estructura primaria respecto al de proteínas de IPMs tempranas, diferencia que arrojó ser estadísticamente significativa. Resultados que son compatibles con lo observado por Prieto-Bonete y cols. (2019), quienes señalan que las proteínas identificadas en IPM<12 años tienen una mayor cantidad de aminoácidos ácidos y neutros, mientras que proteínas presentes en IPM<12 años tienen una mayor proporción de aminoácidos básicos por sobre los ácidos, más en el estudio no se detallan los valores observados ni si las diferencias encontradas son o no significativas.

Dado lo anterior, pareciera ser que las proteínas en cuyas secuencias aminoacídicas predominan los residuos básicos por sobre los ácidos se degradan más rápido, mientras que las proteínas mejor preservadas durante tiempos *post mortem* prolongados, corresponden a aquellas en las que la proporción de residuos ácidos y básicos es similar. Asumiendo los aminoácidos del tipo ácido, un rol clave para las proteínas identificadas en IPMs de larga data, ya que estos residuos estarían directamente relacionados con la mineralización de los cristales

de hidroxapatita, y por ello, las proteínas con un mayor nivel de residuos ácidos tendrían una mejor afinidad con la matriz inorgánica, lo que a la larga las protegerían de la acción hidrolítica (Duanis-Assaf et al., 2022; Prieto-Bonete et al., 2019).

Ahora bien, considerando que recientemente los estudios proteómicos para la estimación de IPM en muestras óseas han incorporado análisis de reducción de dimensionalidad, como una forma de identificar patrones y relaciones entre las muestras de acuerdo con la diversidad (presencia o ausencia) de las proteínas (análisis de correspondencia múltiple, MCA), y en función de su abundancia relativa (análisis de componentes principales, PCA) (Bonicelli et al., 2022a; Prieto-Bonete et al., 2019; Procopio et al., 2018; Procopio et al., 2021). Estas metodologías de análisis fueron aplicadas sobre las 22 proteínas que se delimitaron como representativas para cada IPM.

Los resultados de estos análisis demostraron que la dinámica del proteoma en términos de diversidad y de abundancia proteica, permiten realizar agrupaciones parciales cuando se evalúa la data de muerte, ya que sólo las muestras del IPM<1 año forman un conglomerado único y apartado de los otros IPM, no siendo posible divisar grupos claramente diferenciados entre muestras de IPM=15 e IPM=20 años.

A partir del análisis de MCA, que fue capaz de explicar el 58,4% de la varianza, se identificó a las proteínas H10, H12, H14, S10AB, HBB, HBA y FABP5, como

proteínas diferenciadoras entre muestras pertenecientes a intervalos *post mortem* tempranos (IPM<1 año) e intervalos *post mortem* tardíos (IPM=15 e IPM=20 años). Dichas proteínas, en específico para aquellas que son del tipo ubicuas (histonas) y séricas (hemoglobina), se ha descrito que se degradan rápidamente con el aumento del IPM asociadas a los periodos de degradación de tejidos adyacentes como los músculos (Bonicelli et al., 2022a; Pittner et al., 2020). En particular, el estudio de Procopio y cols. (2018) reveló que proteínas como la hemoglobina se descomponen durante los primeros 2 a 4 meses *post mortem* en muestras de tibias de cerdo, no siendo posible su hallazgo en muestras mayores a un año. Lo que ya había sido enunciado previamente por Procopio y cols. (2017), quienes señalaron que en muestras con un IPM igual a un año, la identificación de proteínas del tipo sanguínea es reducida.

Resultados similares se obtuvieron en el análisis de PCA, sin embargo, en esta ocasión la asociación entre la abundancia relativa y el IPM sólo explicaría cerca del 38% de la varianza, tanto cuando se analizan las intensidades generadas por los péptidos trípticos como por semitrípticos. En este caso, las abundancias de las proteínas H14, HBB, S10AB y FABP5, son las que más se relacionan con la primera dimensión que retiene el 20,3% de la varianza, constituyendo las proteínas que aportan la mayor varianza al modelo en el caso del análisis por péptidos trípticos. En tanto, en los análisis sobre péptidos semitrípticos son otras las proteínas que mostraron una mayor relación con la primera dimensión, que

explica el 26,5% de la varianza, siendo estas nuevamente H14, HBB y S10AB, pero acompañadas de K1C13, SEMG1 y K1C10.

Resulta esperable que para los análisis de PCA nuevamente se identifique a las proteínas H14, HBB, S10AB y FABP5 como proteínas cuyas abundancias aportan mayor variabilidad al perfil proteómico, ya que estas proteínas desaparecen en el paso de IPMs tempranos a IPMs tardíos. Por otro lado, las proteínas K1C13, K1C10 y SEMG1, son proteínas que se encuentran presentes en muestras con IPM<1, IPM=15 e IPM=20 años, por lo que sus cambios de abundancia estarían reflejando diferencias en el perfil proteómico a lo largo del periodo *post mortem*.

Es importante destacar que lo anterior sólo fue identificado cuando se analizaron las abundancias en base a la corrida semitrípica. Modalidad que además permitió diferenciar de mejor forma las muestras del IPM>1 año respecto a las de IPM=15 e IPM=20. Asimismo, aunque en ambos análisis no fue posible establecer conglomerados totalmente diferenciados entre muestras tardías, bajo la modalidad semitrípica y sólo para las muestras provenientes de costillas, aquellas muestras con IPM=20 años se agruparon próximas al punto de origen, mientras que las muestras con IPM=15 se dispersan alrededor de las primeras, lo que podría suponer que existe una mayor variabilidad en la abundancia entre las muestras que componen el grupo de IPM=15, que para las del IPM=20 años.

Pese a lo anterior, tanto en los análisis de MCA y PCA (tríptico y semitríptico), se observó que las muestras exhiben agrupaciones según el tipo de hueso del cual proceden, diferenciándose expresamente las muestras de costillas respecto a las de tibias. Sumando gracias a este trabajo, un nuevo antecedente a la afirmación de que el perfil proteómico varía según el tipo de hueso que se esté analizando (Mickleburgh et al., 2021; Procopio et al., 2017). Probablemente, tal como se ha señalado en ocasiones anteriores, las variaciones en términos de diversidad y abundancia del proteoma se deban a características intrínsecas de cada hueso, las cuales condicionarían tanto el tipo de proteínas presentes como su preservación.

Las costillas humanas, al ser huesos planos, tienen un nivel de tejido cortical considerablemente menor que los huesos largos, como es el caso de las tibias. Además, existe una estrecha relación entre el tejido cortical y el trabecular (White & Folkens, 2005). Aunque este estudio se basó en muestras de tejido cortical, la mayor proporción de tejido trabecular presente en las costillas podría haber influido en el tipo de proteínas identificadas en las muestras. De hecho, se reportó la presencia de histonas en esta investigación, las cuales solo se han identificado en estudios que utilizaron muestras que contienen tejido trabecular, como en el caso de Bonicelli y cols. (2022a), quienes realizaron cortes en la sección transversal de la diáfisis femoral, y Alves y cols. (2011), que utilizaron muestras de la epífisis proximal del fémur. En este mismo sentido, las costillas y las tibias presentan diferencias en porosidad y perfusión sanguínea, siendo las costillas

más porosas debido a su mayor proporción de tejido esponjoso. Estos factores son conocidos por influir en la variedad, abundancia y preservación del proteoma (Mickleburgh et al., 2021).

Una matriz menos densa, como es el caso de las costillas, promueve el movimiento de microorganismos descomponedores (Mickleburgh et al., 2021), mientras que huesos con alto contenido cortical, como las tibias, demuestran una menor filtración microbiana (Emmons et al., 2020). Asimismo, estudios sobre la caracterización del microbioma óseo humano en restos descompuestos, señalan que la mayor riqueza de microorganismo se encuentra en el tronco superior e inferior del cuerpo (tórax, abdomen y pelvis) (Emmons et al., 2020). Por ende, los efectos de la acción bacteriana, principalmente endógena, también podrían ser un factor en la expresión de un proteoma diferencial entre muestras de costillas y tibias.

Cabe señalar que en el MCA y PCA, las muestras de costillas tendieron a agruparse entre sí, a pesar de que sólo para las muestras cadavéricas las extracciones se realizaron desde el mismo número de pieza ósea (cuarta costilla izquierda), mientras que en muestras esqueletizadas, estas se obtuvieron desde la cuarta hasta la séptima costilla. Lo anterior, indicaría que en general las costillas demostraron una buena reproducibilidad sin importar el número de la pieza ósea desde el cual se toma la muestra, lo que resulta provechoso si se considera que la preservación de restos óseos depende de distintos factores

tafonómicos, por lo que limitar la datación a una pieza ósea en específico sería contraproducente en caso de que dicha pieza esté ausente (Rodríguez, 2004).

Dado que los resultados de los análisis estadísticos multivariados no generaron conglomerados claramente diferenciados entre muestras tardías y que el perfil proteómico es hueso dependiente, se evaluaron los cambios en la abundancia relativa de proteínas que se preservan durante cada uno de tiempos *post mortem* en estudio para cada pieza ósea. De esta manera, se identificaron 14 proteínas cuyos datos de abundancia están disponibles en los tres intervalos *post mortem* medidos en muestras de costillas (IPM<1 año, IPM=15 e IPM=20 años) y 9 proteínas con valores de abundancia en los dos IPM tardíos donde se analizaron muestras de tibia (IPM=15 e IPM=20 años).

Para ambos casos se ejecutaron análisis considerando las abundancias relativas derivadas de las intensidades de péptidos trípticos y semitrípticos, encontrando que para muestras de costillas las proteínas ALBU, G3P, PIP, S10A9, K1C10, K1C13, K2C1 y K2C4, demuestran una clara disminución conforme se incrementa la data de muerte, con diferencias significativas principalmente entre tiempos *post mortem* tempranos (IPM<1) y tiempos *post mortem* tardíos (IPM=15 e IPM=20).

De estas proteínas, estudios previos ya han señalado el potencial de la albúmina y del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para la datación de restos óseos, dada su disminución progresiva y significativa conforme aumenta el IPM, que en

el caso de la albúmina se reportó en muestras de cerdo con IPMs de 1 a 6 meses y en muestras humanas con IPMs de 1 a 37 años (Bonicelli et al., 2022a; Procopio et al., 2018), en tanto para G3P la correlación negativa entre abundancia e IPM ha sido reportada tanto en tejido óseo como tejido muscular (Bonicelli et al., 2022a; Choi et al., 2019; Lee et al., 2016). Por lo que los resultados de la presente investigación reafirman la aplicabilidad de ambas proteínas como posibles biomarcadores para la estimación del IPM.

Por su parte, la proteína inducible por prolactina (PIP) es una glicoproteína presente en el plasma seminal que se vincula a funciones del sistema inmunológico y reproductivo (Hassan et al., 2009), y de la cual no se tienen reportes en investigaciones anteriores del área, por lo que se debe indagar sobre su asociación con la matriz ósea y su potencial uso en la estimación del IPM.

Asimismo, es la primera vez que se reporta la proteína S100-A9 (S10A9) en estudios de datación humana. Los resultados aquí obtenidos posicionan a esta proteína como un buen candidato para la estimación del IPM en restos óseos, ya que su presencia en muestras de tejido cortical podría estar relacionada con su capacidad de unir iones de calcio, propiedad que le permitiría formar complejos entre los residuos cargados negativamente de su estructura y los iones de calcio presentes en la hidroxiapatita (Gorbunoff & Timasheff, 1984). Afinidad por la matriz mineral que podría actuar como retardante de la degradación gracias al impedimento físico que suponen los cristales de hidroxiapatita para la acción de

enzimas hidrolíticas (Collins et al., 2002). Haciendo que esta proteína se preserve por largos períodos *post mortem*, lo que supone una ventaja al momento de evaluar el decaimiento de esta proteína y su posible aplicabilidad en la estimación de IPM tardíos. Queda por tanto pendiente establecer claramente el posible nexo entre dicha proteína y la matriz mineral, así como también, evaluar si estudios futuros obtienen conclusiones similares.

Por su parte, los datos también indican que las queratinas K1C10, K1C13, K2C1 y K2C4 pueden ser buenos candidatos como estimadores de IPM. A pesar de que estas proteínas tradicionalmente son descartadas por ser consideradas como resultado de la contaminación por manipulación, la probabilidad de que en este estudio absolutamente todas las muestras hayan sido contaminadas y aun así demuestren disminuciones significativas conforme aumenta el IPM, es muy baja. Por lo que más bien, su presencia en estas y otras muestras de tejido óseo (Uhlén et al., 2015; Habuka et al., 2015), se podría vincular, por un lado, con el nexo entre el hueso y otras estructuras corporales como tendones, cartílagos, ligamentos, fascias, músculos, vasos y arterias sanguíneas, que si expresan este tipo de proteínas (Huitfeldt & Brandtzaeg, 1985; Ho et al., 2022; Miettinen & Fetsch, 2000; Sekiya et al., 2002). O bien, producto de la histología y fisiología propia del hueso en cuanto procesos de osificación y de poblaciones celulares acorde a las funciones metabólicas del hueso (Sekiya et al., 2002). Por lo que se sugiere precaución al momento de investigar con más detalle estos posibles marcadores.

Por otro lado, los análisis del cambio en la abundancia relativa de proteínas identificadas en restos de tibias a IPMs de 15 y 20 años, muestran que nuevamente las queratinas K1C13 y K2C4 disminuyen de manera progresiva con el aumento del IPM, expresando diferencias significativas sólo en el análisis en base a péptidos semitrípticos para K1C13.

No obstante, al comparar los dos tiempos *post mortem* medidos en este hueso se observa que en general, las abundancias de las 7 proteínas restantes son mayores en el intervalo post mortem de 20 años que en el de 15, a pesar de que, en muestras de costillas estas mismas proteínas demostraron una disminución progresiva conforme aumenta el IPM.

La mayor abundancia relativa en los IPM más tardíos de ciertas proteínas se ha reportado en otros estudios, por ejemplo, Procopio y cols. (2018) indican que proteínas como miosina-2 (MYH2), beta enolasa (ENOB), miosina-6 (MYH6), creatina quinasa tipo M (KCRM) y haptoglobina (HPT), tienen una mayor abundancia en muestras de 6 meses que en las de 4 meses *post mortem*, a pesar de que previamente habían disminuido en el paso de 1 a 2 meses y de 2 a 4 meses. Sin embargo, la causa de este contradictorio “aumento” *post mortem*, que más bien debe referirse como una mayor abundancia relativa en la cantidad de una proteína determinada, a menudo se define como desconocida (Zissler et al., 2020).

Urge evaluar si los patrones de abundancias observados en muestras de tibia en comparación de muestras de costillas podrían atribuirse a diferencias específicas de tejido. O si lo anterior corresponde a un problema metodológico de la técnica de LC-MS/MS, derivado del potencial impacto de la fragmentación de péptidos en las mediciones de abundancia de proteínas en el contexto de la degradación de proteínas, en donde la mayor detección de péptidos degradados, que puede resultar en iones más fragmentados, podría estar siendo interpretada erróneamente como una mayor abundancia de la proteína correspondiente.

Dado lo anterior, las costillas demostraron ser un buen candidato para estudios tafonómicos de degradación proteica, ya que por un lado el proteoma de estos huesos reflejó seguir una disminución progresiva y significativa en su abundancia conforme se incrementa el IPM. Al mismo tiempo que en términos prácticos es más factible la extracción de esta pieza ósea a distintos IPMs, ya sean tempranos o tardíos.

En función de los distintos análisis y resultados aquí obtenidos, es plausible aceptar la hipótesis planteada donde se señala que la dinámica del proteoma de osamentas humanas, en términos de diversidad y abundancia, proporciona información relevante para la estimación del intervalo *post mortem* en individuos esqueletizados, aportando en la identificación de potenciales marcadores proteicos para la estimación de la data de muerte en restos óseos humanos.

La información derivada de este trabajo exploratorio no sólo pone a disposición mayores antecedentes sobre el curso que sigue la degradación *post mortem* del proteoma bajo nuevas condiciones de depósito y piezas de análisis, sino que también, los patrones observados en los análisis de diversidad y abundancia proporcionan grupos proteicos que pudiesen tener un buen desempeño al momento de estimar la data de muerte a distintos IPM. Al mismo tiempo que se perfilan candidatos proteicos para trabajos futuros en post de la estandarización de biomarcadores para la estimación del IPM tardío. De igual modo, las características de las proteínas observadas en este estudio entregan antecedentes para comprender los factores que podrían estar generando una preservación diferencial del proteoma, resultando de suma importancia indagar en profundidad sobre las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas que pudiesen tener aplicaciones en la estimación del intervalo *post mortem*.

Por otro lado, el presente estudio supone el puntapié inicial para el desarrollo de nuevas investigaciones sobre datación humana a nivel nacional, abriendo campos de acción tanto para la antropología física como la biología molecular. Aplicación que demanda la integración teórica y práctica de diversas disciplinas, y que, para este estudio en particular, la interdisciplinariedad fue un factor clave en su ejecución. Asimismo, el uso de tecnología de vanguardia permitió desarrollar una investigación equiparable a las metodologías seguidas por estudios internacionales en tafonomía forense, en donde cada vez toma más fuerza el uso de las ciencias ómicas con un enfoque integrado para fines

forenses, área que ha sido denominada por Bonicelli y cols. (2022b) como “ForensOMICS”, y que podría perfectamente expandirse en las instituciones científicas de la región.

Gracias a lo anterior, se pudo explorar la degradación del proteoma óseo en individuos contemporáneos bajo condiciones propias del contexto nacional, lo que proporciona información de gran utilidad de cara al futuro desarrollo de estrategias para la datación humana de restos óseos y su aplicación en casos forenses actuales del país.

Como consideraciones generales, es importante tener en cuenta que los estudios sobre descomposición humana se encuentran limitados en términos de tamaño muestral (Pittner et al., 2020). En particular para las investigaciones del intervalo *post mortem* tardío, la disponibilidad de muestras óseas tanto antes como después de la descomposición, es muy restringida y supone un gran proceso burocrático para su obtención debido a consideraciones prácticas y éticas, por lo que el reducido tamaño muestral de esta investigación es consistente con el número que generalmente se utilizan en estudios de esta naturaleza (Bonicelli et al., 2022b).

Actualmente, los restos provenientes de contextos fúnebres se presentan como una buena alternativa para llevar a cabo estudios de datación humana (Pérez-Martínez et al., 2017; Prieto-Bonete et al., 2019; Bonicelli et al., 2022a). En el caso de la legislación chilena, los artículos 146 del Decreto 725 (1968) y Artículo

38 del Decreto Supremo 357 (1970) facultan a las instituciones universitarias al uso y/o disposición de cadáveres y osamentas humanas para fines de investigación científica. Si bien lo anterior permite que la comunidad científica acceda a restos humanos *post mortem*, aún no existen pautas claras respecto a los procedimientos y requerimientos en específico que esta clase de investigaciones demanda. Por lo que es indispensable trabajar en el desarrollo de guías estandarizadas que velen por la seguridad e integridad de los restos humanos y de quienes les manipulan (Squires y García-Mancuso, 2021).

Cabe destacar igualmente que el tejido óseo es uno de los tejidos más pobremente caracterizados en proteómica, debido principalmente a cuestiones metodológicas del proceso de extracción. Por ejemplo, que existan proteínas que no son aptas para la digestión con tripsina, o proteínas que producen péptidos trípticos que son difíciles de ionizar y que quedan fuera del rango de detección del espectrómetro de masas (Bell et al., 2019).

Los estudios para caracterizar el proteoma humano hacen uso exclusivo de la tripsina en el proceso de digestión, a pesar de que se conoce que las proteínas de unión a hidroxapatita son ricas en residuos ácidos, por lo que en futuras investigaciones podrían utilizarse de manera combinada proteasas alternativas, como GluC y AspN que son útiles para identificar péptidos específicos de proteínas óseas, tal como lo sugiere el estudio de Bell y cols. (2019), quienes mediante el uso de múltiples proteasas (tripsina, LisargiNasa, GluC y AspN) y el

análisis de las diversas fracciones generadas en el proceso de extracción, logran identificar un total de 2625 proteínas a partir de muestras de tejido alveolar de hueso mandibular, cifra que podría estar influenciada por la ubicación anatómica y las características específicas de ese tipo de tejido, variables que se ha demostrado tienen influencia en el perfil proteómico (Mickleburgh et al., 2021; Procopio et al., 2017).

A su vez, es posible señalar que la corrida semitriptica podría estar reflejando de mejor manera el curso que sigue la degradación del proteoma en restos óseos, ya que, en base a los resultados de PCA, esta corrida permite generar agrupaciones más claras entre las muestras a distintos intervalos *post mortem*. Lo que, sumado al mayor número de proteínas identificadas bajo esta modalidad en los análisis iniciales para el global de las muestras, indicaría que los análisis sobre péptidos semitripticos aportan información clave para comprender la dinámica del proteoma en muestras con IPM tardíos, por lo que se sugiere que los próximos trabajos en el área consideren incluirlos en sus análisis y no se limiten sólo al uso de péptidos tripticos.

Por último, aumentar el tamaño muestral, las condiciones de depósito y los tiempos *post mortem* evaluados, es crucial para una comprensión más acurada de los cambios en el proteoma óseo tras la muerte de un individuo y su correlación con el intervalo *post mortem*. Lo anterior, supone una de las principales limitaciones del presente estudio, lo que se suma a la falta de información en

torno al tipo de suelo en el cual fueron inhumados los cuerpos, para con ello, evaluar la influencia de factores como el pH, la humedad y la temperatura; datos sobre las características ante mortem de los individuos como el peso y patologías previas, que se ha informado tienen una influencia en el proteoma óseo. Todos estos factores quedaron fuera del alcance de esta investigación.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio suponen un gran avance en el área forense molecular de nuestro país, y tributan con información relevante para el futuro desarrollo de metodologías de estimación del intervalo *post mortem* en osamentas humanas.

7. CONCLUSIÓN

I. Las muestras con IPMs tempranos tienen una riqueza proteómica mayor que muestras esquelizadas, tanto a nivel de diversidad como de abundancias.

II. Las proteínas más estables a la degradación *post mortem* son aquellas que tienen una mayor masa molecular y cuyas propiedades fisicoquímicas posibiliten una mayor afinidad por la matriz mineral ósea, ya que esta asociación podría actuar como una barrera protectora contra la degradación.

III. La dinámica del proteoma óseo es hueso específico, siendo este influenciado por las características intrínsecas de cada pieza ósea en términos de estructura y composición. Para lo cual las costillas se constituyen como una pieza ósea predilecta en futuros estudios y aplicaciones de datación humana.

IV. Los análisis de estadística multivariada fueron capaces de diferenciar principalmente entre muestras de IPM tempranos (IPM<1 año) e IPM tardíos (IPM=15 e IPM=20 años), para lo cual las proteínas H10, H12, H14, S10AB, HBB, HBA y FABP5 se constituyen como proteínas discriminantes.

V. Los cambios en la abundancia del proteoma de costillas demuestran que las proteínas se degradan conforme aumenta el IPM, reducción que es significativa cuando se compara IPM tempranos versus los tardíos. Siendo ALBU, G3P, S10A9, K1C10, K1C13, K2C1 y K2C4 proteínas con un gran potencial para medir la degradación proteica con fines de datación humana.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, B., & Konigsberg, L. (2004). Estimation of the most likely number of individuals from commingled human skeletal remains. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 125(2), 138-151. DOI: 10.1002/ajpa.10381.
- Alves, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., van der Eerden, B., Verhaar, J., Eijken, M., & van Leeuwen, J. (2011). Unraveling the human bone microenvironment beyond the classical extracellular matrix proteins: a human bone protein library. *Journal of proteome research*, 10(10), 4725-4733. DOI: 10.1021/pr200522n
- Amendt, J., Richards, C., Campobasso, C., Zehner, R., & Hall, M. (2011). Forensic entomology: Applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7(4), 379-392. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9209-2>
- Bai, B., Tan, H., Pagala, V. R., High, A. A., Ichhaporia, V. P., Hendershot, L., & Peng, J. (2017). Deep profiling of proteome and phosphoproteome by isobaric labeling, extensive liquid chromatography, and mass spectrometry. In *Methods in enzymology* (Vol. 585, pp. 377-395). Academic Press. DOI: 10.1016/bs.mie.2016.10.007
- Beck, S., Michalski, A., Raether, O., Lubeck, M., Kaspar, S., Goedecke, N., ... & Mann, M. (2015). The impact II, a very high-resolution quadrupole time-of-flight instrument (QTOF) for deep shotgun proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(7), 2014-2029. DOI: 10.1074/mcp.M114.047407
- Behrensmeyer, A. (1978). Taphonomic and ecologic information from bone weathering. *Paleobiology*, 4(2), 150-162. DOI: 10.1017/S0094837300005820
- Bell, P., Solis, N., Kizhakkedathu, J., Matthew, I., & Overall, C. (2019). Proteomic and N-terminomic TAILS analyses of human alveolar bone proteins: improved protein extraction methodology and LysargiNase digestion strategies increase proteome coverage and missing protein identification. *Journal of proteome research*, 18(12), 4167-4179.

- Berasain, C., & Avila, M. (2014, April). Amphiregulin. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 28, pp. 31-41). Academic Press.
- Bhat, E., Abdalla, M., & Rather, I. (2018). Key factors for successful protein purification and crystallization. *Glob. J. Biotechnol. Biomater. Sci*, 4, 001-007.
- Bonicelli, A., Di Nunzio, A., Di Nunzio, C., & Procopio, N. (2022a). Insights into the differential preservation of bone proteomes in inhumed and entombed cadavers from Italian forensic caseworks. *Journal of Proteome Research*, 21(5), 1285-1298. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00904>
- Bonicelli, A., Mickleburgh, H., Chighine, A., Locci, E., Wescott, D., & Procopio, N. (2022b). The 'ForensOMICS' approach for postmortem interval estimation from human bone by integrating metabolomics, lipidomics, and proteomics. *Elife*, 11, e83658. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.83658>
- Bourebaba, L., & Marycz, K. (2019). Pathophysiological implication of fetuin-A glycoprotein in the development of metabolic disorders: a concise review. *Journal of Clinical Medicine*, 8(12), 2033. DOI: [10.3390/jcm8122033](https://doi.org/10.3390/jcm8122033)
- Brooks, S., & Suchey, J. (1990). Skeletal age determination based on the os pubis: a comparison of the Acsádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Human evolution*, 5, 227-238.
- Buckley, M. (2019). Proteomics in the Analysis of Forensic, Archaeological, and Paleontological Bone. In *Applications in Forensic Proteomics: Protein Identification and Profiling* (pp. 125-141). American Chemical Society.
- Buikstra, J., & Ubelaker, D. (1994) *Standards for data collection from human skeletal remains*. (Report Number 44). Fayetteville, AR: Arkansas Archaeological Survey. 218 pp.
- Cantalapiedra, C., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular biology and evolution*, 38(12), 5825-5829. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>

- Caruso, V., Marinoni, N., Diella, V., Berna, F., Cantaluppi, M., Mancini, L., ... & Pavese, A. (2020). Bone diagenesis in archaeological and contemporary human remains: an investigation of bone 3D microstructure and mineralochemical assessment. *Archaeological and Anthropological Sciences*, *12*, 1-18.
- Carvalho, M., Cabral, J., da Silva, C., & Vashishth, D. (2021). Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: Creating new bone by mimicking the extracellular matrix. *Polymers*, *13*(7), 1095.
- Catts, E., & Goff, M. (1992). Forensic entomology in criminal investigations. *Annual review of Entomology*, *37*(1), 253-272. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001345>
- Chan, Q. (2018). Cell lysis detergent-free. *Protocols.io*. DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.k79czt6>
- Chaves, V., Frasson, D., Garófalo, M., Navegantes, L., Migliorini, R., & Kettelhut, I. (2012). Increased glyceride–glycerol synthesis in liver and brown adipose tissue of rat: in-vivo contribution of glycolysis and glyceroneogenesis. *Lipids*, *47*, 773-780. DOI: 10.1007/s11745-012-3683-0
- Chellaiah, M., & Hruska, K. (2003). The Integrin α v β 3 and CD44 Regulate the Actions of Osteopontin on Osteoclast Motility. *Calcified Tissue International*, *72*, 197-205.
- Choi, K., Zissler, A., Kim, E., Ehrenfellner, B., Cho, E., Lee, S., ... & Pittner, S. (2019). Postmortem proteomics to discover biomarkers for forensic PMI estimation. *International journal of legal medicine*, *133*, 899-908.
- Chu, X., Jiang, W., Zhang, Z., Yan, Y., Pan, H., Xu, X., & Tang, R. (2011). Unique roles of acidic amino acids in phase transformation of calcium phosphates. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(5), 1151-1157. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp106863q>
- Chung, W., Kwon, K., Song, J., & Lee, S. (2011). Evolutionary screening of collagen-like peptides that nucleate hydroxyapatite crystals. *Langmuir*, *27*(12), 7620-7628. DOI: <https://doi.org/10.1021/la104757g>

- Ciaffi, R., Feola, A., Perfetti, E., Manciocchi, S., Potenza, S., & Marella, G. L. (2018). Overview on the estimation of post mortem interval in forensic anthropology: review of the literature and practical experience. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 26(4), 403-411.
- Cleland, T. & Vashishth, D. (2015). Bone protein extraction without demineralization utilizing principles from hydroxyapatite chromatography. *Anal Biochem*, 472: 62–66. DOI: 10.1016/j.ab.2014.12.006
- Cleland, T., Voegelé, K., & Schweitzer, M. (2012). Empirical evaluation of bone extraction protocols. *PloS one*, 7(2), e31443. DOI: 10.1371/journal.pone.0031443
- Código Penal de la República de Chile. *Diario Oficial de la República de Chile*, Santiago, Chile, 12 de noviembre de 1874.
- Collins, M., Nielsen–Marsh, C., Hiller, J., Smith, C., Roberts, J., Prigodich, R., Wess, T., Csapò, J., Millard, A., y Turner–Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.
- Connor, M., Baigent, C., & Hansen, E. S. (2018). Testing the use of pigs as human proxies in decomposition studies. *Journal of forensic sciences*, 63(5), 1350-1355. DOI: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13727>
- Coulson-Thomas, Y., Coulson-Thomas, V., Norton, A., Gesteira, T., Cavalheiro, R., Meneghetti, M. C., ... & Nader, H. (2015). The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth. *PloS one*, 10(6), e0131105. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131105>
- Cui, Y., & Dong, Y. (2022). ZCCHC12 promotes the progression of osteosarcoma via PI3K/AKT pathway. *Aging (Albany NY)*, 14(18), 7505. DOI: 10.18632/aging.204296
- da Veiga Leprevost, F., Haynes, S. E., Avtonomov, D. M., Chang, H. Y., Shanmugam, A. K., Mellacheruvu, D., ... & Nesvizhskii, A. I. (2020). Philosopher: a versatile toolkit for shotgun proteomics data analysis. *Nature methods*, 17(9), 869-870.

- Damann, F., Williams, D., & Layton, A. (2015). Potential use of bacterial community succession in decaying human bone for estimating postmortem interval. *Journal of forensic sciences*, 60(4), 844-850. DOI: 10.1111/1556-4029.12744
- Daniel J. Stekhoven (2022). missForest: Nonparametric Missing Value Imputation using Random Forest. R package version 1.5.
- Decreto 357. Reglamento General de Cementerios. *Diario Oficial de la República de Chile*, Santiago, Chile, 18 de junio 1970.
- Decreto con Fuerza de Ley 725. Código Sanitario. *Diario Oficial de la República de Chile*, Santiago, Chile, 31 de enero 1968.
- Delany, A., & Hankenson, K. (2009). Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *Journal of cell communication and signaling*, 3, 227-238.
- Delmas P. & Malaval, L. (1993). The proteins of bone. In G, Mundy & T, Martin (Ed.), *Physiology and pharmacology of bone* (673-724). Springer-Verlag.
- Deshusses, J., Burgess, J., Scherl, A., Wenger, Y., Walter, N., Converset, V., ... & Sanchez, J. (2003). Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. *PROTEOMICS: International Edition*, 3(8), 1418-1424. DOI: 10.1002/pmic.200300492
- Díaz, R., Camacho-Martínez, Z., Ambrosio, J. y Valencia-Caballero, L. (2019). La proteómica como una nueva herramienta en las ciencias forenses. *Revista Española de Medicina Legal*, 45(3), 114-122. DOI: 10.1016/j.reml.2018.06.002
- Duanis-Assaf, T., Hu, T., Lavie, M., Zhang, Z., & Reches, M. (2022). Understanding the adhesion mechanism of hydroxyapatite-binding peptide. *Langmuir*, 38(3), 968-978. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02293>
- Duong, V., Park, J., Lim, H., & Lee, H. (2021). Proteomics in Forensic Analysis: Applications for Human Samples. *Applied Sciences*, 11(8), 3393. DOI: <https://doi.org/10.3390/app11083393>

- Emmons, A., Mundorff, A., Keenan, S., Davoren, J., Andronowski, J., Carter, D., & DeBruyn, J. (2020). Characterizing the postmortem human bone microbiome from surface-decomposed remains. *PloS one*, 15(7), e0218636. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218636>
- Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Samani, S., Shokrgozar, M. A., Kundu, S. C., Reis, R. L., ... & Kaplan, D. L. (2018). Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Biotechnology advances*, 36(1), 68-91.
- Feng, X. (2009). Chemical and biochemical basis of cell-bone matrix interaction in health and disease. *Current chemical biology*, 3(2), 189-196. DOI: 10.2174/187231309788166398
- Fernández, I., Alobera Gracia, M., Canto Pingarrón, M., & Blanco Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(1), 47-51.
- Fiedler, S., & Graw, M. (2003). Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. *Naturwissenschaften*, 90, 291-300. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0437-0>
- Garnero, P. (2015). The role of collagen organization on the properties of bone. *Calcified tissue international*, 97(3), 229-240. DOI: 10.1007/s00223-015-9996-2
- Garnett, J., & Dieppe, P. (1990). The effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth. *Biochemical Journal*, 266(3), 863.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server* (pp. 571-607). Humana press.
- George, A., & Veis, A. (2008). Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chemical reviews*, 108(11), 4670-4693. <https://doi.org/10.1021/cr0782729>

- Gilbert, M., Rudbeck, L., Willerslev, E., Hansen, A., Smith, C., Penkman, K., ... & Collins, M. (2005). Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, 32(5), 785-793.
- Gorbunoff, M. J. (1984). The interaction of proteins with hydroxyapatite: II. Role of acidic and basic groups. *Analytical biochemistry*, 136(2), 433-439. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90240-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90240-9)
- Gorbunoff, M. J., & Timasheff, S. N. (1984). The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Analytical biochemistry*, 136(2), 440-445. DOI: 10.1016/0003-2697(84)90241-0
- Grzesik, W., & Robey, P. (1994). Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(4), 487-496.
- Habuka, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Pontén, F., Yamamoto, T., & Uhlen, M. (2015). The urinary bladder transcriptome and proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *PloS one*, 10(12), e0145301. DOI: 10.1371/journal.pone.0145301
- Hassan, M. I., Waheed, A., Yadav, S., Singh, T. P., & Ahmad, F. (2009). Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 447-459. DOI: 10.1007/s00018-008-8463-x
- Hästbacka, J., de la Chapelle, A., Mahtani, M., Clines, G., Reeve-Daly, M., Daly, M., ... & Lander, E. (1994). The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell*, 78(6), 1073-1087. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90281-x
- Hauschka, P., Lian, J., Cole, D., & Gundberg, C. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews*, 69(3), 990-1047. DOI: 10.1152/physrev.1989.69.3.990
- Heberle, H., Meirelles, G., da Silva, F., Telles, G., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, 16, 1-7. DOI: 10.1186/s12859-015-0611-3

- Hedges, R. E. (2002). Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328. DOI: <https://doi.org/10.1111/1475-4754.00064>
- Hedges, R., Millard, A. & Pike, A. (1995). Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites. *Journal of Archaeological science*, 22(2), 201-209.
- Ho, M., Thompson, B., Fisk, J., Nebert, D., Bruford, E., Vasiliou, V., & Bunick, C. G. (2022). Update of the keratin gene family: evolution, tissue-specific expression patterns, and relevance to clinical disorders. *Human Genomics*, 16(1), 1-21.
- Hossain, M., Huda, N., & Bhuyan, A. (2022). A surprisingly simple three-state generic process for reversible protein denaturation by trifluoroethanol. *Biophysical Chemistry*, 291, 106895. DOI: 10.1016/j.bpc.2022.106895
- Hostiuc, S., Rusu, M., Manoiu, V., Vrapciu, A., Negoii, I., & Popescu, M. (2017). Usefulness of ultrastructure studies for the estimation of the postmortem interval. A systematic review. *Rom J Morphol Embryol*, 58(2), 377-384.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S., Cook, H., ... & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic acids research*, 47(D1), D309-D314. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Huitfeldt, H., & Brandtzaeg, P. (1985). Various keratin antibodies produce immunohistochemical staining of human myocardium and myometrium. *Histochemistry*, 83(5), 381-389.
- Hyde, E., Haarmann, D., Petrosino, J., Lynne, A., & Bucheli, S. (2015). Initial insights into bacterial succession during human decomposition. *International journal of legal medicine*, 129, 661-671. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077733>
- Hynes, R. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *cell*, 110(6), 673-687. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6

- Ioan, B., Manea, C., Hanganu, B., Statescu, L., Solovastru, L., & Manoilescu, I. (2017). The chemistry decomposition in human corpses. *Rev Chim*, 68(6), 1352-1356. DOI: 10.37358/RC.17.6.5672
- Jani, P., Gibson, M., Liu, C., Zhang, H., Wang, X., Lu, Y., & Qin, C. (2016). Transgenic expression of Dspg partially rescued the long bone defects of Dmp1-null mice. *Matrix Biology*, 52, 95-112.
- Jans, M. M. E., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Collins, M. J., & Kars, H. (2004). Characterisation of microbial attack on archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 31(1), 87-95.
- Johnson, K., Hessle, L., Vaingankar, S., Wennberg, C., Mauro, S., Narisawa, S., ... & Terkeltaub, R. (2000). Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(4), R1365-R1377. DOI: 10.1152/ajpregu.2000.279.4.R1365
- Kalamajski, S., Aspberg, A., Lindblom, K., Heinegård, D., & Oldberg, Å. (2009). Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium and promotes osteoblast collagen mineralization. *Biochemical Journal*, 423(1), 53-59. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20090542>
- Karlström, E., Norgård, M., Hultenby, K., Somogyi-Ganss, E., Sugars, R., Andersson, G., & Wendel, M. (2011). Localization and expression of prothrombin in rodent osteoclasts and long bones. *Calcified tissue international*, 88, 179-188. DOI: 10.1007/s00223-010-9443-3
- Karsenty, G., & Oury, F. (2014). Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 521-526. DOI: 10.1016/j.mce.2013.10.008
- Kim, J., Kim, J., Kim, Y., Kim, K., Ryu, S., Lee, T., & Suh, P. (2013). Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. *Journal of cellular physiology*, 228(1), 216-224. DOI: 10.1002/jcp.24123
- Kirby, D., & Young, M. (2018). Isolation, production, and analysis of small leucine-rich proteoglycans in bone. *Methods Cell Biol.* 143, 281–296. DOI: 10.1016/bs.mcb.2017.08.016

- Kong, A., Leprevost, F., Avtonomov, D., Mellacheruvu, D., & Nesvizhskii, A. (2017). MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics. *Nature methods*, 14(5), 513-520.
- Krenzer, U. (2006). *Compendio de métodos antropológico forenses para la reconstrucción del perfil osteo-biológico*. Centro de Análisis Forense y Ciencias Aplicadas CAFCA.
- Kudo, A. (2011). Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cellular and molecular life sciences*, 68, 3201-3207. DOI: 10.1007/s00018-011-0784-5
- Lee Goff, M. (2009). Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Experimental and applied acarology*, 49(1), 21-36.
- Lee, D., Yang, K., Hwang, J., Kang, H., Lee, S., Choi, S., ... & Choi, J. (2016). Degradation of kidney and psoas muscle proteins as indicators of post-mortem interval in a rat model, with use of lateral flow technology. *PLoS One*, 11(8), e0160557.
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y., & Qian, A. (2020). The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. *Frontiers in pharmacology*, 11, 757. DOI: 10.3389/fphar.2020.00757
- Lovejoy, C., Meindl, R., Pryzbeck, T. & Mensforth, R. (1985) Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: A new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology* 68:15–28.
- Lu, G., Maeda, H., Reddy, S., Kurihara, N., Leach, R., Anderson, J., & Roodman, G. (2006). Cloning and characterization of the annexin II receptor on human marrow stromal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30542-30550. DOI: 10.1074/jbc.M607072200
- Luna Maldonado, A. (2010). La data de la muerte, un desafío no resuelto. *Revista Española de Medicina Legal*, 36(2), 47-48. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0377-4732\(10\)70043-2](https://doi.org/10.1016/S0377-4732(10)70043-2)
- Madea, B. (2016). Methods for determining time of death. *Forensic science, medicine, and pathology*, 12, 451-485.

- Marieb, E. (2008). *Anatomía y Fisiología Humana*. (9ª. Ed.). Pearson Educación, S.A.
- Marinovich, R., Soenjaya, Y., Wallace, G., Zuskov, A., Dunkman, A., Foster, B. L., ... & Goldberg, H. A. (2016). The role of bone sialoprotein in the tendon–bone insertion. *Matrix Biology*, 52, 325-338.
- Martini, F., Timmons, M. y Tallitsch, R. (2009). *Anatomía Humana*. (6ª. Ed.). Pearson Educación, S.A.
- Masters, P. M. (1987). Preferential preservation of noncollagenous protein during bone diagenesis: Implications for chronometric and stable isotopic measurements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51(12), 3209-3214. DOI: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(87\)90129-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90129-3)
- Meisenberg, G., & Simmons, W. (2018). *Principios de bioquímica médica (4 ed.)*. Elsevier Health Sciences.
- Merkley, E., Wunschel, D., Wahl, K., & Jarman, K. (2019). Applications and challenges of forensic proteomics. *Forensic science international*, 297, 350-363. DOI: 10.1016 / j.forsciint.2019.01.022.
- Mickleburgh, H., Schwalbe, E., Bonicelli, A., Mizukami, H., Sellitto, F., Starace, S., ... & Procopio, N. (2021). Human bone proteomes before and after decomposition: investigating the effects of biological variation and taphonomic alteration on bone protein profiles and the implications for forensic proteomics. *Journal of proteome research*, 20(5), 2533-2546. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00992>
- Micozzi, M. (1986). Experimental study of postmortem change under field conditions: effects of freezing, thawing, and mechanical injury. *Journal of forensic sciences*, 31(3), 953-961.
- Miettinen, M., & Fetsch, J. (2000). Distribution of keratins in normal endothelial cells and a spectrum of vascular tumors: implications in tumor diagnosis. *Human pathology*, 31(9), 1062-1067.

- Mizukami, H., Hathway, B., & Procopio, N. (2020). Aquatic decomposition of mammalian corpses: A forensic proteomic approach. *Journal of proteome research*, 19(5), 2122-2135. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00060>
- Morales, N., Barrientos, G., & L'Heureux, G. (2021). Diagénesis ósea en el bosque caducifolio de Patagonia meridional al este de los Andes: Modelo teórico y evidencia empírica. *Magallania (Punta Arenas)*, 49.
- Morgan, E., Barnes, G., & Einhorn, T. (2008). Chapter I: The Bone Organ System: Form and Function. In R, Marcus, D, Feldman, D, Nelson & C, Rosen (Eds). *Osteoporosis (3 ed.)* (pp. 3-26). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370544-0.50003-3>
- Mouw, J., Ou, G., & Weaver, V. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12), 771-785. DOI: 10.1038/nrm3902
- Nikita, E., & Lahr, M. (2011). Simple algorithms for the estimation of the initial number of individuals in commingled skeletal remains. *American journal of physical anthropology*, 146(4), 629-636. DOI: 10.1002/ajpa.21624
- Niyibizi, C., & Eyre, D. (1989). Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connective tissue research*, 20(1-4), 247-250. DOI:10.3109/03008208909023894
- Ortiz-Herrero, L., Uribe, B., Armas, L., Alonso, M., Sarmiento, A., Irurita, J., ... & Bartolome, L. (2021). Estimation of the post-mortem interval of human skeletal remains using Raman spectroscopy and chemometrics. *Forensic Science International*, 329, 111087. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.111087>
- Parker, G., McKiernan, H., Legg, K., & Goecker, Z. (2021). Forensic proteomics. *Forensic Science International: Genetics*, 102529. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102529>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., ... & Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D418-D427. DOI: 10.1093/nar/gkac993

- Pérez-Martínez, C., Pérez-Cárceles, M., Legaz, I., Prieto-Bonete, G. & Luna, A. (2017). Quantification of nitrogenous bases DNA and Collagen type I for the estimation of the postmortem interval in bone remains. *Forensic science international*, 281, 106-112. DOI: 10.1016 / j.forsciint.2017.10.039
- Pittner, S., Bugelli, V., Benbow, M., Ehrenfellner, B., Zissler, A., Campobasso, C. P., ... & Amendt, J. (2020). The applicability of forensic time since death estimation methods for buried bodies in advanced decomposition stages. *PLoS One*, 15(12), e0243395. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243395>
- Powers, R. (2005). The decomposition of human remains, a biochemical perspective. *En: Rich, J., Dean, D. E., y Powers, R. H. (Eds.), Forensic medicine of the lower extremity: human identification and trauma analysis of the thigh, leg and foot (1st Ed.)*. Humana press, New Jersey, pp. 3 – 15.
- Prieto-Bonete, G., Pérez-Cárceles, M., Maurandi-López, A., Pérez-Martínez, C. & Luna, A. (2019). Association between protein profile and postmortem interval in human bone remains. *Journals of Proteomics*, 192, 54-63. DOI: 10.1016 / j.jprot.2018.08.008.
- Procopio, N., Chamberlain, A., & Buckley, M. (2017). Intra-and Interskeletal proteome variations in fresh and buried bones. *Journal of proteome research*, 16(5), 2016-2029. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b01070
- Procopio, N., Mein, C., Starace, S., Bonicelli, A., & Williams, A. (2021). Bone Diagenesis in Short Timescales: Insights from an Exploratory Proteomic Analysis. *Biology*, 10(6), 460. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10060460>
- Procopio, N., Williams, A., Chamberlain, A., & Buckley, M. (2018). Forensic proteomics for the evaluation of the post-mortem decay in bones. *Journal of proteomics*, 177, 21-30. DOI: 10.1016 / j.jprot.2018.01.016
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rodríguez, J. V. (2004). *La Antropología Forense en la Identificación Humana*. Editora Guadalupe Ltda.

- Roy, M., & Nishimoto, S. (2002). Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone*, 31(2), 296-302. DOI: 10.1016/s8756-3282(02)00821-9
- Sacco, M., Cordasco, F., Scalise, C., Ricci, P., & Aquila, I. (2022). Systematic Review on Post-Mortem Protein Alterations: Analysis of Experimental Models and Evaluation of Potential Biomarkers of Time of Death. *Diagnostics*, 12(6), 1490. DOI: 10.3390/diagnostics12061490
- Saito, M., & Marumo, K. (2015). Effects of collagen crosslinking on bone material properties in health and disease. *Calcified tissue international*, 97, 242-261.
- Salam, H., Shaat, E., Aziz, M., MoneimSheta, A., & Hussein, H. (2012). Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes. *Alexandria Journal of Medicine*, 48(4), 335-344. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2012.05.004>
- Sangwan, A., Singh, S., Singh, P., Gupta, O., Manas, A., & Gupta, S. (2021). Role of molecular techniques in PMI estimation: An update. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 83, 102251. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102251>
- Schauberger P, Walker A (2023). `_openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files_`. R package version 4.2.5.2, <<https://CRAN.R-project.org/package=openxlsx>>.
- Schmidt, V., Zelger, P., Wöss, C., Huck, C., Arora, R., Bechtel, E., ... & Pallua, J. D. (2022). Post-Mortem Interval of Human Skeletal Remains Estimated with Handheld NIR Spectrometry. *Biology*, 11(7), 1020. DOI: 10.3390/biology11071020
- Sekiya, I., Vuoristo, J., Larson, B., & Prockop, D. (2002). In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4397-4402.

- Shi, G., Zheng, X., Zhu, C., Li, B., Wang, Y., Jiang, S., & Jiang, L. (2017). Evidence of the role of R-Spondin 1 and its receptor Lgr4 in the transmission of mechanical stimuli to biological signals for bone formation. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 564.
- Smith, C., Craig, O., Prigodich, R., Nielsen-Marsh, C., Jans, M., Vermeer, C., & Collins, M. (2005). Diagenesis and survival of osteocalcin in archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 32(1), 105-113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jas.2004.07.003>
- Squires, K., & García-Mancuso, R. (2021). Desafíos éticos asociados al estudio y tratamiento de restos humanos en las ciencias antropológicas en el siglo XXI. *Revista argentina de antropología biológica*, 23(2).
- Sroga, G., & Vashishth, D. (2012). Effects of bone matrix proteins on fracture and fragility in osteoporosis. *Current osteoporosis reports*, 10(2), 141-150.
- Stekhoven, D., & Bühlmann, P. (2012). MissForest—non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics*, 28(1), 112-118. DOI: [10.1093/bioinformatics/btr597](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr597)
- Sun, Z., Zhong, L., & Sun, D. (2013). A retrospective analysis of estimating postmortem interval in 256 murder cases. *Fa yi xue za zhi*, 29(6), 434-436.
- Swift, B. (2006). *The Timing of Death*. In: Rutty, G.N. (eds) *Essentials of Autopsy Practice*. Springer. DOI: https://doi.org/10.1007/1-84628-026-5_8
- Tortora, G. y Derrickson, B. (2011). *Principios de Anatomía y Fisiología*. (11ª. Ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Trueman, C., & Tuross, N. (2002). Trace elements in recent and fossil bone apatite. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 48(1), 489-521. DOI: <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.13>
- Trueman, C., Behrensmeyer, A., Tuross, N., & Weiner, S. (2004). Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *Journal of Archaeological Science*, 31(6), 721-739

- Trueman, C., Privat, K., & Field, J. (2008). Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266(3-4), 160-167.
- Turner-Walker, G. (2008). The chemical and microbial degradation of bones and teeth. *En: Pinhasi, R., y Mays, S. (Eds.), Advances in human paleopathology (1ª Ed.)*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 3 – 31.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., ... & Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419
- Vaduvesković, I., & Djuric, M. (2020). Mass grave complexity effects on the minimum number of individuals estimation. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 16, 57-64. DOI: 10.1007/s12024-019-00186-3
- Vargas, E. (1999). *Medicina Legal (2ª. Ed.)*. Editorial Trillas.
- Wadsworth, C., & Buckley, M. (2014). Proteome degradation in fossils: investigating the longevity of protein survival in ancient bone. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(6), 605-615. DOI: 10.1002 / rcm.6821.
- Weiner, S., & Wagner, H. (1998). The material bone: structure-mechanical function relations. *Annual review of materials science*, 28(1), 271-298. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.28.1.271>
- Wescott, D. (2018). Recent advances in forensic anthropology: decomposition research. *Forensic sciences research*, 3(4), 278-293. DOI: <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1488571>
- White, T., & Folkens, P. (2005). *The human bone manual*. Elsevier.
- White, T., Black, M. & Folkens, P. (2012). *Human Osteology*. Elsevier Academic Press.
- Xie, F., Liu, T., Qian, W., Petyuk, V., & Smith, R. (2011). Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25443-25449. DOI: 10.1074/jbc.R110.199703

- Xu, Z., Wei, Q., Zhao, W., Cui, Q., & Sahai, N. (2014). Essence of small molecule-mediated control of hydroxyapatite growth: free energy calculations of amino acid side chain analogues. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(8), 4372-4380. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12142>
- Yu, F., Haynes, S., & Nesvizhskii, A. (2021). IonQuant enables accurate and sensitive label-free quantification with FDR-controlled match-between-runs. *Molecular & Cellular Proteomics*, 20. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100077>
- Yu, F., Haynes, S., Teo, G., Avtonomov, D., Polasky, D., & Nesvizhskii, A. (2020). Fast quantitative analysis of timsTOF PASEF data with MSFragger and IonQuant. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(9), 1575-1585. DOI:<https://doi.org/10.1074/mcp.TIR120.002048>
- Zapico, S., & Adserias-Garriga, J. (2022). Postmortem Interval Estimation: New Approaches by the Analysis of Human Tissues and Microbial Communities Changes. *Forensic Sciences*, 2(1), 163-174. DOI: <https://doi.org/10.3390/forensicsci2010013>
- Zelenchuk, L., Hedge, A., & Rowe, P. (2015). Age dependent regulation of bone-mass and renal function by the MEPE ASARM-motif. *Bone*, 79, 131-142. DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.030
- Zhang, X., Bian, H., Wei, W., Wang, Q., Chen, J., Hei, R., ... & Zheng, Q. (2021). DLX5 promotes osteosarcoma progression via activation of the NOTCH signaling pathway. *American Journal of Cancer Research*, 11(6), 3354.
- Zissler, A., Stoiber, W., Steinbacher, P., Geissenberger, J., Monticelli, F., & Pittner, S. (2020). Postmortem protein degradation as a tool to estimate the PMI: a systematic review. *Diagnostics*, 10(12), 1014. DOI: 10.3390 / diagnostics10121014

9. ANEXO 1

“Resolución Comité Bioética y Bioseguridad Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción”



Concepción, 2 de mayo de 2022

INFORME COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD

Comité de Bioética y Bioseguridad Dirección de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción	PROYECTO	Tesis Magister
	TÍTULO	"BIOMARCADORES PROTEICOS. Hacia el Desarrollo de Metodologías para la Estimación del Intervalo Post Mortem (IPM) en Osamentas Humanas"
	INVESTIGADOR PRINCIPAL	- Srta. Camila Catalina Garcoés Parra -Dra. Estefanía Salomé Tarifeño Figueroa Jefe de Laboratorio

A solicitud del Srta. Camila Catalina Garcoés Parra, se recibe documento (adjunto) con precisiones a la metodología incluida en la postulación al Proyecto Tesis de Magister antes mencionado, solicitando que este Comité emita una carta de aprobación.

El documento ha sido analizado de acuerdo a las recomendaciones del "Manual de Bioseguridad" editado por CONICYT en 2018.

Los estudios serán desarrollados en el LABORATORIO GENE EXPRESSION AND REGULATION LABORATORY (GEaRLab) de nuestra Facultad, donde se encuentran disponibles tanto las facilidades como el equipamiento necesario para este tipo de estudios. El estudio se llevará a cabo considerando los requerimientos de manejo y eliminación de desechos de este material, de acuerdo al citado "Manual de Bioseguridad".

Cabe mencionar que nuestra Facultad cuenta con los servicios de la Unidad de Seguridad MATPEL (www2.udec.cl/matpel), quienes colectan y procesan en forma rutinaria los residuos biológicos y químicos generados por nuestros investigadores, de acuerdo a las indicaciones del "Manual de Bioseguridad" de CONICYT.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,

Dra. Mafalda Maldonado Villagrán
Presidenta
Comité de Bioética y Bioseguridad
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

10. ANEXO 2

“Ficha de registro para la obtención de osamentas humanas”

PROYECTO UDEC GARCÉS-PARRA						Fecha:	
N° Individuo:				Iniciales:			
Procedencia: ___Resaca Cementerio						___Donación Cadavérica	
N° Resaca:			Patio:			Bolsa:	
Datos Registrados			Sexo: _M _F		Edad:		IPM:
			Causa de muerte:				
			Fecha muerte:			Fecha enterramiento:	
Huesos	Costilla		Código:		N°Bolsa		N°Caja
Extraídos	Tibia		Código:		N°Bolsa		N°Caja
Tipo de almacenamiento			Costilla:			Tibia:	
Fecha extracción pieza ósea:							
Registrador/a:							
Observaciones:							
Comprobación Antropológica (Rellenar para individuos de Resacas)							
Número Mínimo de Individuos:			Describir piezas observadas:				

<p>Sexo Estimado</p> <p>Coxal:</p> <p>Cráneo:</p>	<p>Describe en coxal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Arco ventral: • Concavidad subpúbica: • Aspecto medial de la rama isquiopúbica: • Escotadura ciática: • Surco preauricular: <p>Indique de 1 a 5:</p> <p>Nuchal Crest</p> <p>Mastoid Process</p> <p>Supraorbital Margin</p> <p>Supraorbital Ridge/Glabella</p> <p>Mental Eminence</p>
<p>Edad estimada:</p>	<p>Etapa Suchey-Brooks (1990) sínfisis púbica:</p> <p><u>Descripción:</u></p>

	<p>Etapa Lovejoy et al. (1985) carilla auricular:</p> <p><u>Descripción:</u></p>
Descripción Piezas óseas.	
Costilla	Grado completitud:
	Grado conservación:
	Observaciones:
Tibia	Grado completitud:
	Grado conservación:
	Largo Máximo:
	Observaciones:

11. ANEXO 3

“Comandos análisis estadístico multivariado”

i. Análisis de MCA.

Paso 1: Instalación de Paquetes.

```
install.packages("FactoMineR")  
install.packages("factoextra")
```

Paso 2: Llamar las librerías.

```
library("FactoMineR")  
library("factoextra")
```

Paso 3: Generar el MCA para las 22 proteínas definidas como representativas de cada IPM. Para ello se usa la función MCA (X, ncp=5, graph=TRUE) donde X es la matriz de datos y ncp el número de dimensiones. A su vez, se le asigna un nombre al MCA, en este caso mca_22_ID_Comun.

```
mca_22_ID_Comun <- MCA(ID_22_Comunes.Total_x_muestra, ncp=5,  
graph=TRUE)
```

Paso 4: Extraer los resultados del MCA.

```
print(mca_22_ID_Comun) #Imprime los datos del MCA.
```

Paso 5: Extraer los valores de varianza que explica cada dimensión.

```
fviz_eig(mca_22_ID_Comun) #Permite extraer los valores propios de varianza  
  
get_eigenvalue(mca_22_ID_Comun) #Permite extraer los valores propios de  
varianzas por cada dimensión.  
  
eig.val <- get_eigenvalue(mca_22_ID_Comun)  
fviz_screplot(mca_22_ID_Comun, addlabels=TRUE, ylim=c(0,45)) #Permite  
visualizar el porcentaje de varianza que explica cada dimensión.
```

Paso 6: Extraer y visualizar de manera gráfica el resultado tanto para las variables (cada una de las proteínas) como para los individuos (cada una de las muestras).

```
get_mca_ind(mca_22_ID_Comun) #Extrae los resultados para individuos.  
get_mca_var(mca_22_ID_Comun) #Extrae los resultados para variables  
fviz_mca_ind(mca_22_ID_Comun) #Visualiza los resultados para individuos.  
fviz_mca_var(mca_22_ID_Comun) #Visualiza los resultados para variables.
```

Paso 7: Obtener la contribución de cada variable a cada una de las dimensiones.

```
Var <-get_mca_var(mca_22_ID_Comun)  
var  
head(var$coord)  
head(var$cos2)  
head(var$contrib)  
head(round(var$contrib,1),22).
```

Paso 8: Extraer los resultados y gráficos propios de las variables.

```
fviz_cos2(mca_total, choice= "var", axes= 1:2) #Permite visualizar las
variables con su respectivo valor de cos2.

fviz_mca_var(mca_total, col.var = "cos2",
             gradients.cols= c("00AFBB", "E7B8000", "FC4E07"),
             repel=TRUE,
             ggtheme= theme_minimal()) #Entrega el cos2 de las variables en
gradiente de colores.

fviz_mca_var(mca_total, choice= "mca.cor",
             repel= TRUE,
             ggtheme= theme_minimal()) #Permite visualizar la correlación entre
variables y dimensiones principales.
```

Paso 9: Extraer los resultados y gráficos propios de los individuos.

```
ind <-get_mca_ind(mca_22_ID_Comun)
ind
head(ind$coord)
head(ind$cos2)
head(ind$contrib)
head(round(ind$contrib,1),25) #Permite obtener la contribución de cada
individuo a la varianza total.

fviz_mca_ind(mca_22_ID_Comun, choice= "mca.cor",
             repel= TRUE,
```

```
ggtheme= theme_minimal()) #Permite obtener la correlación entre
individuos y las dimensiones principales.

fviz_mca_ind(mca_22_ID_Comun, col.ind = "cos2",
  gradients.cols = c("00AFBB", "E7B8000", "FC4E07"),
  repel=TRUE,
  ggtheme= theme_minimal()) #Proporciona un gráfico para individuos
con sus respectivos valores de cos2 en una gradiente de colores.
```

ii. Análisis de PCA.

Paso 1: Instalación de Paquetes.

```
install.packages("FactoMineR")
install.packages("factoextra")
```

Paso 2: Llamar las librerías.

```
library("FactoMineR")
library("factoextra")
```

Paso 3: Generar el PCA para las 22 proteínas definidas como representativas de cada IPM. Para ello se usa la función PCA (X, ncp=5, graph=TRUE) donde X es la matriz de datos y ncp el número de dimensiones. A su vez, se le asigna un

nombre al PCA, en este caso PCA_trip porque se está trabajando con las intensidades trípticas⁴.

```
PCA_trip <- PCA(Triptico_Ints_22, scale.unit = TRUE, ncp = 5, graph = TRUE)
res.pca <- PCA(Triptico_Ints_22, graph = FALSE)
#scale.unit permite escalar los valores y con ello hacer comparaciones entre los datos.
```

Paso 4: Extraer los resultados del PCA.

```
print(res.pca)
```

Paso 5: Extraer los valores de varianza que explica cada dimensión.

```
get_eigenvalue(res.pca) #Extrae los valores propios/varianzas de los componentes principales.

fviz_eig(res.pca) #Visualiza los valores propios de varianza.

fviz_eig(res.pca, addlabels = TRUE, ylim = c(0, 22)) #Permite visualizar el porcentaje de varianza que explica cada dimensión
```

⁴ Para la matriz con intensidades semitrípticas se ejecutaron los mismos códigos bajo el nombre de PCA_semitryp.

Paso 6: Extraer y visualizar de manera gráfica el resultado tanto para las variables como para los individuos.

```
get_pca_ind(res.pca) #extrae los resultados para individuos
get_pca_var(res.pca) #Extrae los resultados para variables
fviz_pca_ind(res.pca) #Visualiza los resultados para individuos
fviz_pca_var(res.pca) #Visualiza los resultados para variables.
fviz_pca_biplot(res.pca) #Genera un biplot de individuos y variables
```

Paso 7: Obtener la contribución de las categorías de todas las variables a las dimensiones.

```
var <- get_pca_var(res.pca)
var
head(var$coord)
head(var$cos2)
head(var$contrib)
head(round(var$contrib,1),22)
```

Paso 8: Extraer los resultados y gráficos propios de las variables.

```
head(round(var$contrib, 1),22) #Proporciona la contribución de las variables
para explicar la variabilidad en un componente principal.

fviz_pca_var(res.pca, col.var = "cos2",
             gradient.cols = c("#00AFBB", "#E7B800", "#FC4E07"),
             repel = TRUE)
```

```
) # Entrega el cos2 de las variables en gradiente de colores.
```

Paso 9: Extraer los resultados y gráficos propios de los individuos.

```
ind <- get_pca_ind(res.pca)
ind
head(ind$coord)
head(ind$cos2)
head(ind$contrib)
head(round(ind$contrib,1),25) #Proporciona la contribución de los individuos a
las dimensiones.

fviz_pca_ind(res.pca, col.ind = "cos2",
             gradient.cols = c("#00AFBB", "#E7B800", "#FC4E07"),
             repel = TRUE)
) #Entrega el cos2 de los individuos en gradiente de colores.
```

12. ANEXO 4

“Comandos utilizados en el procesamiento de abundancias relativas”

i. Abundancias relativas costillas.

Paso 1: Transformar los valores de intensidad en log10 para normalizar los datos usando el comando de R y generar una matriz con datos normalizados.

```
mat_costillas_tryp <- costillas_tryp
mat_log_tryp_costillas <- log10(mat_costillas_tryp)

mat_costillas_sem <- Costillas_Semitrip
mat_log_sem_costillas <- log10(mat_costillas_sem)
```

Paso 2: Setear el directorio de trabajo donde está el archivo con la matriz de las intensidades.

```
setwd("C:/Users/Camila/OneDrive/MAGÍSTER/TESIS/ARCHIVOSTESIS/ResultadosMasa_25_muestras_T&C/Procesamiento_Abundancias_Relativas")
```

Paso 3: Leer cada matriz de datos y reemplazar los ceros por NAs.

```
Tryp <- read.table("INTENSITY_Triptico_MATRIX.txt")
tryp[tryp == 0] <- NA

semitryp <- read.table("INTENSITY_Semitriptico_MATRIX.txt")
semitryp[semitryp == 0] <- NA
```

Paso 4: Generar las categorías en función de los IPM para la posterior imputación de Missing Values.

```
#Ejemplo categorías generadas en costillas con intesidades semitripticas.
MD4 <-semitryp %>% select(contains("MD4")) #Agrupa muestras de IPM<1
MD4$na_count <-"" #Contabiliza la cantidad de proteínas identificadas en esa
categoría.
MD4$na_count <- apply(MD4, 1, function(x) sum(is.na(x)))
MD4 <- MD4[MD4$na_count <= 2,] #Selecciona proteínas en esa categoría
que tienen como máximo 2 valores perdidos.

MR1C <-semitryp %>% select(contains("MR1")) #Agrupa muestras IPM=15
MR1C <-MR1C %>% select(contains("C"))
MR1C$na_count <-"" #Contabiliza la cantidad de proteínas identificadas en
esa categoría.
MR1C$na_count <- apply(MR1C, 1, function(x) sum(is.na(x)))
MR1C <- MR1C[MR1C$na_count <= 2,] #Selecciona proteínas en esa
categoría que tienen como máximo 2 valores perdidos.

MR2C <-semitryp %>% select(contains("MR2")) #Agrupa muestras IPM=20
MR2C <-MR2C %>% select(contains("C"))
MR2C$na_count <-"" #Contabiliza la cantidad de proteínas identificadas en
esa categoría.
MR2C$na_count <- apply(MR2C, 1, function(x) sum(is.na(x)))
MR2C <- MR2C[MR2C$na_count <= 2,] #Selecciona proteínas en esa
categoría que tienen como máximo 2 valores perdidos.
```

Paso 5: Imputacion de Missing Values usando el paquete missForest para cada categoría (IPM<1, IPM=15 e IPM=20).

```
install.packages("missForest")
library("missForest") #Utiliza el algoritmo Random Forest para la imputación
de datos.
set.seed(123)

imputed_data1 <- missForest(MD4 %>% select(-contains("na_count")))#,
method="cart")
full_data1 <- add_rownames(data.frame(imputed_data1$ximp,row.names = ),
var = "ID")

imputed_data2 <- missForest(MR1C %>% select(-contains("na_count")))#,
method="cart")
full_data2 <- add_rownames(data.frame(imputed_data2$ximp,row.names = ),
var = "ID")

imputed_data3 <- missForest(MR2C %>% select(-contains("na_count")))#,
method="cart")
full_data3 <- add_rownames(data.frame(imputed_data3$ximp,row.names = ),
var = "ID")
```

Paso 6: Unir cada uno de los sets imputados, conservado las intensidades de proteínas presentes en todas las muestras.

```
DFimp <- data.frame(Reduce(function(x, y) merge(x, y, all=FALSE),
list(full_data1, full_data2,full_data3)),row.names = 1)
```

Paso 7: Guardar los resultados en un archivo Excel.

```
mylist <- list()
mylist$MatrixIMP <- add_rownames(DFimp, var = "PROTEIN")
mylist$MatrixIMP.NORM <- add_rownames(normDFimp, var = "PROTEIN")
write.xlsx(mylist, file = "ID.Costillas.Semitrip.2missingvalue.xlsx")
```

ii. Abundancias relativas tibias.

Paso 1: Transformar los valores de intensidad en log10 para normalizar los datos usando el comando de R y generar una matriz con datos normalizados.

```
mat_tibias_tryt <- tibias_tryt
mat_log_tryt_tibias <- log10(mat_tibias_tryt)

mat_tibias_sem <- tibias_Semitrip
mat_log_sem_tibias <- log10(mat_tibias_sem)
```

Paso 2: Setear el directorio de trabajo donde está el archivo con la matriz de las intensidades.

```
setwd("C:/Users/Camila/OneDrive/MAGÍSTER/TESIS/ARCHIVOSTESIS/ResultadosMasa_25_muestras_T&C/Procesamiento_Abundancias_Relativas")
```

Paso 3: Leer cada matriz de datos y reemplazar los ceros por NAs.

```
Tryp <- read.table("INTENSITY_Triptico_MATRIX.txt")
tryp[tryp == 0] <- NA

semitryp <- read.table("INTENSITY_Semitriptico_MATRIX.txt")
semitryp[semitryp == 0] <- NA
```

Paso 4: Generar las categorías en función de los IPM para la posterior imputación de Missing Values.

```
#Ejemplo categorías generadas en tibias con intensidades semitripticas.
MR1T <-semitryp %>% select(contains("MR1")) #Agrupa muestras IPM=15
MR1T <-MR1T %>% select(contains("T"))
MR1T$na_count <-"" #Contabiliza la cantidad de proteínas identificadas en
esa categoría.
MR1T$na_count <- apply(MR1T, 1, function(x) sum(is.na(x)))
MR1T <- MR1T[MR1T$na_count <= 2,] #Selecciona proteínas en esa
categoría que tienen como máximo 2 valores perdidos.

MR2T <-semitryp %>% select(contains("MR2")) #Agrupa muestras IPM=20
MR2T <-MR2T %>% select(contains("T"))
MR2T$na_count <-"" #Contabiliza la cantidad de proteínas identificadas en
esa categoría.
MR2T$na_count <- apply(MR2T, 1, function(x) sum(is.na(x)))
MR2T <- MR2T[MR2T$na_count <= 2,] #Selecciona proteínas en esa
categoría que tienen como máximo 2 valores perdidos.
```

Paso 5: Imputacion de Missing Values usando el paquete missForest para cada categoría (IPM=15 e IPM=20).

```
install.packages("missForest")
library("missForest") #Utiliza el algoritmo Random Forest para la imputación
de datos.
set.seed(123)

imputed_data4 <- missForest(MR1T %>% select(-contains("na_count")))#,
method="cart")
full_data4 <- add_rownames(data.frame(imputed_data4$ximp,row.names = ),
var = "ID")

imputed_data5 <- missForest(MR2T %>% select(-contains("na_count")))#,
method="cart")
full_data5 <- add_rownames(data.frame(imputed_data5$ximp,row.names = ),
var = "ID")
```

Paso 6: Unir cada uno de los sets imputados, conservado las intensidades de proteínas presentes en todas las muestras.

```
DFimp <- data.frame(Reduce(function(x, y) merge(x, y, all=FALSE),
list(full_data4, full_data5)),row.names = 1)
```


Paso 7: Guardar los resultados en un archivo Excel.

```
mylist <- list()
mylist$MatrixIMP <- add_rownames(DFimp, var = "PROTEIN")
mylist$MatrixIMP.NORM <- add_rownames(normDFimp, var = "PROTEIN")
write.xlsx(mylist, file = "ID.Tibias.Semitrip.2missingvalue.xlsx")
```

13. ANEXO 5

“Listado 132 proteínas identificadas en muestras humanas”

IU	Proteína	Intervalo <i>Post mortem</i>			Función Molecular
		IPM<1	IPM=15	IPM=20	
A2ML1	Proteína alfa-2-macroglobulina similar a la 1	P	A	A	Actividad inhibidora de la endopeptidasa (GO:0004866)
ACTB	Actina, citoplasmática 1	P	A	A	Sin términos GO
ACTG	Actina, citoplasmática 2	P	A	A	Sin términos GO
ADA1D	Receptor adrenérgico alfa-1D	P	A	A	Actividad del receptor acoplado a proteínas G (GO:0004930) Actividad del receptor alfa1-adrenérgico (GO:0004937) Actividad del receptor adrenérgico (GO:0004935)
ADCY5	Adenilato ciclasa tipo 5	P	A	A	Actividad de fósforo-oxígeno liasa (GO:0016849) Actividad de la adenilato ciclasa (GO:0004016)
AH NK	Proteína AHNAK asociada a la diferenciación de neuroblastos	P	A	A	Unión a proteínas (GO:0005515)
ALBU	Albúmina	P	P	P	Sin términos GO
ANXA1	Anexina A1	P	P	A	Unión de iones de calcio (GO:0005509) Unión a fosfolípidos dependientes del calcio (GO:0005544) Actividad inhibidora de la fosfolipasa (GO:0004859)
BARX1	Homeobox proteína BarH-like 1	A	P	A	Unión al ADN (GO:0003677) Actividad del factor de transcripción de unión al ADN, específica de la ARN polimerasa II (GO:0000981)
CATA	Catalasa	P	A	A	Unión de hemo (GO:0020037) Actividad catalasa (GO:0004096)
CATB	Catepsina B	P	A	A	Actividad peptidasa tipo cisteína (GO:0008234) Actividad endopeptidasa tipo cisteína (GO:0004197)
CATG	Catepsina G	P	A	A	Actividad de la endopeptidasa de tipo serina (GO:0004252)

CLCN7	Transportador de intercambio H(+)/Cl(-) 7	A	P	P	Actividad del canal de cloruro dependiente de voltaje (GO:0005247)
CNKR3	Potenciador del conector del supresor de quinasa de ras 3	A	A	P	Unión a proteínas (GO:0005515)
CO1A1	Cadena de colágeno alfa-1(I)	P	P	P	Componente estructural de la matriz extracelular (GO:0005201) Unión a proteínas (GO:0005515)
CO1A2	Cadena de colágeno alfa-2(I)	P	P	P	Componente estructural de la matriz extracelular (GO:0005201)
CO2A1	Cadena de colágeno alfa-1(II)	P	P	P	Unión a proteínas (GO:0005515) Componente estructural de la matriz extracelular (GO:0005201)
CO3A1	Cadena de colágeno alfa-1(III)	P	P	P	Unión a proteínas (GO:0005515) Componente estructural de la matriz extracelular (GO:0005201)
CO4A1	Cadena de colágeno alfa-1(IV)	A	P	A	Componente estructural de la matriz extracelular (GO:0005201)
CO5A1	Cadena de colágeno alfa-1(V)	P	P	P	Componente estructural de la matriz extracelular (GO:0005201)
CO7A1	Cadena de colágeno alfa-1(VII)	P	A	A	Unión a proteínas (GO:0005515) actividad inhibidora de la endopeptidasa de tipo serina (GO:0004867)
CODA1	Cadena de colágeno alfa-1(XIII)	A	P	A	Sin términos GO
COF1	Cofilina-1	P	A	A	Unión a actina (GO:0003779)
CYTA	Cistatina-A	P	A	P	Actividad inhibidora de la endopeptidasa tipo cisteína (GO:0004869) Actividad inhibidora de la endopeptidasa (GO:0004866)
DDX28	Probable ARN helicasa DDX28 dependiente de ATP	A	P	A	Enlace ATP (GO:0005524) Unión de ácidos nucleicos (GO:0003676) Actividad ARN helicasa (GO:0003724)
DEF3	Defensina de neutrófilos 3	P	A	A	Sin términos GO
DNHD1	Proteína 1 que contiene el dominio de la cadena pesada de la dineína	A	A	P	Actividad motora de microtúbulos dirigida al extremo negativo (GO:0008569) Enlace ATP (GO:0005524) Unión de cadena intermedia ligera de dineína (GO:0051959) Unión en cadena intermedia de dineína (GO:0045505)

DYH5	Cadena pesada axonemal 5 de dineína	P	A	A	Enlace ATP (GO:0005524) Actividad motora de microtúbulos dirigida al extremo negativo (GO:0008569) Unión de cadena intermedia ligera de dineína (GO:0051959) Unión en cadena intermedia de dineína (GO:0045505)
DZI1L	Proteína de ensamblaje del cilio DZIP1L	P	A	A	Sin términos GO
ECP	Proteína catiónica eosinófila	P	A	A	Unión a ácidos nucleicos (GO:0003676)
EDC4	Potenciador de la proteína 4 que decapa el ARNm	A	A	P	Unión a proteínas (GO:0005515)
ELNE	Elastasa de neutrófilos	P	A	A	Actividad de endopeptidasa de tipo serina (GO:0004252)
EXOSX	Componente exosómico 10	P	A	A	Actividad exonucleasa 3'-5' (GO:0008408) Unión a ácidos nucleicos (GO:0003676) Actividad exonucleasa de 3'-5'-ARN (GO:0000175) Unión a nucleótidos (GO:0000166)
FABP5	Proteína de unión a ácidos grasos 5	P	P	P	Unión a lípidos (GO:0008289)
FETUA	Alfa-2-HS-glicoproteína	P	P	P	Actividad inhibidora de la endopeptidasa tipo cisteína (GO:0004869)
FOLR3	Receptor gamma de folato	P	A	A	Sin términos GO
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P	P	P	Enlace NAD (GO:0051287) actividad oxidorreductasa, que actúa sobre el aldehído o grupo oxo de los donantes, NAD o NADP como aceptor (GO:0016620) Enlace NADP (GO:0050661)
GRIA3	Receptor de glutamato 3	A	P	A	Actividad del receptor de señalización (GO:0038023) Actividad del canal iónico monoatómico (GO:0005216) Actividad del receptor de glutamato ionotrópico (GO:0004970) Actividad del canal iónico monoatómico controlado por ligando (GO:0015276)
GSTP1	Glutación S-transferasa P	P	A	A	Actividad de la glutación transferasa (GO:0004364)
H10	Histona H1.0	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677) Constituyente estructural de la cromatina (GO:0030527)

H12	Histona H1.2	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677) Constituyente estructural de la cromatina (GO:0030527)
H13	Histona H1.3	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677) Constituyente estructural de la cromatina (GO:0030527)
H14	Histona H1.4	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677) Constituyente estructural de la cromatina (GO:0030527)
H15	Histona H1.5	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677) Constituyente estructural de la cromatina (GO:0030527)
H2B1D	Histona H2B tipo 1-D	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677) Constituyente estructural de la cromatina (GO:0030527) Actividad de heterodimerización de proteínas (GO:0046982)
H4	Histona H4	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677) Actividad de heterodimerización de proteínas (GO:0046982) Constituyente estructural de la cromatina (GO:0030527)
HBA	Subunidad alfa de hemoglobina	P	P	A	Unión de hemo (GO:0020037) Unión de oxígeno (GO:0019825) Unión de iones de hierro (GO:0005506)
HBB	Subunidad beta de hemoglobina	P	A	A	Unión de hemo (GO:0020037) Unión de oxígeno (GO:0019825)
HBD	Subunidad de hemoglobina delta	P	A	A	Unión de hemo (GO:0020037) Unión de oxígeno (GO:0019825)
HLX	Proteína homeobox similar a H2.0	A	A	P	Unión al ADN (GO:0003677) Actividad del factor de transcripción de unión al ADN, específica de la ARN polimerasa II (GO:0000981)
HMGB2	Proteína B2 del grupo de alta movilidad	P	A	A	Unión al ADN (GO:0003677)
HMGN2	Proteína cromosómica no histona HMG-17	P	A	A	Unión al ADN nucleosómico (GO:0031492)
HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	P	A	A	Sin términos GO
IER2	Proteína 2 del gen <> de respuesta temprana inmediata	A	A	P	Sin términos GO
IGF2	Factor de crecimiento similar a la insulina II	P	P	P	Actividad hormonal (GO:0005179) Actividad del factor de crecimiento (GO:0008083)
IGLL1	Polipéptido similar a la	A	A	P	Sin términos GO

	inmunoglobulina lambda 1				
K1C10	Queratina citoesquelética tipo I 10	P	P	P	Actividad estructural de la molécula (GO:0005198)
K1C12	Queratina citoesquelética tipo I 12	P	P	P	Actividad estructural de la molécula (GO:0005198)
K1C13	Queratina citoesquelética tipo I 13	P	P	P	Actividad estructural de la molécula (GO:0005198)
K1C16	Queratina citoesquelética tipo I 16	P	P	A	Actividad estructural de la molécula (GO:0005198)
K22E	Queratina, citoesquelético tipo II 2 epidérmico	P	A	A	Sin términos GO
K22O	Queratina, citoesquelético tipo II 2 oral	P	P	A	Sin términos GO
K2C1	Queratina, citoesquelético tipo II 1	P	P	P	Sin términos GO
K2C4	Queratina, citoesquelético tipo II 4	P	P	P	Sin términos GO
K2C5	Queratina citoesquelética tipo II 5	P	A	A	Sin términos GO
K2C6A	Queratina, citoesquelético tipo II 6A	P	P	P	Sin términos GO
K2C74	Queratina citoesquelética tipo II 74	A	A	P	Sin términos GO
K2C79	Queratina citoesquelética tipo II 79	P	A	A	Sin términos GO
KI3L1	Receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas 3DL1	A	P	A	Sin términos GO
KLF10	Factor 10 similar a Krueppel	A	A	P	Sin términos GO
LDB3	Proteína de unión al dominio LIM 3	P	A	A	Unión a proteínas (GO:0005515)
LIMC1	Proteína 1 que contiene dominios de homología LIM y calponina	P	A	A	Unión a proteínas (GO:0005515) Unión a actina (GO:0003779)
LYSC	Lisozima C	P	A	A	Actividad de lisozima (GO:0003796)

M3K11	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos 11	A	A	P	unión a proteínas (GO:0005515) Enlace ATP (GO:0005524) Actividad de la proteína quinasa (GO:0004672) Actividad MAP quinasa quinasa quinasa (GO:0004709)
MABP1	Proteína de unión a quinasa activada por mitógenos 1	A	A	P	Unión a proteínas (GO:0005515)
MAFG	Factor de transcripción MafG	A	P	A	Actividad del factor de transcripción de unión al ADN (GO:0003700) Unión al ADN (GO:0003677)
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos	P	A	A	Sin términos GO
MOT7	Transportador de monocarboxilato 7	A	A	P	Actividad del transportador transmembrana (GO:0022857)
MSTN1	Proteína nuclear embrionaria musculoesquelética 1	P	A	A	Sin términos GO
NAPSA	Napsin-A	A	P	A	Actividad endopeptidasa de tipo aspártico (GO:0004190)
OBF1	Clase de dominio POU 2-factor de asociación 1	A	A	P	Enlace de dominio POU (GO:0070974) Unión al ADN (GO:0003677)
OMD	Osteomodulina	A	A	P	Unión a proteínas (GO:0005515)
OSTCN	Osteocalcina	P	P	P	Unión de iones de calcio (GO:0005509)
OSTP	Osteopontina	P	P	P	Sin términos GO
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentario	P	P	P	Actividad inhibidora de la endopeptidasa de tipo serina (GO:0004867)
PERM	Mieloperoxidasa	P	A	A	Actividad de la peroxidasa (GO:0004601) Unión de hemo (GO:0020037)
PGS1	Biglicano	P	P	P	Unión a proteínas (GO:0005515)
PGS2	Decorina	P	A	P	Unión a proteínas (GO:0005515)
PHB1	Prohibición 1	P	A	A	Sin términos GO
PIP	Proteína inducible por prolactina	P	P	P	Sin términos GO
PK3CA	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa catalítica subunidad alfa isoforma	A	P	A	Actividad quinasa (GO:0016301) Actividad 1-fosfatidilinositol 3-quinasa (GO:0035004)

PPIA	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	P	A	A	Actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa (GO:0003755)
PRG3	Proteoglicano 3	P	A	A	Sin términos GO
PRGR	Receptor de progesterona	A	A	P	Unión a esteroides (GO:0005496) Unión al ADN (GO:0003677) Actividad del receptor de esteroides nucleares (GO:0003707) Actividad del factor de transcripción de unión al ADN (GO:0003700) Unión de iones de zinc (GO:0008270) Unión de ADN específica de secuencia (GO:0043565)
PRR12	Proteína rica en prolina 12	A	P	P	Sin términos GO
RFL3S	Proteína putativa RFPL3S	A	P	A	Sin términos GO
RHCG	Transportador de amonio Rh tipo C	A	P	A	Actividad del transportador transmembrana de amonio (GO:0008519)
RIMS1	Regulación de la proteína 1 de exocitosis de membrana sináptica	A	A	P	Unión a proteínas (GO:0005515) Unión de GTPasas pequeñas (GO:0031267)
RL27A	Proteína uL15 de la subunidad ribosómica grande	P	A	A	Constituyente estructural del ribosoma (GO:0003735)
RNAS2	Ribonucleasa no secretora	P	A	A	Unión a ácidos nucleicos (GO:0003676)
RRP1	Proteína de procesamiento de ARN ribosómico 1 homólogo A	P	P	P	Sin términos GO
S10A7	Proteína S100-A7	P	P	P	Unión de iones de metales de transición (GO:0046914) Unión de iones de calcio (GO:0005509)
S10A8	Proteína S100-A8	P	P	P	Unión de iones de calcio (GO:0005509)
S10A9	Proteína S100-A9	P	P	P	Unión de iones de calcio (GO:0005509)
S10AB	Proteína S100-A11	P	P	A	Unión de iones de calcio (GO:0005509) Unión a proteínas dependientes del calcio (GO:0048306)
SBSN	Supracuencia	A	A	P	Sin términos GO

SCLY	Selenocisteína liasa	P	A	A	Sin términos GO
SEMG1	Semenogelina-1	P	P	P	Sin términos GO
SH3L3	SH3 proteína similar rica en ácido glutámico de unión al dominio 3	P	A	A	Sin términos GO
SHOC1	Escasez de proteínas en el ortólogo de quiasmata 1	A	A	P	Actividad de hidrólisis de ATP (GO:0016887)
SLIK3	SLIT y proteína similar a NTRK 3	A	P	A	Unión a proteínas (GO:0005515)
SMIM5	Proteína 5 de membrana integral pequeña	A	A	P	Sin términos GO
SNAA	Proteína de unión a NSF alfasoluble	P	A	A	Unión a proteínas (GO:0005515)
SOST	Esclerostina	P	A	A	Sin términos GO
SPB3	Serpin B3	P	P	A	Actividad inhibidora de la endopeptidasa de tipo serina (GO:0004867)
SPT25	Proteína asociada a la espermatogénesis 25	P	A	A	Sin términos GO
T132A	Proteína transmembrana 132A	P	A	A	Sin términos GO
TBAL3	Tubulina alfa en forma de cadena 3	A	P	A	Enlace GTP (GO:0005525) Constituyente estructural del citoesqueleto (GO:0005200)
TGO1	Transporte y organización de Golgi proteína 1 homólogo	A	A	P	Unión a proteínas (GO:0005515)
THRB	Protrombina	P	P	P	Unión de iones de calcio (GO:0005509) Actividad de la endopeptidasa de tipo serina (GO:0004252)
TM119	Proteína transmembrana 119	A	A	P	Sin términos GO
TYB4	Timosina beta-4	P	A	A	Unión al monómero de actina (GO:0003785)
VAPA	Proteína A asociada a proteína de membrana asociada a vesícula	P	A	A	Sin términos GO

VIME	Vimentina	P	A	A	Sin términos GO
VPP3	Protón ATPasa de tipo V 116 kDa subunidad a 3	A	A	P	Actividad ATPasa transportadora de protones, mecanismo rotacional (GO:0046961)
VTNC	Vitronectina	P	P	P	Unión de polisacáridos (GO:0030247) Actividad del receptor eliminador (GO:0005044)
XRN2	5'-3' exoribonucleasa 2	A	A	P	Unión a ácidos nucleicos (GO:0003676) Actividad exonucleasa (GO:0004527) Actividad exonucleasa de ARN 5'-3' (GO:0004534)
ZFR2	Proteína 2 de unión al ARN del dedo de zinc	P	A	A	Unión a ácidos nucleicos (GO:0003676) Unión de iones de zinc (GO:0008270)
ZN419	Proteína de dedo de zinc 419	A	P	A	Sin términos GO
ZN446	Proteína de dedo de zinc 446	A	A	P	Sin términos GO
ZN608	Proteína de dedo de zinc 608	A	A	P	Sin términos GO
ZN619	Proteína de dedo de zinc 619	A	A	P	Sin términos GO

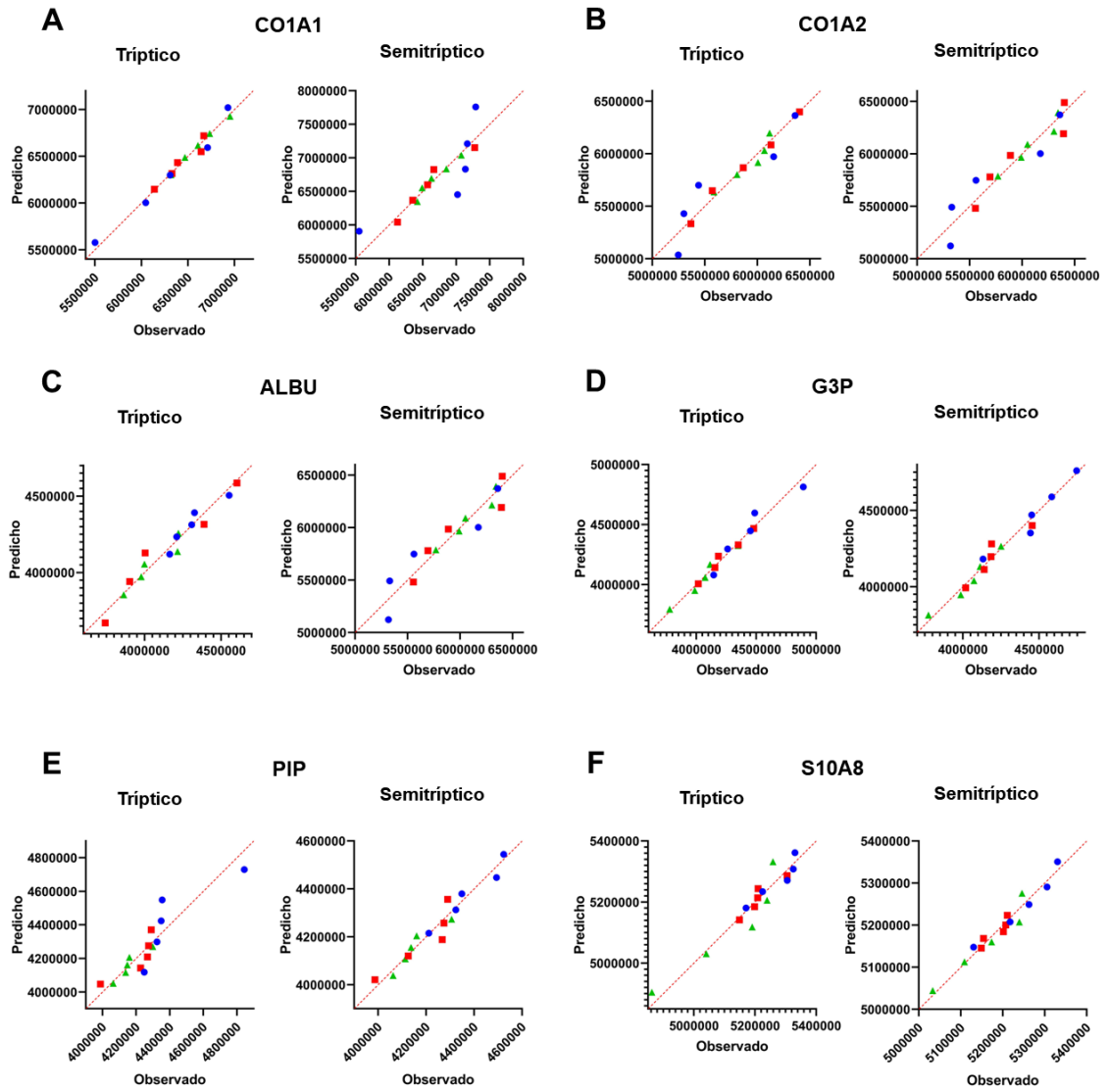
***IU= Identificador Uniprot.**

***P= Presente / A=Ausente.**

14. ANEXO 6

“Resultados pruebas de normalidad Shapiro Wilk en el análisis de abundancias relativas”

- Gráficos de normalidad para las 14 proteínas analizadas en muestras de costillas. (Azul: IPM<1; Rojo: IPM=15; Verde: IPM=20).

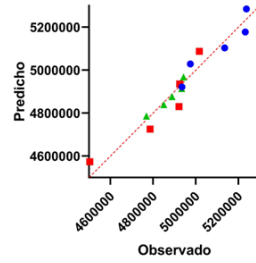
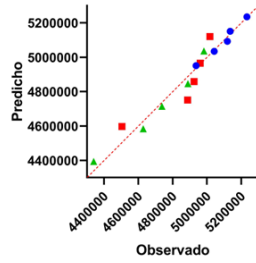


G

S10A9

Triptico

Semitriptico

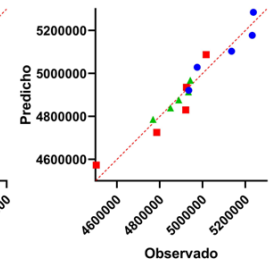
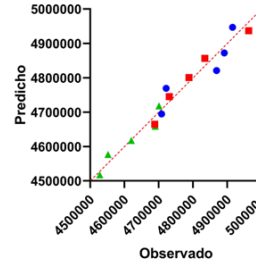


H

K1C10

Triptico

Semitriptico

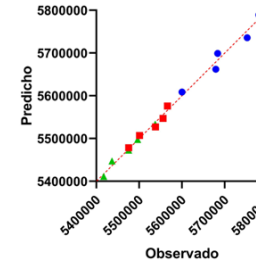
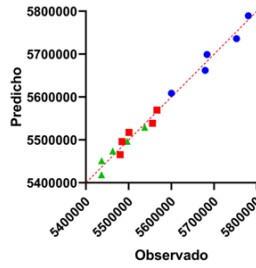


I

K1C13

Triptico

Semitriptico

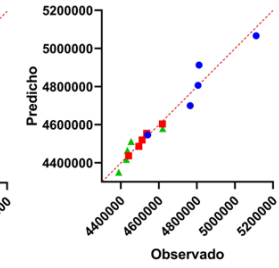
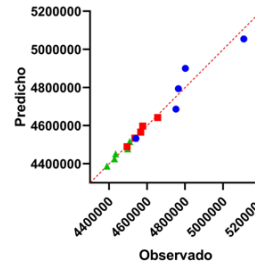


J

K2C1

Triptico

Semitriptico

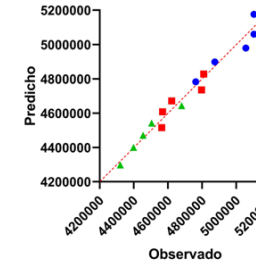
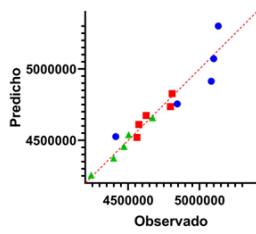


K

K2C4

Triptico

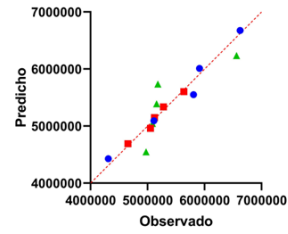
Semitriptico



L

FETUA

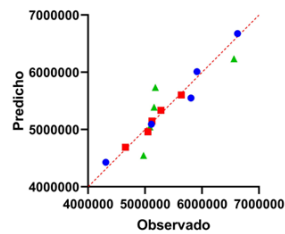
Semitriptico



M

SEMG1

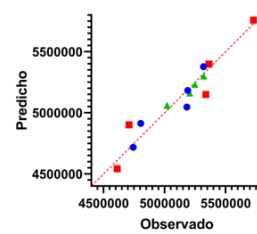
Semitriptico



N

THRB

Semitriptico



- **Gráficos de normalidad para las 9 proteínas analizadas en muestras de tibias.** (Rojo: IPM=15; Verde: IPM=20).

