



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Búsqueda e identificación de DNA de *Treponema pallidum* en  
restos óseos humanos prehispánicos de México, que muestran  
lesiones sugerentes de sífilis**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**ERNESTO GARFIAS MORALES**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANGÉLICA GONZÁLEZ OLIVER  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
COMITÉ TUTOR: Dra. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
Dr. JULIO GRANADOS ARRIOLA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX., JUNIO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Búsqueda e identificación de DNA de *Treponema pallidum* en  
restos óseos humanos prehispánicos de México, que muestran  
lesiones sugerentes de sífilis**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**ERNESTO GARFIAS MORALES**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANGÉLICA GONZÁLEZ OLIVER  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
COMITÉ TUTOR: Dra. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
Dr. JULIO GRANADOS ARRIOLA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX., JUNIO, 2016**



OFICIO FCIE/DEP/337/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **25 de abril de 2016** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **GARFIAS MORALES ERNESTO** con número de cuenta **99119144** con la tesis titulada **"Busqueda e identificación de DNA de *Treponema pallidum* en restos óseos humanos prehispánicos de México, que muestran lesiones sugerentes de Sífilis"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. ANGÉLICA GONZÁLEZ OLIVER**:

Presidente: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO  
Vocal: DR. FRANCISCO ROBERTO VERGARA SILVA  
Secretario: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA  
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ ALEMÁN  
Suplente: M. ARQLGO. GUILLERMO CÓRDOVA TELLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de junio de 2016

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



MCAA/MJFM/ASR/grf\*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme realizar un posgrado con calidad internacional.

A CONACYT, por la beca proporcionada, la cual me permitió dedicarme de tiempo completo a la maestría.

A PAPIIT, DGAPA, UNAM No. IN306014-12, por el financiamiento al proyecto del cual forma parte esta tesis.

Al PAEP, por los apoyos financieros que me permitieron asistir a dos cursos excelentes que complementaron mi formación académica en el posgrado.

A mi Tutora Principal, la Dra. Angélica González Oliver, por sus enseñanzas durante el trabajo de experimental, así como sus comentarios y correcciones a este escrito.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser y el Dr. Julio Granados Arriola, por sus observaciones y comentarios durante la realización del proyecto de maestría y a este escrito, por su paciencia y apoyo en todo momento.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Arturo Carlos Il Becerra Bracho, por sus comentarios y asesorías en este trabajo, por el apoyo y comprensión en los trámites.

Al Dr. Francisco Roberto Vergara Silva, por sus comentarios y observaciones a esta tesis, por sus enseñanzas en temas de Antropología Biológica.

Al Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán, por sus valiosos comentarios y observaciones que me permitieron pulir este trabajo.

Al Maestro en Arqueología Guillermo Córdova Tello, por la información proporcionada sobre los individuos de Tamtoc y Pajones, por sus comentarios y asesorías y, por el tiempo dedicado a explicarme diversos aspectos arqueológicos y antropológicos.

Al Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco, por el apoyo en el registro fotográfico, por sus enseñanzas en Bioquímica y Antropología Molecular.

A la M. en C. Isabel de la Cruz Laina, por sus enseñanzas iniciales en el manejo del DNA antiguo, por su apoyo y amistad.

A la Dra. Paty Hernández, por las muestras óseas e información proporcionada sobre los individuos de Tamtoc y Pajones.

A la Dra. Ángeles Olay Barrientos y la Antropóloga Física Rosa María Flores Ramírez, por las muestras óseas e información proporcionada sobre los individuos de la Gasolinera Kiosko.

A la estudiante de antropología Kelly Champan y a la Dra. Connie J. Mulligan, por la optimización de las condiciones de amplificación del DNA de *Treponema padillum* contemporáneo.

A la M. en C. Laura M. Márquez Valdelamar por la realización de la electroforesis capilar en el secuenciador *ABI Prism 310*.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mi familia: Javier, Alondra, Pável, Laura, Pablo y Esther, Jéssica, Itzel, Ángel, Rafa, Ángeles, Cata e Irsrael, por su apoyo incondicional y cariño.

A mis amigos y compañeros de departamento Guillermo Urrutia y Rafael Villanueva, por soportarme a pesar de lo difícil que puede ser convivir conmigo, por brindarme su apoyo en momentos complicados y por su amistad.

A Emilia Hernández, Por la inmensa ayuda, apoyo incondicional, por soportarme como soy, por la amistad y cariño.

A Uriel Rocha, por el apoyo indondicional, por ser un hermano más y un gran amigo.

A Wendy Espinosa, por las observaciones, comentarios y asesorías durante la realización de este escrito, por su amistad.

A César Martínez, Roberto Calderón, Marco Zaragoza y Hada Fuentes, grandes amigos que siempre tengo presentes, porque sé que igual están conmigo en todo momento.

A mis compañeras y amigas de la maestría, Dircé Pineda y Miriam Bravo, por su amistad, su apoyo, por soportarme durante la fase experimental y, por los momentos de alegría.

A Jorgito, Reme, David, Yalbi, Yahir, Andrea, Mariana, Semiramis, Andrés, Miguel, Luis, Adrián y todos los compañeros del seminario futbolero, por su apoyo y amistad durante estos años en mi paso por el laboratorio de Bioquímica.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. Sífilis .....	3
1.1.1. <i>Sífilis primaria</i> .....	3
1.1.2. <i>Sífilis secundaria</i> .....	4
1.1.3. <i>Sífilis latente</i> .....	5
1.1.4. <i>Sífilis terciaria</i> .....	5
1.1.5. <i>Neurosífilis</i> .....	6
1.1.6. <i>Sífilis congénita</i> .....	8
1.1.7. <i>Diagnóstico</i> .....	9
1.1.8. <i>Tratamiento</i> .....	12
1.1.9. <i>Respuesta inmune</i> .....	13
1.2. <i>Biología de T. pallidum</i> .....	13
1.2.1. <i>Clasificación</i> .....	13
1.2.2. <i>Morfología</i> .....	16
1.2.3. <i>Metabolismo limitado</i> .....	17
1.2.4. <i>Factores de virulencia potenciales</i> .....	18
1.3. <i>Origen de la Sífilis</i> .....	20
1.3.1. <i>Hipótesis unitaria</i> .....	21
1.3.2. <i>Hipótesis colombina</i> .....	22
1.3.3. <i>Hipótesis precolombina</i> .....	24
1.3.4. <i>Hipótesis alternativa</i> .....	25
1.4. <i>Paleopatología</i> .....	26
1.4.1. <i>Evidencia ósea en el Viejo Mundo</i> .....	27
1.4.2. <i>Evidencia ósea en América</i> .....	29
1.5. <i>Análisis Filogenéticos</i> .....	34
1.6. <i>DNA antiguo</i> .....	36
1.6.1. <i>Degradación del DNA</i> .....	37
1.6.2. <i>Contaminación</i> .....	39
1.6.3. <i>Artefactos</i> .....	41
1.6.4. <i>Jumping PCR y productos quiméricos</i> .....	42
1.6.5. <i>Cuantificación</i> .....	43
1.6.6. <i>Secuenciación</i> .....	43
1.6.7. <i>Criterios de autenticidad</i> .....	44
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	45
2.1. <i>Paleopatología Molecular de la Sífilis</i> .....	45
2.1.1. <i>Detección de aDNA de T. pallidum</i> .....	45
2.1.2. <i>Resultados negativos</i> .....	46
2.1.3. <i>tprJ en momias sudamericanas</i> .....	47

2.1.4. aDNA de <i>T. pallidum</i> en neonatos	47
2.1.5. Tuberculosis en restos de Tamtoc y Pajones	47
<b>III. OBJETIVOS</b>	49
3.1. Objetivo General	49
3.2. Objetivos Particulares	49
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	50
4.1. Sitios Arqueológicos	50
4.1.1. Tamtoc	50
4.1.2. Pajones	51
4.1.3. Gasolinera-Kiosko	52
4.2. Material biológico	54
4.3. Medidas preventivas	64
4.4. Registro fotográfico	66
4.5. Limpieza de las muestras	66
4.6. Extracción de DNA	67
4.7. Amplificación por PCR	68
4.8. Análisis Electroforético	72
4.9. Aislamiento del fragmento buscado	72
4.9.1. Análisis de Restricción	73
4.9.2. Secuenciación	74
<b>V. RESULTADOS</b>	76
5.1. Obtención de DNA	76
5.2. DNA treponémico	76
5.3. Diagnóstico diferencial, <i>M. tuberculosis</i>	78
5.4. Haplogrupos mitocondriales	80
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	82
6.1. DNA endógeno y microbiano	82
6.2. Ausencia de DNA treponémico	84
6.3. Tuberculosis antigua	86
6.4. Resultados no concluyentes de <i>M. tuberculosis</i> en otros estudios	88
6.5. Análisis de mtDNA	89
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	92
<b>LITERATURA CITADA</b>	93

## RESUMEN

Existen al menos tres hipótesis para explicar el origen de la sífilis: la colombina que postula que la sífilis fue llevada a Europa con el descubrimiento de América; la precolombina que plantea que la sífilis fue llevada de Europa a América por los conquistadores españoles; y la unitaria, que postula que las distintas treponematosis (sífilis venérea, frambesia, bejel y pinta) son causadas por el mismo patógeno desde tiempos prehistóricos. Los documentos históricos referentes a la sífilis, al igual que la evidencia paleopatológica, están rodeados de desacuerdos y controversias.

El diagnóstico molecular de la bacteria causante de la sífilis, en muestras arqueológicas, puede auxiliar en la resolución de la controversia en torno al origen de la sífilis. En este estudio se analizaron los restos óseos de siete individuos prehispánicos con lesiones sugerentes de treponematosis. Se buscó el DNA de *Treponema pallidum* por medio del marcador *tpp15*, que contiene un polimorfismo característico de la subespecie *pallidum*. No fue posible detectar DNA treponémico en todos los individuos analizados. Esto puede deberse a que el DNA del patógeno estaba degradado y en una concentración reducida, así como a la falta de una mayor sensibilidad por parte del método utilizado. También es posible que los signos en los huesos hayan sido producidos por otro microorganismo, lo que podría implicar que no exista DNA de *T. pallidum* en estos restos.

Se logró la obtención de DNA mitocondrial y la tipificación exitosa de tres individuos que se asignaron al haplogrupo A. El resto no fue posible tipificarlos, ya que los huesos no se encontraban en estado óptimo para un análisis de DNA humano.

Las condiciones de preservación de las muestras óseas arqueológicas son fundamentales para considerar someterlas a un análisis molecular. La utilización de restos momificados, que conservan tejidos blandos, es una opción viable para realizar la búsqueda de DNA antiguo de *T. pallidum*; así como el empleo de tecnologías de secuenciación de nueva generación.

## ABSTRACT

There are at least three hypotheses to explain the origin of syphilis: the Columbian, which postulates that syphilis was brought to Europe with the discovery of America; pre-Columbian proposed that syphilis was carried from Europe to America by Spanish conquistadors; and the unitarian, which postulates that different treponematoses (venereal syphilis, yaws, bejel and pinta) are caused by the same pathogen since prehistoric times. Historical documents relating to syphilis, like the paleopathological evidence, are surrounded by disagreements and disputes.

The molecular diagnosis of the etiological agent of syphilis in archaeological samples, can assist in the resolution of the controversy surrounding the origin of syphilis. In the present study the skeletal remains of seven pre-Hispanic individuals with lesions suggestive of treponematoses were analyzed. *Treponema pallidum* genetic material was sought through *tpp15* marker, containing a *pallidum* subspecies characteristic polymorphism. It was not possible to detect treponemal DNA in either of the remains. This could be due to pathogen DNA degraded and a reduced bacterial load, and also the lack of sensitivity in the used methods. It is also possible that the signs on the bones have been produced by other microorganisms, which could mean that there is no DNA of *T. pallidum* in these remains.

Successful mitochondrial DNA was obtained and typed of three individuals who were assigned to haplogroup A. The other bones were not in optimum state for human DNA analysis and the analysis couldn't be done.

The conditions of preservation of archaeological bone samples are fundamental to consider them for molecular analysis. The use of mummified remains, which preserve soft tissue, is a viable option to search for *T. pallidum* ancient DNA; and the use of technologies of next generation sequencing.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Sífilis

La sífilis venérea es una enfermedad crónica, compuesta por etapas múltiples y de manifestaciones diversas. Se adquiere por contacto directo con las lesiones primarias o secundarias generalmente por vía sexual. También puede contagiarse vía sanguínea, con transfusiones, picaduras o cortes con objetos infectados, además de vía transplacentaria conocida como sífilis congénita (Conde-Sendín *et al.*, 2002). El agente etiológico es la bacteria *Treponema pallidum pallidum*; y el ser humano es el único hospedero natural (Schaudinn y Hoffmann, 1905; Fraser *et al.*, 1998; Brown y Frank, 2003; Lafond y Lukehart, 2006). El nombre de “sífilis” fue asignado por el médico y filósofo Girolamo Frocastoro en su poema “*Syphilis sive morbus gallicus*” (sífilis o la enfermedad francesa) (Quétel, 1990). Las etapas de la sífilis fueron estudiadas y descritas por Philippe Ricord a principios del Siglo XIX (Lafond y Lukehart, 2006).

#### 1.1.1. Sífilis primaria

La infección se inicia cuando *T. pallidum* penetra a través de microabrasiones dérmicas o en las mucosas, típicamente resulta en un chancro en el sitio de la inoculación. La linfadenopatía regional moderada se asocia con la etapa primaria. El chancro se convierte en ulceración, aunque normalmente no es purulento. En los hombres heterosexuales, los chancros comúnmente se presentan en el pene, y algunos de los hombres homosexuales en el recto y ano. En las mujeres, el chancro ocurre generalmente en los labios o el cuello uterino. Debido a que el chancro es indoloro y se puede situar en un lugar anatómico poco visible, el diagnóstico de la sífilis en ocasiones se retrasa, hasta que las etapas posteriores de la enfermedad la hacen evidente. En consecuencia, la evaluación clínica puede ser complicada, ya que los chancros de algunos individuos no se ajustan a la descripción clásica

(Lafond y Lukehart, 2006). Esta lesión también puede situarse en zonas extragenitales como son: dedos, lengua y cavidad oral (Herrera-Ortiz *et al.*, 2015).

La sífilis no es estrictamente una enfermedad venérea, ya que también puede transmitirse por contacto de piel a piel, al besar o tocar las lesiones activas en labios, o senos como ocurría con las nodrizas que amamantaban a algún niño con sífilis congénita y contagiaban a niños sanos (Lee D. Cady, 1938; Willcox, 1960, 1974; Hackett 1963; Hong, 1997).

El chancro primario se desarrolla tres semanas después de la exposición, en promedio; el período de incubación oscila entre 10 y 90 días. Con base en datos de inoculación intradérmica de voluntarios humanos con dosis graduadas de *T. pallidum*, la dosis infecciosa media se estimó en 57 organismos. La rapidez con la que se desarrollan las lesiones es proporcional a la cantidad de bacterias inoculadas (Magnuson *et al.*, 1956; Lafond y Lukehart, 2006). Finalmente el chancro se cura espontáneamente dentro de cuatro a seis semanas; sin embargo, puede ser discernible en aproximadamente 15% de los pacientes durante el inicio de la sífilis secundaria (Mindel *et al.*, 1989). Los individuos infectados por el VIH son de dos a tres veces más propensos a tener la enfermedad primaria y secundaria de forma concurrente (Rompalo *et al.*, 2001).

### 1.1.2. Sífilis secundaria

Las manifestaciones se presentan principalmente dentro de los primeros tres meses de infección, cuando las bacterias se diseminaron hacia varios tejidos. Algunos de los síntomas son: dolor de garganta, dolor muscular, malestar general y pérdida de peso, y en 85% de los casos, linfadenopatía (Lafond y Lukehart 2006). Cuando las bacterias se diseminan por todo el cuerpo destruyen los capilares, generando un exantema cutáneo típico (Ingraham e Ingraham, 1998).

### 1.1.3. *Sífilis latente*

En los pacientes sin tratamiento, las manifestaciones de la sífilis secundaria suelen desvanecerse espontáneamente dentro de los primeros tres meses. Durante el primer año después de la infección, se considera sífilis latente temprana; cerca de 25% de los pacientes pueden presentar manifestaciones secundarias recurrentes. La sífilis latente tardía se considera como una infección asintomática de duración indefinida. Las pruebas serológicas durante la etapa latente tardía son positivas, no obstante, la transmisión sexual es poco probable (Lafond y Lukehart, 2006).

### 1.1.4. *Sífilis terciaria*

Los síntomas pueden presentarse de 20 a 40 años después de la infección (Lafond y Lukehart, 2006). Previo al surgimiento de los antibióticos, un tercio de los individuos con sífilis latente desarrollaban manifestaciones de sífilis terciaria. Actualmente, el 15% de los pacientes con sífilis no tratada desarrollan una inflamación nodular progresiva llamada goma, que puede presentarse en cualquier estadio de sífilis, incluyendo neurosífilis. La goma es una masa blanda, bien delimitada y de tamaño variable, constituida por linfocitos y células plasmáticas; además de treponemas que pueden observarse utilizando tinciones de plata o con inmunofluorescencia (Conde-Sendín *et al.*, 2002). Afectan distintos tejidos como son: piel, huesos, hígado, corazón, cerebro, estómago y tracto respiratorio superior (Lafond y Lukehart, 2006).

En esta etapa se producen distintas deformaciones óseas, entre las que se encuentran la nariz en forma de silla de montar y la tibia en forma de sable (Lafond y Lukehart, 2006), una condición que causa que la tibia parezca inclinada hacia delante, dándole una forma similar a la de un sable. La fíbula no está involucrada en el arqueo y los exámenes radiológicos revelan un canal medular vertical en la tibia; por lo tanto, la inclinación aparente se logra mediante la producción de hueso nuevo en la superficie anterior de la tibia. Esta deformación puede ocurrir en una o

ambas tibias, y entre las treponematosis es más común en la frambesia (Meyer *et al.*, 2002; Antal *et al.*, 2002)

Algunos cambios en el cráneo consisten en la presencia de pequeñas lesiones en forma de cráteres (Meyer *et al.*, 2002). Este tipo de daño es característico de la sífilis venérea, se produce por una inflamación gomosa extensa del periostio, frecuentemente con nódulos gomosos localizados, y acompañado de osteítis (inflamación del hueso). Lo que lleva a la destrucción del hueso y simultáneamente, a la producción de hueso nuevo en los bordes de las partes afectadas. Tales cicatrices producen un mellado, lineal, con depresiones estrelladas que presentan el daño mayor en el centro, con bordes elevados, suaves y redondeados. Los textos en inglés lo refieren como “*worm eaten*” (carcomido de gusano). Virchow (1858) empleó el término “*caries sicca*”, acuñado por Brandi (Williams, 1932).

#### 1.1.5. Neurosífilis

La neurosífilis es la afectación del SNC por *T. pallidum*; puede presentarse en cualquier etapa de la enfermedad. Se estima que se desarrolla en 4 a 10% de los afectados por sífilis (Conde-Sendín *et al.*, 2002). Algunos síntomas son: vértigo, insomnio y cambios de personalidad; seguidos por afectación arterial generalizada o focal. También suele haber pérdida de la conciencia y convulsiones (Lafond y Lukehart, 2006). De acuerdo con Conde-Sendín *et al.* (2002), las formas clínicas de la neurosífilis son: asintomática, meníngea, meningovascular, parálisis general progresiva y tabes dorsal (degeneración lenta de las neuronas sensoriales). A continuación, se enlistan diversas presentaciones de la neurosífilis.

Neurosífilis asintomática.- No hay síntomas, pero hay invasión del fluido cerebroespinal por parte de *T. pallidum pallidum*.

Neurosífilis meníngea.- Puede presentarse desde el primer año de la infección, suele asociarse a lesiones cutáneas, así como cefalea, náuseas y vómitos. Existen tres variantes de acuerdo con los síntomas predominantes:

- Hidrocefalia aguda sifilítica. Cefalea, náuseas y vómitos.
- Meningitis aguda del vértex. Afectación cortical (crisis convulsivas, confusión, delirio y déficit focales, entre ellos hemiplejía y afasia).
- Meningitis aguda basal. Afecta principalmente los pares craneales VII y VIII, seguido por el II y los oculomotores.

Neurosífilis meningovascular.- Sobreviene desde los primeros meses y hasta los 12 años después de la infección. Se da un proceso inflamatorio que destruye las fibras elásticas y musculares de la capa media, lo que produce una proliferación fibrosa subendotelial, y que provoca una oclusión irreversible de la luz de vasos capilares grandes y medianos (arteritis de Heubner), así como arteriolas (arteritis de Nissl) (Conde-Sendín *et al.*, 2002).

Parálisis general progresiva.- Suele aparecer de dos o tres décadas después de la infección. Incluye irritabilidad, cambios de personalidad, inestabilidad emocional, deterioro de la memoria, alucinaciones y reflejos hiperactivos (Conde-Sendín *et al.*, 2002; Lafond y Lukehart, 2006). En las fases avanzadas hay crisis convulsivas, pérdida de fuerza en las extremidades e incontinencia anal y vesical.

Tabes dorsal.- Se presenta de 18 a 25 años después de la infección. Hay atrofia de los cordones posteriores de la médula espinal y de la raíz dorsal del nervio raquídeo, y un engrosamiento de las meninges en su porción posterior. Se observa disminución del número de neuronas y cambios inflamatorios con infiltración de linfocitos y células plasmáticas. Entre los síntomas se encuentra: ataxia sensorial en extremidades inferiores, parestesias y vómitos repentinos con dolor abdominal (Conde-Sendín *et al.*, 2002). Puede haber sensación de dolor intenso que suele resultar en articulaciones de Charcot (lesiones tróficas en los tobillos, rodillas y caderas). En aproximadamente 20% de los casos de tabes hay daño del nervio óptico (Lafond y Lukehart, 2006).

### 1.1.6. Sífilis congénita

*T. pallidum* subespecie *pallidum* es capaz de infectar a un feto en desarrollo en cualquier momento del embarazo, ya que puede pasar por el torrente sanguíneo de la madre infectada a la placenta (Lafond y Lukehart, 2006; Harper *et al.*, 2011). El tratamiento con antibióticos durante los primeros dos trimestres de gestación, suele ser suficiente para evitar la infección en el feto. Si el tratamiento es posterior a los seis meses de embarazo o la ausencia de tratamiento, puede haber aborto espontáneo, muerte fetal, parto prematuro o el nacimiento de un bebé infectado (Lafond y Lukehart, 2006).

Los neonatos infectados suelen tener bajo peso, cerca del 4% mueren por hemorragia pulmonar y hepatitis. Las primeras manifestaciones son infecciosas y se asemejan a los síntomas graves de sífilis secundaria de adultos; por lo general se manifiestan de dos a diez semanas después del nacimiento (Lafond y Lukehart, 2006).

La invasión de la mucosa nasal por *T. pallidum* provoca rinitis persistente con una secreción blanquecina, que a veces se tiñe con sangre. Puede invadir los huesos y cartílagos de la nariz y el paladar, lo que lleva a una destrucción gomosa tardía en vida. Los neonatos con sífilis congénita temprana suelen tener lesiones en la piel parecidas a las de la fase secundaria en adultos, a veces acompañada de descamación de la piel de las palmas y plantas, condilomas planos y placas mucosas. Otras complicaciones pueden ser: anemia, hepatoesplenomegalia, afectación renal e ictericia; así como osteocondritis de los huesos largos que provoca dolor y falta de movimiento de las extremidades superiores e inferiores (seudoparálisis de Parrot) (Lafond y Lukehart, 2006).

Las manifestaciones tardías de la sífilis congénita se producen después de los dos años de vida. Entre los 5 y 25 años, la queratitis intersticial puede causar daños en córnea e iris. También pueden ocurrir artropatía, efusiones (acumulación de líquido sinovial en la articulación) bilaterales de las rodillas y los codos (articulaciones de

Clutton), y periostitis gomosa del paladar y del tabique nasal. Varias de estas manifestaciones persisten aun con tratamiento (Lafond y Lukehart, 2006).

En la cavidad oral se pueden observar los incisivos y primeros molares permanentes con esmalte reducido, además de hacinamiento y repliegue de las primeras cúspides molares, con muescas en los incisivos superiores e hipoplasia apical de los caninos permanentes, lo que se denomina incisivos de Hutchinson (Jacobi *et al.*, 1992). Los dientes de Hutchinson y los molares de luna son signos dentales típicos, considerados patognomónicos (que caracterizan y definen a una determinada enfermedad) de sífilis congénita (Hutchinson, 1863 en Hong, 1997).

#### 1.1.7. Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico de la sífilis se emplean dos o tres pruebas en serie. Si hay lesiones en la piel, se realiza una inmunofluorescencia con microscopía de campo oscuro. Comúnmente, se requieren pruebas serológicas, éstas se dividen en no treponémicas y treponémicas; las primeras son útiles para el cribado, y las segundas se utilizan como pruebas confirmatorias específicas (Larsen *et al.*, 1995; Marangoni *et al.*, 2000; Brown y Frank, 2003).

Microscopía de campo oscuro.- La identificación se basa en las características morfológicas y la motilidad de la espiroqueta. Durante la etapa primaria, el suero de las lesiones contiene una cantidad elevada de treponemas, por lo tanto, este método es útil durante la sífilis primaria cuando hay lesiones frescas y los anticuerpos aún no son detectables; o también se emplea en pacientes con inmunodeficiencia. Sin embargo, el éxito en el diagnóstico con esta técnica depende de la habilidad y experiencia del laboratorista, y no diferencia entre las subespecies de *T. pallidum* (Ratnam, 2005).

Prueba de inmunofluorescencia directa.- Se utiliza un anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína, específico para treponemas patógenos. Es útil en el análisis de muestras de lesiones orales y rectales. No obstante, esta prueba no

diferencia entre las subespecies de *T. pallidum* (Kellogg y Mothershed, 1969; Ratnam, 2005).

Pruebas no treponémicas.- Son rápidas, sencillas y de bajo costo. Las principales limitaciones son su sensibilidad baja durante la sífilis primaria y latente tardía, los resultados positivos falsos, debido a la reactividad cruzada; y los resultados negativos falsos debido a reacciones de interferencia producido por anticuerpos diana en concentraciones elevadas en una muestra (Ratnam, 2005).

En 1906 Wassermann *et al.* desarrollaron la primera prueba diagnóstica para la sífilis. En ésta se incubaba una muestra de sangre o de fluido cerebrospinal con el antígeno cardiolipina (un lípido exclusivo de la membrana bacteriana y mitocondrial interna); la presencia de reagina (anticuerpo considerado inespecífico de *T. pallidum*) induce una reacción con la cardiolipina, lo que se tomaba como un resultado positivo. Posteriormente se purificaron antígenos de lecitina, colesterol y la misma cardiolipina, que hicieron más específica la reacción; esta prueba se conoce como VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) (Harris *et al.*, 1946).

La prueba RPR (*Rapid Plasma Reagin*), es una modificación del VDRL, en la que el antígeno se mezcla con el suero de los pacientes en una tarjeta recubierta con plástico. La prueba RPR mide inmunoglobulinas IgM e IgG producidas por la liberación de material lipídico y lipoproteína de las células hospederas dañadas, así como cardiolipina de los treponemas (Portnoy, Brewer y Harris, 1962). Durante la sífilis primaria la sensibilidad promedio de las pruebas de RPR y VDRL son 86% y 78%, respectivamente, y durante la sífilis secundaria, ambas son de 100% (Larsen *et al.*, 1995).

Pruebas Treponémicas.- Si el VDRL o el RPR son positivos, se debe realizar una prueba confirmatoria. También, estas pruebas se utilizan en pacientes con resultados negativos en las pruebas no treponémicas, pero con signos y síntomas de la sífilis tardía. Estas pruebas son técnicamente más difíciles de realizar y más caras (Ratnam, 2005).

La MHA-TP (Micro Hemagglutination Assay for antibodies to *Treponema pallidum*) permite detectar anticuerpos treponémicos por medio de hemaglutinación, usando glóbulos rojos marcados con antígenos de *T. pallidum*. Posteriormente se desarrolló el TP-PA (aglutinación de partículas de *Treponema pallidum*) que utiliza el mismo antígeno treponémico que la prueba de MHA-TP, pero tiene la ventaja de utilizar partículas de gelatina en lugar de eritrocitos, lo que elimina las reacciones inespecíficas con muestras del suero (Ratnam, 2005).

En la FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*) o prueba de absorción de anticuerpos fluorescentes de treponema es la prueba confirmatoria por excelencia. Las muestras de suero se tratan previamente con un absorbente para eliminar los anticuerpos no específicos, se utiliza un compuesto de isotiocianato de fluoresceína para preparar el conjugado de globulina anti-humano marcado, y se observa al microscopio con una fuente de UV. Aunque estas pruebas son muy sensibles y específicas, pueden producir resultados variables debido a la variación en los equipos, reactivos e interpretación (Deacon *et al.*, 1957; Larsen *et al.*, 1995).

La técnica de *Western Blot* puede detectar anticuerpos IgG o IgM, proporciona una caracterización de la respuesta de los anticuerpos, a través de la visualización de patrones de bandas característicos. Se han desarrollado métodos de transferencia de *Western* usando lisados de células enteras y los antígenos recombinantes. La reactividad del anticuerpo a algunas de las bandas antigénicas treponémicas es altamente específico para la sífilis (Ratnam, 2005).

Debido a la dificultad para cultivar *T. pallidum in vitro*, éste debe ser inoculado en ratones, RIT (*Rabbit Infectivity Test*), es una prueba con alta sensibilidad, ya que detecta menos de 10 organismos (Turner *et al.*, 1969), sin embargo es impráctico y caro para ser utilizado como procedimiento de diagnóstico rutinario (Totten *et al.*, 2004).

La prueba de inmunocromatografía Determine® Syphilis TP de Laboratorios Abbott es un ensayo para la detección cualitativa que detecta anticuerpos contra antígenos de *T. pallidum* de forma rápida y efectiva. Se añade la muestra en la superficie absorbente de una tira reactiva y una gota de solución hemolisante, ésta fluye a través de la almohadilla de la tira hasta mezclarse con un conjugado coloide formado de selenio y antígenos de *T. pallidum*. La mezcla continúa su migración a través de la tira hasta una ventana donde se encuentran antígenos de *T. pallidum* inmovilizados. Si hay anticuerpos contra *T. pallidum* en la muestra del paciente, estos se unen al conjugado y se produce una banda roja indicadora de resultado positivo. Si no aparece la línea roja el resultado es negativo (UNDP y WHO, 2003; López y Estrada, 2005; Hernández-Trejo *et al.*, 2006; Conde-González *et al.*, 2007).

Las distintas pruebas de diagnóstico tienen limitaciones, su sensibilidad y especificidad varían de acuerdo al método utilizado y la fase de la enfermedad (Totten *et al.*, 2004). Las pruebas serológicas son insensibles en lesiones tempranas de pacientes en la etapa primaria y también en algunos con sífilis terciaria, además, no es posible diferenciar una infección actual de una pasada (Larsen *et al.*, 1981).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica efectiva y sensible para detectar el DNA de *T. pallidum* en muestras clínicas de líquido amniótico y fluido cerebroespinal de individuos con sífilis temprana y latente (Burstain *et al.*, 1991; Grimprel *et al.*, 1991; Noordhoek *et al.*, 1991; Marra *et al.*, 2004), también se ha empleado en individuos con lesiones gomosas terciarias de la piel, décadas después de la infección inicial (Zoechling *et al.*, 1997).

#### 1.1.8. Tratamiento

Desde principios del siglo XVI (probablemente varios siglos antes en Asia), la sífilis se trató con pequeñas dosis de mercurio, posteriormente con yodo y mercurio. En 1909, el bacteriólogo alemán Paul Ehrlich desarrolló la arsfenamina, un derivado del arsénico, que resultó efectivo contra *T. pallidum*, éste se comercializó bajo el nombre de Salvarsán (El-Najjar, 1979).

A partir del descubrimiento y comercialización de la penicilina en 1943, se tuvo un tratamiento efectivo para la sífilis, utilizada en todas las etapas (Lafond y Lukehart, 2006). Las alternativas para pacientes sin evidencia de afectación del sistema nervioso central son: doxiciclina, tetraciclina, ceftriaxona y azitromicina (Hook *et al.*, 2002; Brown y Frank, 2003). Recientemente se han encontrado cepas resistentes a estos antibióticos (Mitchell *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2009; Stamm, 2010), lo que hace que la sífilis siga siendo un problema de salud mundial (Fraser *et al.*, 1998).

### *1.1.9. Respuesta inmune*

La inmunización con subunidades flagelares de *T. phagedenis* y *T. pallidum* no induce una protección completa contra la infección por *T. pallidum*, probablemente porque los filamentos axiales no están expuestos en la superficie del organismo (Lafond y Lukehart, 2006). Se ha propuesto que la membrana externa es antigénicamente inerte (Penn y Rhodes, 1982).

Las lipoproteínas TpN47 y TpN17 estimulan a las células dendríticas, sin embargo, al no estar expuestas en la superficie de *T. pallidum*, la estimulación ocurre hasta que los organismos se degradan (Bouis, *et al.*, 2001). Lafond y Lukehart (2006) proponen que un retraso en la maduración de las células dendríticas, resulta en una respuesta inflamatoria más lenta, lo que permite la difusión temprana de la espiroqueta, dándole la oportunidad de penetrar en los órganos y tejidos antes de que surja una respuesta inflamatoria activa.

## **1.2. Biología de *T. pallidum***

### *1.2.1. Clasificación*

El organismo causante de la sífilis venérea fue identificado en 1905 por Schaudinn y Hoffmann. El método de tinción de Gram con trifenilmetano y yodo, para visualizar

las bacterias en los tejidos; estableció una división en dos grupos: Gram-positivas, que retienen la tinción; y Gram-negativas, que pierden la tinción con alcohol (Gram y Friedlaender, 1884). Las espiroquetas del género *Treponema* se clasifican en el segundo grupo (Penn *et al.*, 1985; Walker *et al.*, 1989; Izard *et al.*, 2009).

Su clasificación taxonómica es: Dominio: Bacteria; Filo: Spirochaetes; Clase: Spirochaetia; Orden: Spirochaetales; Familia: Spirochaetaceae; Género: *Treponema*; Especie: *Treponema pallidum*. En la figura 1.1 se muestra la ubicación taxonómica de *T. pallidum* y las seis cepas secuenciadas completamente hasta el momento.

El genoma de *T. pallidum pallidum* (cepa Nichols) fue secuenciado en 1998 por Fraser *et al.*, contiene 1,138,006 pares de bases (pb), con un total de 1,041 marcos de lectura abierta, que se consideran secuencias codificantes putativas. Disponible en el NCBI con número de acceso NC\_021490.2. En el año 2012 se secuenció la cepa México A, aislada en 1953 a partir de un joven de 18 años de edad, con sífilis primaria. Se determinaron 1,140,038 pb y 1,035 marcos de lectura abierta; secuencia disponible en el NCBI con número de acceso CP003064.1 (Pětrošová *et al.*, 2012).

La especie *Treponema pallidum* incluye la subespecie *pallidum* (sífilis venérea), y otras dos subespecies patógenas del humano, que causan enfermedades no venéreas; *T. pallidum endemicum*, causante del bejel o sífilis endémica; y *T. pallidum pertenue* que provoca la frambesia (yaws o pian) (Centurion-Lara *et al.*, 1996, 1997; Antal *et al.*, 2002; Regazzi-Avelleira y Bottino, 2006). Sobre *T. carateum*, causante de la pinta en humanos, no se han realizado estudios genéticos y morfológicos, por lo que se clasifica como una especie separada (Antal *et al.*, 2002). En conjunto a estas enfermedades provocadas por treponemas, se les denomina treponematosi (Hudson, 1928). La cepa Fribourg-Blanc, aislada a partir de babuinos (Fribourg-Blanc y Mollaret, 1968), también es capaz de infectar humanos, de forma experimental (Smith *et al.*, 1971).

Bacteria  
   Spirochaetes  
     Spirochaetia  
       Brachyspirales  
       Brevinematales  
       Leptospirales  
       Spirochaetales  
         Borreliaceae  
         Spirochaetaceae  
           *Salinispira*  
           *Sphaerochaeta*  
           *Spirochaeta*  
           *Spironema*  
           *Treponema*  
             *Candidatus Treponema suis*  
             *Treponema amylovorum*  
             *Treponema azotonutricium*  
             *Treponema berlinense*  
             *Treponema brennaboreense*  
             *Treponema bryantii*  
             *Treponema caldarium*  
             *Treponema calligyrum*  
             *Treponema denticola*  
             *Treponema isoptericolens*  
             *Treponema lecithinolyticum*  
             *Treponema maltophilum*  
             *Treponema medium*  
             *Treponema minutum*  
             *Treponema pallidum*  
               *Treponema pallidum* str. Fribourg-Blanc  
               *Treponema pallidum* subsp. *endemicum*  
               *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*  
                 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* DAL-1  
                 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* SS14  
                 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* str. Chicago  
                 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* str. Mexico A  
                 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* str. Nichols  
                 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* str. Sea 81-4  
               *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*  
             *Treponema paraluisuniculi*  
             *Treponema paraluisleporis*  
             *Treponema parvum*  
             *Treponema pectinovorum*  
             *Treponema pedis*  
             *Treponema phagedenis*  
             *Treponema porcinum*  
             *Treponema primitia*  
             *Treponema putidum*  
             *Treponema refringens*  
             *Treponema saccharophilum*  
             *Treponema socranskii*  
             *Treponema stenostreptum*  
             *Treponema succinifaciens*  
             *Treponema vincentii*  
             *Treponema zioleckii*  
             *Treponema zuelzeri*  
             *Treponema* genomosp. P1  
             *Treponema* genomosp. P2  
             *Treponema endosymbiont*  
             *Treponema* sp.  
           unclassified Spirochaetaceae  
           environmental samples  
         unclassified Spirochaetales  
         environmental samples  
       environmental samples  
     unclassified Spirochaetes

Figura 1.1. Ubicación taxonómica de *T. pallidum*. Fuente: NCBI.

Las subespecies de *T. pallidum* son morfológicamente idénticas e inducen anticuerpos de reacción cruzada, lo que impide la diferenciación serológica (Antal *et al.*, 2002; Lafond y Lukehart, 2006). Se distinguen entre sí por las manifestaciones clínicas de cada enfermedad y por sus diferencias genéticas, principalmente en la familia de 12 genes parálogos (A-L) llamada *tpr* (*Treponema pallidum repeat*), relacionados con la patogenia de estas espiroquetas (Fraser *et al.*, 1998; Centurion-Lara *et al.*, 1998, 2006; Gray *et al.*, 2006). Al comparar con AMOVA (Análisis Molecular de la Varianza) los genes *tprC*, *tprI*, y *tprK* de las tres subespecies se observó una cantidad significativa de variación entre subespecies (70 a 95%,  $p = 0.000$ ), lo que indica una separación legítima entre estos grupos (Gray *et al.*, 2006). En la figura 1.2 se muestra la diferenciación entre las distintas subespecies de *T. pallidum* con respecto al gen *tprC*.

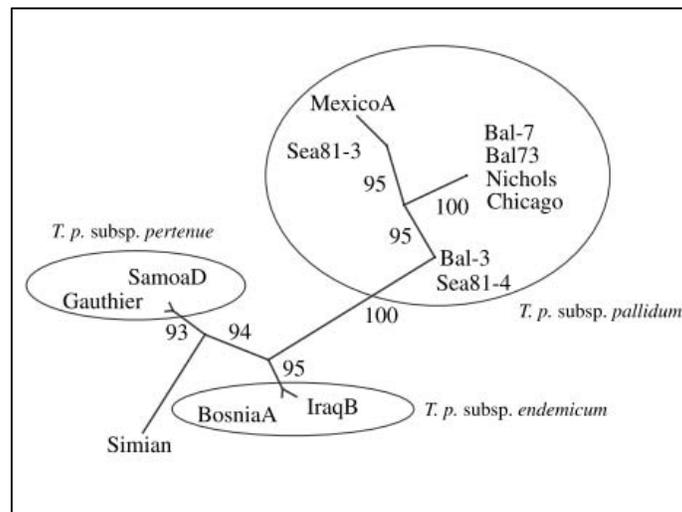


Figura 1.2. Árbol de máxima probabilidad con base en las secuencias nucleotídicas del gen *tprC*. Tomado de Gray *et al.* (2006).

### 1.2.2. Morfología

*T. pallidum* mide de 5 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.09 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Holt, 1978). Es posible observarlo con el microscopio de campo oscuro o con una tinción inmunofluorescente (Lafond y Lukehart, 2006).

Su morfología en espiral es consecuencia de una pared celular delgada y flexible de peptidoglicanos, que presenta fibrillas axiales (endoflagelos) alrededor. Posee una membrana externa, sobre la cual se forma una capa adherente de ácido hialurónico que puede contribuir a su patogenia. Las espiroquetas muestran movimiento rotatorio y flexión (Holt, 1978; Lafond y Lukehart, 2006).

### 1.2.3. *Metabolismo limitado*

*T. pallidum* posee actividad catabólica y biosintética limitada (Fraser *et al.*, 1998). La espiroqueta es capaz de llevar a cabo glucólisis (Nichols y Baseman, 1975; Schiller y Cox, 1977; Fraser *et al.*, 1998), no obstante, carece de genes que codifiquen algún componente del ciclo del ácido tricarboxílico y de la fosforilación oxidativa (Fraser *et al.*, 1998). El análisis de su genoma demostró que es incapaz de sintetizar cofactores enzimáticos, ácidos grasos y nucleótidos de *novo*, que permitan el uso de fuentes de carbono alternativas para la producción de energía. Sólo puede obtener desoxirribonucleótidos a través de la reducción de ribonucleósidos difosfato, por la acción de la ribonucleótido difosfato reductasa y la tiorredoxina reductasa (Fraser *et al.*, 1998).

Esta deficiencia de vías metabólicas sugiere que *T. pallidum* obtiene la mayoría de las macromoléculas esenciales del huésped (Lafond y Lukehart, 2006), por medio de varios transportadores homólogos de aminoácidos y carbohidratos codificados en su genoma (Fraser *et al.*, 1998).

*T. pallidum* es un parásito obligado, ya que no es capaz de vivir fuera de un hospedero, no puede ser cultivado *in vitro* continuamente (Fieldsteel *et al.*, 1981). Para llevar a cabo una manipulación experimental puede inocularse en monos, ratones y conejos (Turner y Hollander, 1957; Norris, 1982), siendo este último el modelo más utilizado. Ya que la inoculación en conejos es vía intradérmica e intratesticular, resulta en una secuencia de eventos similares a la de la sífilis en el

hombre, tanto clínica como histológicamente (Turner y Hollander, 1957; Baker-Zander y Sell, 1980; Sell, *et al.*, 1980).

Esta bacteria es microaerófila, ya que es susceptible al oxígeno, en cultivos. Se ha observado que crece mejor a una concentración de 1.5% de este elemento (Cox y Barber, 1974; Fieldsteel *et al.*, 1981). No posee genes que codifiquen para enzimas que protejan contra la toxicidad del O<sub>2</sub> como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. La NADH oxidasa es la única enzima identificada hasta el momento, que puede explicar la utilización de O<sub>2</sub> por *T. pallidum* (Fraser *et al.*, 1998).

*T. pallidum* carece de un factor  $\sigma_{38}$  reconocible (*rpoS*), principal factor implicado en la respuesta al estrés oxidativo y osmótico. Tampoco se ha encontrado un factor  $\sigma_{32}$ , asociado a la transcripción de las proteínas de choque térmico (Fraser *et al.*, 1998), lo que explica porque esta bacteria tiene una limitada respuesta al aumento de temperatura (Stamm *et al.*, 1991).

En *T. pallidum*, a diferencia de la mayoría de las bacterias Gram negativas, se cree que el peptidoglicano se une con las proteínas de la membrana interna (Radolf *et al.*, 1989a). Además, carece de lipopolisacáridos (LPS) (Penn *et al.*, 1985; Radolf *et al.*, 1988; Fraser *et al.*, 1998), que proporcionan estabilidad estructural, lo que explica, la fragilidad de su membrana externa (Lafond y Lukehart, 2006). Estos factores dificultan el cultivo *in vivo* e *in vitro* de *T. pallidum*, y hacen imposible su manipulación genética (Lafond y Lukehart, 2006).

#### 1.2.4. Factores de virulencia potenciales

*T. pallidum* contiene una familia de doce genes parálogos (*tpr A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K* y *L*) que codifican proteínas putativas de membrana, éstas podrían funcionar como porinas y adhesinas. Los genes *tprA* y *tprL* contienen un marco de lectura dentro de una pequeña repetición dinucleótido que pueden ser corregidos por deslizamiento de la cadena. La producción de copias múltiples de los genes *tpr*

podría explicar el mecanismo para la generación de la variación antigénica en esta espiroqueta (Fraser *et al.*, 1998).

Se han propuesto que siete regiones variables dentro del gen *tprK* surgieron por conversión de génica, con secuencias de las regiones flanqueantes del gen *tprD* como donador. El grado de diversidad en estas regiones variables parece aumentar en presencia de la presión inmune adaptativa, lo que sugiere que una función de estas conversiones de genes puede ser la creación de la diversidad antigénica (Centurion-Lara *et al.*, 2004).

Hasta ahora no se ha hallado algún factor de virulencia que explique los signos y síntomas de la sífilis, además de la ausencia de LPS, endotoxina causante de fiebre e inflamación (Lafond y Lukehart, 2006). La membrana externa está constituida principalmente por lípidos, con escasas proteínas integrales (Radolf *et al.*, 1988; Radolf *et al.*, 1989b; Walker *et al.*, 1989). El análisis de su genoma reveló 22 lipoproteínas putativas. En consecuencia, las pruebas de diagnóstico existentes para la sífilis no son óptimas, y no existe una vacuna contra esta enfermedad (Fraser *et al.*, 1998).

El genoma de *T. pallidum pallidum* de la cepa México A muestra un mosaico en los genes TPAMA\_0326 y TPAMA\_0488. La combinación de ambas secuencias de nucleótidos específicas de las subespecies *pallidum* y *pertenue*, es un resultado característico de un evento de recombinación, posterior a la transferencia horizontal de genes, probablemente durante la infección simultánea de un mismo hospedero. Estos hallazgos sugieren la importancia de la transferencia horizontal de genes en la evolución de los treponemas patógenos (Pětrošová *et al.*, 2012).

### 1.3. Origen de la Sífilis

Son pocas las enfermedades que el ser humano haya documentado desde que surgieron. En este sentido, la sífilis tiene un inicio, aunque es impreciso y controvertido. De acuerdo con Crosby (1969), desde la última década del siglo XV, varias personas refieren saber cuándo apareció la sífilis en el escenario mundial, e incluso de dónde viene. En los escritos de Desiderio Erasmo en el año 1517, el autor dice que: *“De todas las desgracias que cayeron sobre Europa, Erasmo catalogó al mal francés (sífilis) como la enfermedad más contagiosa, más terrible para sus víctimas, y la más difícil de curar”* (Erasmus, 1965 en Crosby, 1969). Ulrich Von Hutten uno de los corresponsales de Erasmo, escribió a principios del siglo XVI, *“esta enfermedad más sucia y más grave comenzó a extenderse entre el pueblo”* (Hutten, 1540 en Crosby, 1969).

En 1494 las tropas del rey Carlos VIII de Francia sitiaron Nápoles con mercenarios de Suiza, Italia y España, se cree que esta guerra ayudó a que la sífilis se esparciera por toda Europa, una vez que los soldados regresaron a sus países de origen provocando una epidemia en el verano de 1495 (Quétel, 1990; Meyer *et al.*, 2002).

Existen tres hipótesis principales sobre el origen de la sífilis: la unitaria, que postula que la sífilis venérea, la frambesia, el bejel y la pinta, son una misma enfermedad, llamada treponematosis, y que los cambios ambientales pueden transformar al patógeno para que pase de una fase a otra; por lo tanto siempre ha estado con el ser humano (Hudson, 1928, 1958, 1965; Butler, 1936; Hamlin, 1939; Grin, 1956).

La colombina, que postula que la sífilis fue llevada de América a Europa por Colón y su tripulación en 1493 (Diaz de Isla, 1539; Hayhurst, 1927; Harrison, 1959; Dennie, 1962; Crosby, 1969; Baker y Armelagos, 1988; Rothschild y Rothschild, 1996), y su antítesis (precolombina) que plantea que la sífilis fue llevada de Europa a América por los conquistadores españoles (Hyde, 1891; Holcomb, 1934, 1937; Cockburn, 1961; Hackett, 1963; Brothwell, 1970; Willcox, 1972).

### 1.3.1. Hipótesis unitaria

Sugiere que los treponemas han evolucionado con los cambios sociales y culturales de las poblaciones humanas. Para Hudson (1965) “*la treponematosi se originó durante el periodo paleolítico en el clima cálido y húmedo del África subsahariana. Ésta afectaba principalmente a los niños (frambesia), transmitida por contacto directo con la piel. La enfermedad fue llevada por los cazadores recolectores en sus migraciones por todo el mundo. En los grupos que se trasladaron a zonas más secas, la bacteria invadió las zonas húmedas del cuerpo (boca, axilas e ingle), originando la sífilis endémica (bejel). Con el desarrollo de la civilización, el aumento de la higiene personal, la limpieza de los utensilios de cocina, la construcción de viviendas, etc., se bloquearon la mayoría de las vías de transmisión de los treponemas. Sin embargo, algunas de estas bacterias invadieron tejidos y órganos internos, principalmente huesos, arterias y el sistema nervioso; con esto la única vía de transmisión que quedó, fueron los genitales; surgiendo así la sífilis venérea*”.

Los argumentos de Hudson no son aceptados, incluso por los unitarios. Ya que todas las subespecies del grupo *T. pallidum* son lábiles y sensibles a las diferencias de temperatura y humedad, por lo que no podrían adaptarse a los cambios abruptos de clima y de los hábitos humanos (Hackett, 1963; Crosby, 1969). La sensibilidad diferencial de los hámsteres y conejos a los distintos treponemas demuestra que las subespecies de *T. pallidum* no son el mismo organismo y no pueden cambiar de una a otra (Rothschild y Rothschild, 1996). Los conejos son susceptibles a *T. pallidum pallidum* y se ven poco afectados por *T. pallidum pertenue*. Por el contrario, los hámsteres son susceptibles a la subespecies *endemicum* y *pertenue*, y son afectados escasamente por la subespecie *pallidum* (Schell *et al.*, 1981).

Recientemente la hipótesis unitaria ha sido desacreditada por la evidencia molecular, que demostró que las tres subespecies treponémicas presentan diferencias genéticas (Fraser *et al.*, 1998; Centurion-Lara *et al.*, 1998, 2006; Gray *et al.*, 2006), por lo que no se trata del mismo organismo causando diferentes

enfermedades. En cuanto a las otras dos hipótesis (colombina y precolombina), es necesario hacer una revisión del contexto histórico y de la literatura alrededor de los años posteriores al contacto europeo.

### *1.3.2. Hipótesis colombina*

Gonzalo Fernández de Oviedo publicó en 1526 un libro titulado *De la Natural Historia de las Indias*. En éste describe el *lignum vitae* y las virtudes de esta madera para curar la sífilis, proveniente de las indias (Hong, 1997).

Ruy Díaz de Isla, un médico español, nacido en 1493, escribió un tratado llamado *“Fruto de todos los Santos, contra el mal serpentino, venido de la isla española”* (Díaz de Isla, 1539), haciendo referencia a la isla de Santo Domingo. Díaz optó por utilizar “mal serpentino” para referirse a la sífilis, que en ese tiempo era conocida como mal francés, napolitano, portugués, italiano, castellano, etc. (de Villalba, 1803; Crosby, 1969; Meyer *et al.*, 2002). En dicho tratado menciona que él había curado de esta enfermedad a personas de muchos pueblos en Castilla, Aragón y Portugal, administrando mercurio (de Villalba, 1803).

En América se han encontrado esculturas precolombinas que representan estados patológicos similares a alguna treponematosi (figura 1.3) (Weisman, 1966).



**Figura 1.3. Escultura de cerámica de sexo masculino con el cuerpo cubierto de lesiones en la piel que se asemejan al frambesía y la pinta. Colima, México. 200-600 d. C. Tomado de Weisman (1966).**

Crosby (1969) argumenta que la sífilis no es mencionada en los antiguos escritos de Galeno y Avicena, por lo que asume que debió tener un carácter diferente en ese tiempo o que no existía en esa época y lugar. Además, señala que, en el siglo XVI, los médicos, cirujanos y laicos describieron a la sífilis como una enfermedad nueva. También menciona que los restos de los antiguos egipcios y nubios no muestran lesiones que sugieran sífilis, en un periodo que abarca 60 siglos.

Cartwright y Biddiss (1972) mencionan que *“la sífilis venérea se reportó por primera vez en Europa a finales del siglo XV, poco después del regreso de Cristóbal Colón proveniente de América, y se convirtió en epidemia, extendiéndose por todo el mundo a principios del siglo XVI”*.

Para Harrison (1959) la falta de referencias sobre sífilis venérea en los escritos antes de finales del siglo XV; los reportes posteriores de que era una enfermedad nueva; la ausencia de huesos precolombinos con lesiones parecidas a las de la sífilis venérea en Europa (hasta ese momento) y la presencia de este tipo de lesiones en los restos óseos de los nativos indígenas de América; son evidencias a favor de la hipótesis Colombina.

### *1.3.3. Hipótesis precolombina*

Se cree que la sífilis venérea se encontraba en Europa, antes de los viajes de Cristóbal Colón, pero fue confundida con otras enfermedades, principalmente con la lepra. Esto es apoyado por las referencias a “la lepra venérea” y “lepra hereditaria” en los siglos XIII y XIV. Entre 1490 y 1500, el Papa Alejandro VI abolió los asilos de leprosos, liberando así a muchos enfermos sifilíticos en Europa (Holcomb, 1934). Actualmente no hay reportes de transmisión venérea ni hereditaria de lepra, por lo que es más probable que se tratara de sífilis (El-Najjar, 1979).

Los chinos y los árabes utilizaron inhalaciones de vapor de mercurio y en forma de unguento durante miles de años para tratar la “lepra”. Durante las Cruzadas en los Siglos XII y XIII se trataba a los leprosos con pomadas que contenían mercurio. Sin embargo, el mercurio es ineficaz contra la lepra, en cambio, se utilizó para tratar la sífilis hasta principios del Siglo XX (Steinbock, 1976, citado en El-Najjar, 1979).

Cockburn (1961) propone que la treponematosi originalmente era una sola enfermedad, que se derivó en varias, conforme el ser humano se extendió por el mundo. Las condiciones ecológicas diferentes y el aislamiento geográfico

produjeron distintos tipos de treponemas y con el tiempo, diferentes enfermedades. La sífilis surgió en el Viejo Mundo como una adaptación del patógeno, cuando aumentaron las medidas de higiene y la oportunidad para la transmisión de piel a piel se redujo.

Por su parte Hackett (1963) propone que la pinta fue la primera forma de treponematosis hace unos 15,000 años, sin embargo quedó aislada en América cuando el puente intercontinental del estrecho de Bering se derritió. En África y algunas partes de Asia las condiciones ambientales favorecieron a los treponemas mutantes que producen la frambesia. A partir de estos, se desarrolló la sífilis endémica, aproximadamente en el 7,000 a. C., y a la vez de ésta, la sífilis venérea, aproximadamente en el 3,000 a. C., en el suroeste de Asia. A finales del siglo XV una mutación adicional produjo una cepa de *T. pallidum* más virulenta en Europa, que, con la exploración europea y la expansión geográfica, se extendió por todo el mundo.

Brothwell (1970) menciona que la existencia de esqueletos antiguos en Asia sugieren que la sífilis se originó en ese continente hace más de 2,000 años. Posteriormente, se extendió al oeste de Europa con la expansión del imperio árabe, y a través del pacífico hacia América.

Willcox (1972) propone que los distintos treponemas surgieron como resultado de la mutación y la selección natural de acuerdo con las condiciones ambientales. Y también ubica el origen de la sífilis en Europa debido al aumento de las condiciones higiénicas.

#### *1.3.4. Hipótesis alternativa*

La hipótesis alternativa propone que la subespecie *pallidum* evolucionó a partir de la subespecie *endemicum*; que cambió su modo de transmisión a la vía sexual, como respuesta adaptativa a las zonas templadas, dónde las personas usan ropa y

la transmisión por contacto directo es más difícil. Esta hipótesis ubica el origen de la sífilis venérea en África, ya que en el tiempo del contacto europeo-americano también se incrementó el contacto con el continente africano (Livingstone, 1991).

Algunos investigadores sugieren que la sífilis ha afectado al ser humano desde su origen y por lo tanto ha estado siempre en todo el mundo como sífilis venérea (Lobdell y Owsley, 1974), los análisis de reloj molecular desacreditan esta hipótesis, debido a que *T. pallidum* debería tener una tasa de sustitución nucleotídica demasiado lenta comparada incluso con eucariontes, lo que resulta improbable (de Melo, 2010).

#### **1.4. Paleopatología**

El estudio de las enfermedades a través de la evidencia documental es útil, no obstante, estos registros suelen llevar a conclusiones erróneas; principalmente debido a errores de transcripción, traducción e interpretación inadecuada, además de ambigüedades en la descripción de la enfermedad y la datación de los acontecimientos (Hong, 1997). Por lo que es necesario apoyarse en la evidencia osteológica recuperada de las excavaciones arqueológicas (Baker y Armelagos, 1988).

La paleopatología es el estudio de las enfermedades en las poblaciones prehistóricas a través del análisis de restos óseos, tejidos y coprolitos. Debido a que algunas infecciones pueden producir marcas en el esqueleto humano, es posible describir los patrones seguidos por estos patógenos en poblaciones antiguas, así como establecer cronologías relativas (Inhorn y Brown, 1990).

#### 1.4.1. Evidencia ósea en el Viejo Mundo

La evidencia de treponematosi más antigua en el Viejo Mundo ha sido hallada en África, en un *Homo erectus* de 1.6 millones de años de antigüedad, en la formación de Koobi Fora, al este del lago Turkana en Kenia. Este individuo presenta un engrosamiento de hasta 7mm en las diáfisis de los huesos largos, producto de una reacción perióstica intensa, que sugiere que estaba infectado con frambesia. “Estos hallazgos parecen confirmar la hipótesis de Cockburn y de Hudson, sobre un origen africano para la enfermedad treponémica” (Rothschild *et al.*, 1995).

Rösing (1999) reportó un posible caso frambesia hallado entre los esqueletos egipcios del imperio antiguo. Asimismo, en Sudáfrica se encontró un esqueleto perteneciente al año 1000 a 1300 d. C., este individuo muestra signos de infección treponémica en las tibias, fíbulas, fémures y el húmero derecho, además de criba orbitaria (porosidad en el techo de la órbita en el cráneo) (Steyn y Henneberg, 1995).

La mayor evidencia de treponematosi precolombina en el Viejo Mundo proviene de Europa. Anteriormente se pensaba que se trataba de casos no venéreos, sin embargo a partir de la década de 1990 se ha recabado más información sobre aquellos relacionados con sífilis venérea (Hong, 1997). Principalmente si se consideran a la *caries sicca* y los dientes de Hutchinson como signos patognomónicos de sífilis venérea. En la tabla 1.1 se muestran los reportes destacados de sífilis en el Viejo Mundo.

**Tabla 1.1. Reportes destacados de sífilis en el Viejo Mundo.**

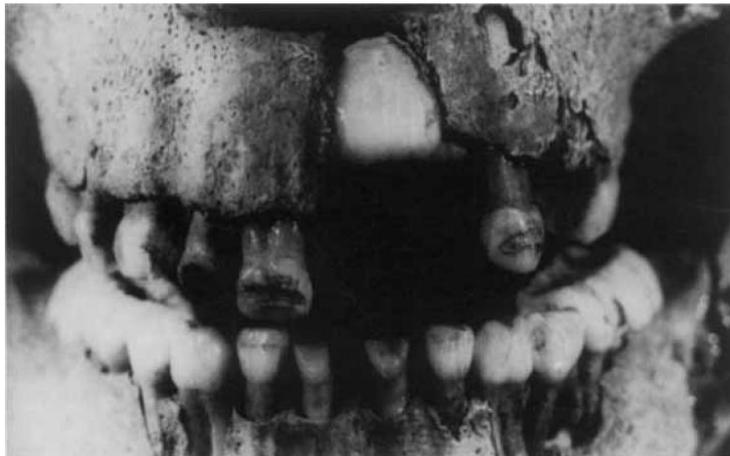
Ciudad	temporalidad	Signos principales	Patología reportada	Referencia
Metaponto, Italia	580—250 a. C.	<i>caries sicca</i> , tibia de sable, dientes de Hutchinson	sífilis, sífilis congénita	Henneberg y Henneberg, 1994, 1995
Costebelle, Francia	siglo III-IV	cambios patológicos de sífilis congénita	sífilis congénita	Pálfi <i>et al.</i> , 1992
Liseux, Francia	siglo IV	periostitis de ambas tibias y <i>caries sicca</i>	sífilis	Blondiaux <i>et al.</i> , 1994
Kingston, Inglaterra	1300—1450 d. C.	periostitis en tibia y <i>caries sicca</i>	sífilis	Evans, 2000
Norwich, Inglaterra	1110—1468 d. C.	<i>caries sicca</i>	sífilis	Stirland, 1991, 1994
Gloucester, Inglaterra	siglo XV	<i>caries sicca</i>	sífilis	Roberts, 1994
Breda, Países Bajos	siglo XIII—XVII	porosidades en y parietal, similar a <i>caries sicca</i>	sífilis	Brooks, <i>et al.</i> , 1994
Lecce, Italia	siglo XIV—XVI	reacción perióstica en cráneo y postcráneo	probable sífilis	Fornaciari <i>et al.</i> , 1994
York, Inglaterra	1265—1389 d. C.	gomas en parietales y frontal	probable sífilis	Daws y Magilton, 1980
Niederspital de Burgdorf, Suiza	1446—1528 d. C.	marcas patológicas en frontal, malar y postcráneo	sífilis	Lanz, 1997
Londres, Inglaterra	1197—1537	marcas patológicas en cráneo	sífilis	Morant y Hoadley, 1931
Fujian, China	960—1279 d. C.	<i>caries sicca</i>	sífilis	Zhang, 1993
la isla de Tonga (Oceanía)	800—1700 d. C.	<i>caries sicca</i>	sífilis	Buckley, 2000
Isla Motupore, Papua Nueva Guinea	1200—1700 d.C.	cavitación nodular, <i>caries sicca</i> y tibia de sable	sífilis	Webb, 1995, 2009

De forma similar hay reportes precolombinos de sífilis en Irlanda (Power, 1992), Suecia (Madrid, 1986), Polonia (Gladykowska-Rzeczycka, 1994), Rusia (Rokhlin, 1965) y Bulgaria (Marcsik, 1994).

Se han reportado casos de treponematosis no venérea en Calvados, Francia (Blondiaux *et al.*, 1994; Blondiaux y Alduc-Le Bagousse, 1994), Alemania (Kuhnen *et al.*, 1999), Agripalle, Andhra, India (Rao *et al.*, 1996), Bhimbetka, India (Kennedy, 1990), Islas Marianas (Stewart y Spoehr, 1952), Isla de Guam (Douglas, 2016), Isla de Tonga (Pietrusewsky, 1969) y Australia (Webb, 1995, 2009).

#### 1.4.2. Evidencia ósea en América

En Virginia, E. U. A., se encontraron dos casos de infección treponémica. Se trata de un adulto con lesiones en el frontal y tibias de “sable”, y un niño de tres a cuatro años de edad, con reacción perióstica en tibia y otros huesos largos, además de hipoplasia dental (figura 1.4). Los restos fueron datados entre 1000 a 1400 d. C. Este defecto hipoplásico en los incisivos sólo pudo ocurrir en el útero, debido a que esta porción del diente se desarrolla durante el séptimo mes fetal, lo que sugiere sífilis congénita (El-Najjar, 1979; Ortner, 1992, 2003).



**Figura 1.4.** Cráneo de niño con hipoplasia dental. Tomado de El-Najjar (1979)

En Arizona E. U. A., se hallaron los restos de un esqueleto del año 900 al 1100 d. C., que presenta destrucción gomosa y necrosis ósea en el cráneo, lo que le produjo *caries sicca* (figura 1.5) (El-Najjar, 1979).



**Figura 1.5.** Cráneo con ósea destrucción gomosa y necrosis. Tomado de El-Najjar (1979).

En el continente americano hay varios casos de restos óseos con signos que sugieren sífilis, sin embargo, los diagnósticos no son concluyentes o están sujetos a controversia. Principalmente en E. U. A., donde se realiza la mayor parte de la investigación en el tema, en los estados de: Florida; (Snow, 1962; Bullen, 1972; Lamb, 1898), Ohio (Orton, 1905), Arkansas (Moore, 1913; Wakefield *et al.*, 1937; El-Najjar, 1979), Nuevo México (Hooton, 1930), Arizona (Denninger, 1938; Cole *et al.*, 1955), Alabama (Haltrom y Shands, 1938; Rabkin, 1942), Kentucky (Snow, 1948), Texas (Goldstein, 1957), California (Roney, 1966), Tennessee (Jones, 1880). También hay algunos reportes en República Dominicana (Rothschild *et al.*, 2000), Chile y Perú (Krumbhaar, 1936; Kaye, 2008).

En E. U. A. se han reportado abundantes restos óseos con marcas que sugieren alguna treponematosi no venérea o indefinida, principalmente en los estados de: Ohio (Means, 1925), Alaska (Holcomb, 1940), Alabama (Rabkin, 1942), Oklahoma y Texas (Brues, 1958), Illinois (Morse, 1967), Kentucky (Cassidy, 1980), Nueva York

(Elting y Starna, 1984), Georgia (Powell, 1988), Carolina del Norte (Bogdan y Weaver, 1988; Reichs, 1989), Florida (Hutchinson, 1993), Luisiana (Lewis, 1994), Nuevo México (Rothschild y Rothschild, 1996).

En el resto de América hay reportes de treponematosi s indefinida en: Perú (MacCurdy, 1923; Tello y Willams, 1930; Krumbhaar, 1936; Gerszten *et al.*, 1998), Las Antillas (Gejvall y Henschen, 1971), Guatemala (Saul, 1972), Colombia (Burgos *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1998), Chile (Gerszten *et al.*, 1998) y Puerto Rico (Crespo, 1999).

En México hay varios restos óseos prehispánicos con marcas que sugieren alguna treponematosi s, descritos a continuaci3n:

Uruñuela (1998) reporta un individuo hallado en Atoyac, Jalisco, con una antigüedad del 600 al 1100 a. C. Presenta huesos con hipertrofia ósea en algunos casos involucrando también destrucci3n localizada, además de periostitis en el cráneo.

En Jalisco, en las Tumbas de Tiro del Cañ3n de Solanos, Torres-Sanders (2001) report3 el caso de 88 individuos inmaduros (infantes, adolescentes y subadultos) y 84 adultos, en donde al menos el 30% de los infantes y el 82% de los adultos, estaban afectados por sifilis endémica.

En Zacatecas, Sonora y Coahuila se han reconocido casos de treponematosi s en esqueletos con cráneos y tibias afectados por engrosamientos, periostitis y secuestros craneales (fragmentos de hueso necrosados, separado del resto por tejido de granulaci3n) (Uruñuela, 1998).

Torres-Sanders (2003) considera que los casos de treponematosi s reportados en la Regi3n Occidente de la Repúblic a Mexicana se deben a sifilis endémica; esto con base en el número de sujetos y las edades a las que se presentan los cambios.

En Tehuacán, Puebla, se encontró un individuo que data del 900 al 200 a. C. con distintas lesiones óseas destructivas y proliferativas, con lesión craneal que podría ser por treponematosi (Anderson, 1965).

En las colecciones del Museo Nacional de Antropología e Historia se reportan varios casos de treponematosi provenientes de: Yécora, Sonora; Tampico, Tamaulipas; Tula, Hidalgo; Miacatlán, Morelos; y de la Ciudad de México algunos del Pedregal de San Ángel, Churubusco y Tlatelolco (Brothwell, 1978 en Uruñuela, 1998). Además de cuatro individuos recuperados durante las excavaciones del Sistema de Transporte Colectivo Metropolitano (Salas-Cuesta, 1982 en Uruñuela, 1998).

En la zona de La Candelaria, Coahuila, México, se encontró una cueva con restos de más de 100 individuos (Martinez del Rio, 1953), que fueron fechados por radiocarbono ( $^{14}\text{C}$ ) entre 1095 a 1315 d. C. (un fragmento textil y una muestra ósea). Al menos 44 cráneos y 129 tibias muestran lesiones de treponematosi (Mansilla y Pijoán, 2000). Pineda *et al.* (1998) sugieren que se trata de lesiones típicas de sífilis, ya que analizaron el cráneo de un adulto que, a su consideración, presenta *caries sicca*, además de un infante de tres años de edad con periostitis en tibias, fíbulas, húmeros, radios y cúbitos. Con base en el fechamiento de  $^{14}\text{C}$ , Mansilla y Pijoán (2000) mencionan que “*se puede afirmar casi con certeza que los materiales esqueléticos depositados en la cueva corresponden a una población prehispánica*”. Sin embargo, los hallazgos de esta cueva son controvertidos debido a que entre los abundantes materiales prehispánicos se encontró un plato de cerámica posiblemente de origen colonial. Ya que los saqueadores profanaron el sitio antes de ser descubierto por los investigadores, se cree que esta pieza de cerámica podría haber sido introducida por los ladrones (Pineda *et al.*, 1998).

Estas investigaciones arqueológicas, en conjunto, demuestran que la evidencia ósea al igual que la documental, está rodeada de desacuerdos y controversias (Baker y Armelagos, 1988). La mayor de las limitaciones en la paleopatología es que las tres treponematosi se manifiestan con lesiones similares; en la mayoría de

las infecciones que afectan al esqueleto esencialmente se presenta resorción, proliferación, anomalías en el crecimiento y formación de hueso. Por lo tanto, varias enfermedades producen cambios óseos similares a los generados por alguna treponematosi; lo que dificulta el diagnóstico de la sífilis, incluso al analizar huesos frescos (Harper *et al.*, 2011). Aunado a esto, existe una superposición en las manifestaciones clínicas entre las treponematosi. Aun cuando se considera que solamente en la sífilis hay afectación del SNC e infección congénita, algunos autores argumentan a favor de evidencias de infección del SNC, cardiovascular, y congénita en casos de frambesia (Bandyopadhyay, 1926; Roman y Roman, 1986).

Asimismo, la hipoplasia dental (presente en los dientes de Hutchinson) no tiene una etiología específica; ya que hay varias enfermedades que pueden alterar el desarrollo de los dientes (raquitismo, viruela, sarampión, escorbuto, fluorosis, etc.) (El-Najjar *et al.*, 1978). Se estima que la evidencia arqueológica de las lesiones por sífilis congénita es menor al 5% (Rothschild y Rothschild, 1997).

Otra limitación es que el registro osteológico no permite tener la evidencia de todos los individuos que estuvieron infectados (Weisman, 1966). El daño óseo en las treponematosi se presenta en cerca de 1 al 20% (Harper *et al.*, 2011); además, la breve esperanza de vida que tenían los humanos en los períodos prehistóricos y a principios de la historia es otra factor a cosiderar; ya que la aparición de las lesiones esqueléticas a una edad temprana, es menor (Weisman, 1966); por lo que varios esqueletos de los sitios arqueológicos que no presentan lesiones óseas, probablemente estuvieron infectados en vida (Donoghue *et al.*, 2009); sobretodo considerando que no había antibióticos ni forma de protegerse de las enfermedades de transmisión sexual.

De forma análoga, esto se ha confirmado con la detección de DNA antiguo de patógenos (*M. tuberculosis*) en restos humanos sin deformaciones óseas (Faerman *et al.*, 1997; Zink *et al.*, 2001; Bouwman y Brown, 2005), considerando que de 3 a

5% de los individuos infectados con tuberculosis desarrollan lesiones en el esqueleto (Donoghue *et al.*, 2009).

Por último, debe considerarse el contenido de alimentos marinos (reservorio marino) en las poblaciones analizadas, ya que éste puede alterar el resultado de la datación con  $^{14}\text{C}$  (Meyer *et al.*, 2002; Harper *et al.*, 2011).

### 1.5. Análisis Filogenéticos

Rothschild (2003) propone que *T. pallidum pertenue* estaba presente desde el origen de los humanos modernos en África, siendo la más ancestral de las tres subespecies de *T. pallidum*, y que las otras dos derivaron de *pertenue*. El autor sugiere que *T. pallidum pallidum* surgió en América hace no más de 2000 años. Sin embargo, la subespecie *pallidum* presenta variación genética en el gen *tprI* y varios eventos de conversión génica dentro de *tprC*, *D*, *G* y *J*, que sugieren un proceso evolutivo antiguo en la historia humana. Estos resultados moleculares sobre la evolución de las tres subespecies treponémicas humanas son compatibles en general con la hipótesis de Hackett (1963) (Gray *et al.*, 2006).

Harper *et al.* (2008) analizaron 21 regiones genéticas de cepas de *Treponema* provenientes de distintas áreas geográficas. De acuerdo con los autores, “*T. pallidum* surgió en el Viejo Mundo, en una forma no venérea, antes de propagarse con los humanos, en forma de sífilis endémica, hacia el este de Europa y Medio Oriente, y después hacia América, en forma de frambesia. Posteriormente una cepa de *T. pallidum* del Nuevo Mundo fue introducida nuevamente en el Viejo Mundo, probablemente como resultado de la exploración europea de las Américas, convirtiéndose en el progenitor de las cepas modernas causantes de sífilis”. No obstante, este análisis fue desacreditado por el número limitado de polimorfismos de DNA analizados (cuatro SNP's) en dos muestras colectadas en un mismo lugar.

Además, tres de estos SNP's causan cambios no sinónimos y se producen en una región corta (cerca de 15 aminoácidos) de la proteína *tprl*. Esta es una tasa de cambio evolutivo elevada, en un género que se caracteriza por pocos cambios en sus secuencias. Por último, se cree que *tprl* está involucrado en la patogénesis y por lo tanto está sujeta a los efectos de la selección natural, lo que viola los supuestos de la filogenia (Mulligan *et al.*, 2008).

De Melo *et al.* (2010) realizaron un análisis con las mismas secuencias que Harper *et al.* (2008) combinando un método de inferencia bayesiana y puntos de calibración de tiempo obtenidos del registro arqueológico de huesos humanos con treponematosi, dando lugar a intervalos de confianza para la verosimilitud del origen de esta interacción humano-patógeno. También excluyeron regiones que podrían estar involucrados en eventos de recombinación y que presentan un número elevado de sustitución no sinónima.

Al utilizar 1.6 millones de años como la fecha de la primera evidencia de treponematosi en el género *Homo* (Rothschild *et al.*, 1995) se obtiene una tasa de sustitución por sitio por año diez veces más baja en comparación con *E. coli*, incluso más baja que la encontrada en humanos y otros eucariontes, lo que resulta improbable. Al restringir el TMRCA (tiempo del ancestro común más reciente) de *T. pallidum* subespecie *pallidum* al momento del regreso de Colón a Europa, hace 500 años, la tasa de evolución estimada fue considerablemente mayor de lo esperado para las bacterias, y no permite explicar la mayor parte del registro óseo. Con un TMRCA entre el momento del poblamiento de América, aproximadamente 16500 a. C. (Goebel *et al.*, 2003) y la fecha de datación de la evidencia más antigua de un caso probable de sífilis venérea en el mundo, 5000 a. C (Burgos *et al.*, 1994), es plausible que esta enfermedad haya surgido durante este lapso de tiempo, ya que la tasa de evolución resultante es compatible con la observada en otras bacterias (de Melo *et al.*, 2010).

Los autores reconocen las limitaciones que afrontan y aceptan que sus resultados deben ser tomados con cautela. Entre los motivos principales están: *“los criterios de diagnóstico sobre treponematosis en huesos antiguos difieren entre los distintos informes, por lo que una reevaluación de todos los casos posibles con métodos estandarizados podría arrojar resultados diferentes”... “La ausencia de una tasa de reloj molecular adecuada para el grupo T. pallidum limita las posibilidades de una estimación precisa de las fechas de aparición de clados específicos de treponemas. Por lo tanto, no se puede excluir que la tasa de evolución de T. pallidum se encuentre fuera del rango observado para otras bacterias”*. Además, con su resultado *“no se resuelven las dudas sobre el lugar de origen de la sífilis”* (de Melo et al., 2010).

## **1.6. DNA antiguo**

El tema del origen de la sífilis deba abordarse de forma multidisciplinaria, esto es, desde una perspectiva ecológica, social, histórica, médica, antropológica, filogenética, y más recientemente en la conjunción entre la biología molecular y la paleopatología, ha surgido la paleopatología molecular.

Generalmente, los procesos evolutivos que generaron a las especies y poblaciones actuales, se infieren mediante análisis morfológicos y marcadores genéticos, junto con estudios de abundancia y de patrones de distribución. Sin embargo, el análisis de organismos contemporáneos sólo puede proporcionar una prueba indirecta de la historia y las reconstrucciones son tentativas si no pueden ser comparadas con el registro fósil. Si bien esto ha sido posible durante mucho tiempo para caracteres morfológicos, el DNA antiguo (aDNA) está proporcionando un método para registrar también los cambios genéticos en tiempo real, por lo menos durante breves escalas de tiempo geológicas. Una serie de estudios a gran escala han comenzado a revelar el verdadero potencial de aDNA para registrar los métodos y procesos de la

evolución, proporcionando una manera única de probar los modelos y las hipótesis utilizadas para reconstruir los patrones de evolución, la genética de poblaciones y el cambio paleoecológicos (Willerslev y Cooper, 2005).

Los primeros estudios de aDNA utilizaron la clonación bacteriana para amplificar pequeñas secuencias nucleotídicas recuperadas a partir de pieles de animales y momias humanas (Higuchi, *et al.*, 1984; Pääbo, 1985, 1989). Estos estudios demostraron la ineficiencia de esta técnica, principalmente porque el material genético que sobrevive en especímenes antiguos es esencialmente de origen microbiano o fúngico, y el DNA endógeno se encuentra en concentraciones bajas, y generalmente, se limita a fragmentos cortos y dañados, pero de múltiples copias como es el DNA mitocondrial (mtDNA). La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido ampliar de forma rutinaria y estudiar moléculas de DNA, favoreciendo que el número y variedad de estudios de aDNA aumenten rápidamente (Pääbo y Wilson, 1988; Pääbo, 1989; Pääbo, *et al.*, 1989).

Sin embargo, la investigación del aDNA presenta varias dificultades técnicas, debido a las cantidades pequeñas y las condiciones de degradación del DNA, aunado al riesgo de contaminación (Austin *et al.*, 1997; Cooper y Poinar, 2000).

#### *1.6.1. Degradación del DNA*

El daño en el DNA se acumula con el tiempo en las células inactivas (muertas o latentes), debido a factores tales como la hidrólisis y la oxidación espontánea, en consecuencia, las muestras más antiguas no contienen DNA endógeno amplificable. El daño *post-mortem* del DNA se caracteriza por la ruptura de las hebras, sitios irreales y enlaces cruzados. Estos provocan artefactos de secuenciación y la amplificación preferencial del DNA contaminante no dañado (Pääbo, 1989; Höss *et al.*, 1996). Condiciones de pH ligeramente ácido inducen la transformación de la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) mineral del hueso en brushita ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Piepenbrink, 1989). Un pH ácido es perjudicial tanto para el DNA

como para el material óseo. La degradación del DNA es la razón más común de falla de la PCR (Hummel, 2003).

Debido al proceso de degradación, cualquier DNA que esté presente, por lo general es poco frecuente, y en la mayoría de las veces, una falla de amplificación se debe a la inhibición y no a una sobrecarga de DNA. Por lo que una limpieza exhaustiva de las muestras, llevaría a una probabilidad mayor de éxito de amplificación, sin embargo, cualquier procedimiento de limpieza implica la pérdida de DNA (Hummel, 2003).

Las temperaturas bajas y constantes juegan un papel central en la longevidad del aDNA ya que ralentizan los procesos responsables de la degradación post-mortem de los ácidos nucleicos en restos arqueológicos (Lindahl, 1993; Höss *et al.*, 1996; Willerslev *et al.*, 2004b; Hofreiter *et al.*, 2001). Por el contrario, las muestras procedentes de regiones cálidas poseen DNA dañado y no producen amplicones (Höss *et al.*, 1996). El diseño de *primers* debe buscar que los productos sean lo más corto posible y no superen los 200 pb (Hummel, 2003).

Los reportes de aDNA con mayor antigüedad confiables por su autenticación, provienen de muestras conservadas en permahielo (capa de suelo permanentemente congelado conocido en inglés como *permafrost*), incluyen un bisonte de más de 65,000 años, DNA de cloroplasto (cpDNA) de 300,000 a 400,000 años de antigüedad y secuencias bacterianas de 400,000 a 600,000 años (Willerslev *et al.*, 2003, 2004a, 2005). Otras condiciones, como son: la desecación rápida y concentraciones salinas elevadas, también puede prolongar la supervivencia del DNA (Lindahl, 1993). Aun en condiciones ideales, se considera que el DNA amplificable no sobrevive más de 1 millón de años (Willerslev y Cooper, 2005).

Las muestras de material esquelético excavado que están destinados a las investigaciones moleculares deben almacenarse congelados tan pronto como sea

posible después de la excavación, ya que el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente, destruye el DNA conservado durante miles de años (Hummel, 2003).

### 1.6.2. Contaminación

Uno de los mayores problemas se presenta cuando la propia muestra ha sido contaminada antes del análisis molecular. Diversos restos arqueológicos parecen contener DNA de varios individuos (Gilbert *et al.*, 2003a, b). Esto ocurre frecuentemente cuando los especímenes han sido manipulados durante la excavación, por una variedad de personas que pueden tener marcadores de DNA similares, o incluso idénticos al de la muestra antigua (Cooper, 1997; Serre, *et al.*, 2004). A pesar de los protocolos rigurosos en el trabajo con aDNA (Cooper y Poinar, 2000; Hofreiter *et al.*, 2001), la contaminación con DNA humano actual es común en los productos de amplificación a partir de extractos antiguos (Richards, Sykes, y Hedges, 1995; Handt, *et al.*, 1996; Krings *et al.*, 1997; Hofreiter *et al.*, 2001).

También parece imposible eliminar el DNA humano actual que llega a los huesos y dientes antiguos, a pesar de los tratamientos intensivos con radiación UV y cloro (Gilbert *et al.*, 2005). La porosidad del hueso y la dentina son las principales vías de entrada del DNA contaminante generado por el sudor, fragmentos de piel y células exhaladas; debido a esto es necesario utilizar guantes desechables y mascarillas durante la excavación y manipulación de especímenes arqueológicos (Willerslev y Cooper, 2005).

La otra forma de contaminación surge en el laboratorio, en una reacción de PCR exitosa un volumen de menos de 50  $\mu\text{L}$  puede contener de  $10^{12}$  a  $10^{15}$  moléculas de DNA amplificadas. El movimiento de aire creado al abrir los tubos de PCR o la transferencia de líquidos, pueden dispersar gotas microscópicas de aerosol, que suelen contener más de un millón de copias del DNA blanco por cada 0.005  $\mu\text{L}$ . Como consecuencia, los productos de PCR se distribuyen rápidamente en distintas

superficies de los laboratorios, pasillos y en edificios enteros, por medio del movimiento del personal y los sistemas ventilación. Debido a esto, un laboratorio de aDNA debe estar completamente aislado física y lógicamente, de preferencia en edificios libres de investigación en biología molecular. Además, el movimiento del personal sólo debe proceder desde los laboratorios de aDNA a los de contemporáneo (Willerslev y Cooper, 2005).

Los daños del DNA inducidos por UV, se producen a través de la formación de anillos de ciclobutano entre pirimidinas (timina o citosina) adyacentes. Los anillos de ciclobutano forman dímeros de pirimidina intra-catenarios (*cross-linking*) que inhiben la elongación de la cadena a cargo de la polimerasa (Cone y Fairfax, 1993). No obstante, la efectividad de la irradiación del equipo de trabajo con UV de onda corta (254 nm) para prevenir la contaminación es dudosa. La superficie debe estar perpendicular a la fuente de UV para alcanzar la intensidad óptima. Las superficies inclinadas diluyen la intensidad, por lo tanto los objetos como pipetas, no pueden ser descontaminados con eficacia por la radiación UV; ya que sólo una fracción de la superficie se enfrenta a la fuente de UV (Cone y Fairfax, 1993; Niederhauser *et al.*, 1994).

También, los productos de PCR cortos no contienen un número suficiente de pirimidinas adyacentes, para que sean objetivos susceptibles al UV. La sensibilidad al UV de una región amplificada, puede ser estimado contando el número de sitios dimerizables (pirimidinas adyacentes: CT, TT, TC, CC) en cada hebra de la secuencia (Cone y Fairfax, 1993). El entrecruzamiento del DNA de doble hebra solamente se alcanza si la distancia de irradiación es menor a 5 cm (con una lámpara de 30 vatios), y si el tiempo de irradiación es mayor a 2 horas (Hummel, 2003). Asimismo se propone que la irradiación del DNA con UV solamente es eficaz en soluciones acuosas (Sarkar y Sommer, 1990; Cimino *et al.*, 1990).

El hecho de que no haya controles negativos con amplicones observables no significa necesariamente que no hay contaminación. Esto sólo significa que no se

puede ver en esta etapa del proceso de PCR (el límite de detección de DNA de etidio-bromuro de agarosa teñido es 2 ng transiluminado por UV de 254 nm) (Hummel, 2003).

En toda amplificación, nunca es posible excluir por completo la contaminación, sin importar el número de controles negativos que se procesen y aunque en todos ellos no se detecte DNA; la muestra puede haber sido contaminada y los controles negativos no (Hummel, 2003). La replicación independiente de los resultados por otro laboratorio es actualmente el argumento más fuerte en contra de la contaminación surgida en el laboratorio, ya que es poco probable que se obtenga la misma secuencia errónea, de forma independiente, en dos ocasiones, por distintas personas (Willerslev y Cooper, 2005).

### 1.6.3. Artefactos

Los inhibidores residuales son la segunda razón más importante para la falla de la PCR en el aDNA. Una falla de este tipo se reconoce por la ausencia de dímeros de *primers*, la falta de barrido inespecífico o de otros productos de amplificación inespecíficos (Hummel, 2003). Algunas moléculas de DNA libres en el suelo se unen fuertemente a los bordes de los ácidos húmicos, arcillas, feldespato y cuarzo, lo que limita su movimiento y la degradación por endonucleasas (Willerslev y Cooper, 2005).

Generalmente las sustancias inhibidoras provienen del suelo, que contiene ácidos húmicos, taninos ( $C_{14}H_{14}O_{11}$ ), productos de Maillard y ácidos fúlvicos. Estos componentes se derivan principalmente de la descomposición de material vegetal e inhiben la actividad de la *Taq*-polimerasa. Las cantidades reales de cada uno de los grupos químicamente heterogéneos en un entorno determinado depende de factores como el tipo de plantas que crecen en la zona, los valores de pH, temperatura y humedad (Hummel, 2003).

El DNA microbiano del suelo puede también provoca artefactos de PCR. Cuando se realizan ensayos de PCR con muestras antiguas, las cuales estuvieron en contacto con el suelo por cientos de años, la mayor parte del DNA amplificado es de origen microbiano. Este DNA en las muestras proviene de microorganismos que colonizaron los cadáveres poco después de la muerte, aunque también proviene de microorganismos recientes (Höss *et al.*, 1996). Al utilizarse *primers* que se considera son específicos para un determinado taxón bacteriano, debido a la compleja microbiota de las muestras antiguas, pueden obtenerse distintas secuencias con un mismo tamaño (Wintzingerode *et al.*, 2006). Esto se debe a que actualmente el número de especies de procariontes y arqueas que han sido descritas, es sólo una estimación. La mayor parte de la diversidad microbiana, aún no ha sido descrita; sólo se conoce del 1 al 5%. La cantidad de especies secuenciadas y registradas en las bases de datos, es aún menor (Ward *et al.*, 1992; Wintzingerode *et al.*, 2006).

#### 1.6.4. *Jumping PCR y productos quiméricos*

Cuando la *Taq* DNA polimerasa se encuentra con el final de una plantilla dañada, a veces inserta un residuo de adenosina; el producto terminado prematuramente, salta a otra plantilla y la polimerización continúa, produciendo una recombinación *in vitro*. En consecuencia, los productos de amplificación a partir de plantillas dañadas como el aDNA, se componen de una alta proporción de moléculas quiméricas (Pääbo, Irwin, y Wilson, 1990; Höss, Handt y Pääbo, 1994).

Las moléculas quiméricas, están compuestas por dos secuencias diferentes (Wintzingerode *et al.*, 2006). Estas quimeras de DNA pueden surgir cuando las secuencias con alta similitud están presentes en una reacción como plantillas. Un fragmento elongado incompleto durante la fase de extensión de la PCR, genera una hebra naciente más corta, que, en un ciclo posterior, puede competir con los *primers*, unirse con una secuencia heteróloga y elongarse. La secuencia quimérica producida tiene su extremo 5' correspondiente a la primera plantilla y el 3' de la

plantilla heteróloga (Bhavsar, Zheng y Drysdale, 1994; Wintzingerode *et al.*, 2006; Roratto *et al.*, 2008).

#### 1.6.5. Cuantificación

La mayoría de los extractos aDNA no contienen cantidades significativas de secuencias de DNA superior a los 200 pb. Cuando se cuantifica un extracto de aDNA, la espectrofotometría sólo mide el contenido de ácidos nucleicos, pero no distingue la longitud de los fragmentos. Aun cuando, las longitudes pueden estimarse mediante electroforesis, en una prueba de integridad, el DNA procedente de microorganismos suele sesgar la evaluación. Por lo que únicamente la amplificación por PCR, permite saber, si se encuentra o no, la secuencia buscada (Hummel, 2003).

La cuantificación del número de copias de plantilla por PCR en tiempo real es útil cuando se amplifica una secuencia única (Handt *et al.*, 1996). Pero no, cuando se utilizan cebadores universales para obtener secuencias de una variedad de taxones (por ejemplo, estudios microbianos o vegetales). Los resultados obtenidos de las amplificaciones a partir de menos de 1,000 moléculas de molde han demostrado ser difíciles de reproducir y pueden estar sesgados por la incorporación errónea de bases (Handt *et al.*, 1996; Gilbert *et al.*, 2003a). La cuantificación tampoco permite saber si algunas o todas de las moléculas de inicio, son o no, de origen contaminante (Willerslev y Cooper, 2005).

#### 1.6.6. Secuenciación

Si el producto de PCR es puro, es decir, si se origina a partir de las secuencias diana de un solo individuo, la secuenciación directa es la forma más eficiente para generar información correcta. De hecho, es suficiente si la mayoría de los productos proceden de un solo organismo, ya que las señales de la secuencia se superponen a posibles secuencias minoritarias. Dado que la relación mayoría: minoría es al

menos 10:1, esto da lugar generalmente a una secuencia perfectamente legible. Si se detecta una mezcla de moldes de DNA, la secuenciación directa no conduce a un resultado viable, por lo que es necesario clonar el producto antes de secuenciar (Hummel, 2003).

#### *1.6.7. Criterios de autenticidad*

A mediados de la década de 1990 fue evidente la necesidad de autenticar los resultados de aDNA, una vez que se muestrearon varios estudios de alto perfil, que fueron irreproducibles (Austin *et al.*, 1997; Cooper y Poinar, 2000). Actualmente se han establecido los siguientes criterios de autenticidad para trabajar con aDNA:

Áreas de trabajo aisladas físicamente, controles negativos de extracción y amplificación, comportamiento molecular apropiado (tamaño de producto pequeño), reproducibilidad (PCR's y extracciones múltiples), clonación del producto, réplica independiente, preservación bioquímica (otras biomoléculas en la muestra), cuantificación y restos asociados (Cooper y Poinar, 2000).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Paleopatología Molecular de la Sífilis

En teoría, cualquier patógeno que invade el sistema sanguíneo o tejidos duros podría dejar trazas de DNA en los restos óseos, después de la muerte del hospedero (Bouwman y Brown, 2005), esto ha llevado al surgimiento de la paleopatología molecular.

#### 2.1.1. Detección de aDNA de *T. pallidum*

En 1991 Burstain *et al.* desarrollaron un ensayo de PCR sensible a *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*, y propusieron que la detección de esta espiroqueta por medio de PCR, en muestras arqueológicas, ayudaría a resolver las controversias en torno al origen de la sífilis.

Los primeros intentos de aislar aDNA treponémico se realizaron a partir el tejido muscular de individuos momificados con signos de treponematosi terciaria, recuperados en El Morro, Arica y San Miguel de Azapa, en Chile (trabajo presentado por Rogan y Lentz en el Taller paleogenética, en el Congreso Mundial de Estudios de la momia, 1995). Los autores lograron amplificar el DNA de espiroquetas, pero no era específico para *T. pallidum* (von Hunnius *et al.*, 2007).

Rollo *et al.*, (1996) intentaron confirmar la sífilis venérea en María de Aragón, una momia de la abadía de San Domenico Maggiore en Nápoles, perteneciente a la época del Renacimiento. Los autores usaron un gen de rRNA 16S, inespecífico, los resultados de la secuenciación directa mostraron una similitud de 85% con *T. pallidum*, no obstante, cuando se clonaron los amplicones, no se detectó DNA treponémico; en su lugar se aislaron varios géneros como *Propionibacterium*,

*Mycobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium* y *Capnocytophaga* (von Hunnius *et al.*, 2007).

En 1999, Kolman *et al.* detectaron el DNA de *T. pallidum* subsp. *pallidum* en un esqueleto de 200 años de antigüedad, que presentaba tibias en “forma de sable”, recuperado en la isla de Pascua (*Easter Island*), actualmente territorio político de Chile. Los autores estudiaron una mutación puntual de T por C (denominado *tpp15*), que se presenta en la región no codificante 5' UTR (*Untranslated Region*) del gen que codifica para la lipoproteína de membrana de 15 kDa. Esta mutación es específica de la subespecie *pallidum*, y origina un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Eco47III* (Centurion-Lara *et al.*, 1998).

### 2.1.2. Resultados negativos

Varios autores (Bouwman y Brown 2005; Barnes y Thomas, 2006; von Hunnius *et al.*, 2007) han realizado análisis exhaustivos sobre preservación de DNA humano y de *T. pallidum* en huesos de diferentes edades y antigüedades, la mayoría de las cuales presentaban signos sugerentes de sífilis venérea. Para ello utilizaron varios genes del género *Treponema* como son: la familia de *tpr*, *polA*, *tp47*, *GPD*, y el mismo ensayo de PCR de Kolman *et al.* (1999) para amplificar *tpp15*. En los tres estudios no se detectó evidencia de DNA treponémico. Los autores sugieren que el DNA de esta espiroqueta no se conserva en los huesos humanos, y que, por lo tanto, no es viable el uso de ensayos de PCR para estudiar la sífilis venérea. Además, mencionan que los estudios previos deben ser interpretados con precaución, y debe ponerse mayor énfasis en la comprensión de cómo el DNA del patógeno sobrevive en el material arqueológico.

### 2.1.3. *tprJ* en momias sudamericanas

Kaye (2008) realizó un análisis molecular, con *primers* de *tprJ*, en restos precolombinos momificados, del norte de Chile y sur del Perú, que presentaban signos de treponematosi, como parte de su tesis de doctorado. En sus resultados reportó la presencia de una secuencia de 52 pb (de un fragmento esperado de 142 pb), de probable origen treponémico. Este marcador no permite diferenciar entre subespecies de *T. pallidum*, lo que solamente sugiere que el individuo pudo sufrir de alguna treponematosi.

### 2.1.4. aDNA de *T. pallidum* en neonatos

En 2012 Montiel *et al.* analizaron los restos de neonatos con signos de sífilis congénita, recuperados de una cripta de La Ermita de la Soledad, en la provincia de Huelva, España. Para esto utilizó un fragmento de 106 pb del gen *arp* (*acidic repeat protein*) con *primers* diseñados por ellos mismos, y el fragmento de 119 pb (*tpp15*) (Kolman *et al.*, 1999). Sus resultados constituyen el reporte de los restos más antiguos (Siglo XVI-XVII), hasta la fecha, en los que se ha logrado la detección de DNA de la bacteria causante de la sífilis venérea.

### 2.1.5. Tuberculosis en restos de Tamtoc y Pajones

En 2014 Steffani-Vallejo, como parte de su tesis de licenciatura, realizó el análisis molecular en busca de DNA de *M. tuberculosis* en restos óseos provenientes de Pajones, Zacatecas (entierro 9); Tamtoc, San Luis Potosí (entierro 47); y del Hospital de San José de los Naturales, Ciudad de México; y dos muestras españolas. Obteniendo una secuencia a partir del entierro de Tamtoc, con un porcentaje de identidad del 77% con la inserción repetitiva IS1081 de *Mycobacterium tuberculosis*, de forma similar con las dos muestras españolas (Ezkaba 78% y Armentia 83 79%), y resultados negativos para los entierros de los otros sitios de México.

Martínez-Mora *et al.* (2014) reportaron la detección DNA perteneciente a la inserción repetitiva IS6110 de *M. tuberculosis*, realizado a partir de muestras de tejido óseo de la columna vertebral de un individuo perteneciente al sitio prehispánico de Pajones, Zacatecas (Entierro 9).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

Buscar e identificar el DNA *Treponema pallidum* en siete individuos antiguos de México pertenecientes al periodo prehispánico.

#### 3.2. Objetivos Particulares

- 1) Extraer el DNA endógeno de los siete huesos prehispánicos que presentan marcas sugerentes de sífilis.
- 2) Buscar y aislar el DNA *T. pallidum*.
- 3) Identificar el producto amplificado a nivel de subespecie.
- 4) Determinar el haplogrupo A, B, C y D; y el haplotipo de la RHI del mtDNA humano.

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1. Sitios Arqueológicos

#### 4.1.1. Tamtoc

La ciudad prehispánica de Tamtoc se encuentra en la huasteca potosina, en el municipio de Tamuín, San Luis Potosí (figura 4.1). En la parte norte, se localiza la zona conocida como La Noria, caracterizada por la presencia varios túmulos funerarios y el Monumento 32 (La Sacerdotisa), colocado sobre una caja de agua (Córdova-Tello *et al.*, 2009).

En 2008, 2009 y 2011, como parte del proyecto arqueológico: “Origen y Desarrollo del Paisaje Urbano de Tamtoc, S.L.P.”, a cargo de la Maestra en Arqueología Estela Martínez Mora, se recuperaron al menos 50 esqueletos humanos, de ambos sexos, con edades a la muerte que no superan la quinta década de vida. Depositados en posición sedente y orientados al este franco, todos los individuos comparten marcas características de alguna patología, como pueden ser llagas y la deformación de la espalda, que debió darles una apariencia física semejante en vida. Se propone que estas marcas se deben al menos a dos enfermedades distintas, frambesia y tuberculosis (Hernández-Espinoza, 2012). Sumando el trabajo de las nueve temporadas de campo realizadas en Tamtoc, se han recuperado 105 esqueletos con procesos infecciosos severos, todos en la zona de La Noria (G. Córdova-Tello, comunicación personal).

La antigua ciudad de Tamtoc, por su importancia regional, es considerada uno de los asentamientos más importantes de la región Huasteca. Tuvo varios periodos de ocupación, por lo menos tres: el más antiguo corresponde a la época del surgimiento de la urbe ocurrido cerca del 400 a.C. El siguiente fue entre los años 400 d.C. al 600 d.C., cuando llegaron pobladores que rediseñaron el aspecto urbano de la ciudad.

La última etapa fue entre el 900 y hasta la llegada de los hispanos a la región; fue la época de apogeo, se incrementó la población y se desarrolló notablemente la actividad constructiva. Su desarrollo como urbe destacada en la región se vio truncado por el nuevo orden impuesto por los peninsulares. (Córdova-Tello *et al.*, 2009, 2012).

#### 4.1.2. Pajones

El sitio arqueológico de Pajones se ubica en el Municipio de Chalchihuites, Zacatecas (figura 4.1), dentro del Rancho de La Soledad, propiedad de la familia Cuevas Carrillo (Córdova, 2004; Martínez-Mora *et al.*, 2014).

El sitio se compone por un patio hundido, con un altar al centro, escalinatas en sus cuatro costados y banquetas elevadas que conectan a diversos cuartos situados en todos los laterales del patio, incluyendo una pequeña estructura piramidal en la parte sur. Este conjunto arquitectónico debió ser utilizado para actividades cívico-religiosas, además de albergar al líder del poblado y sus parientes cercanos (Córdova, 2004; Martínez-Mora *et al.*, 2014).

Pajones fue construido por gente perteneciente a la cultura Chalchihuites, un pueblo principalmente minero, elaboraban su cerámica decorada con diseños de dioses y seres quiméricos, adornos de lujo manufacturados con piedra azul-verde, de la región, además de turquesa, procedente de Arizona y Nuevo México, E. U. A. Su arquitectura es compleja y vinculada a su cosmogonía. Los chalchihuites habitaron el sitio, produjeron y distribuyeron bienes de prestigio durante, al menos, quinientos años (400 d.C. - 900 d. C.) (Martínez-Mora *et al.*, 2014).

En las excavaciones que forman parte del proyecto arqueológico “Valle del río Súcil, Zacatecas y Durango”, a cargo del Maestro en Arqueología Guillermo Córdova Tello, se han encontrado al menos cuatro esqueletos con huellas que sugieren tuberculosis vertebral (Martínez-Mora *et al.*, 2014), además de un individuo

con un severo proceso infeccioso que involucra tibias en “forma de sable” (G. Córdova-Tello, comunicación personal).

#### *4.1.3. Gasolinera-Kiosko*

El Occidente de Mesoamérica fue un área cultural que abarcó los estados actuales de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán. El estudio de las culturas antiguas de esta zona es reciente, los datos acerca de la cultura, costumbres, organización política y social, etc., son escasos. En los últimos años, la demanda habitacional ha aumentado, particularmente en Colima, lo que ha provocado el incremento en la construcción de viviendas. Esto ha llevado al descubrimiento de numerosos vestigios arqueológicos y enterramientos humanos, pertenecientes a temporalidades que van desde el Formativo hasta el Postclásico y proceden tanto de áreas ceremoniales como habitacionales (Murillo-Rodríguez y Macín-Pérez, 2007).

La Gasolinera Kiosko se ubica en Colima, Colima (figura 4.1); el sitio se descubrió durante la excavación consignada a la construcción de una gasolinera en el año 2009. El salvamento arqueológico fue realizado por la Antropóloga Física Bernardette Zaldívar, quien tuvo como aval académico a la Dra. Ángeles Olay Barrientos (R. M. Flores-Ramírez, comunicación personal). Los materiales recuperados se resguardaron en el área de Investigación del Centro INAH Colima. Se rescataron 51 entierros humanos, se trata de individuos de sexo femenino y masculino adultos, así como sub-adultos. Se presentan alteraciones en dientes como son: sarro, caries, periodontitis y algunos abscesos (Flores-Ramírez, 2009). En varios cráneos se tiene hiperostosis porótica y criba orbitaria. En esqueleto poscraneal, se tienen casos de periostitis y osteomielitis, al menos dos individuos presentan fracturas y alteraciones de tipo infecciosos que podrían deberse a frambesia. El esqueleto de una mujer de edad adulta carece de apófisis odontoides del eje. Dentro de las alteraciones por edad se tienen artritis reumatoide, osteoartritis y artritis (Flores-Ramírez, 2009).

Se encontraron 14 casos de deformación tabular erecta como una alteración cultural. Entre las marcas de estrés ocupacional se encuentran: exostosis auditiva por la explotación de recursos marinos, marcas de acuclillamiento por moler y preparar alimentos, marcas por el uso del mecapal, de caza o caminar por lugares escarpados; se observó una diferenciación por género, siendo más común el acuclillamiento en las mujeres y el uso de mecapal en los hombres (Flores-Ramírez, 2009). Por asociación con los materiales arqueológicos con los que fueron sepultados algunos individuos, los entierros corresponden a la fase Ortices-Tuxcacuesco (400 a. C. — 200 d. C.) (R. M. Flores-Ramírez, comunicación personal).

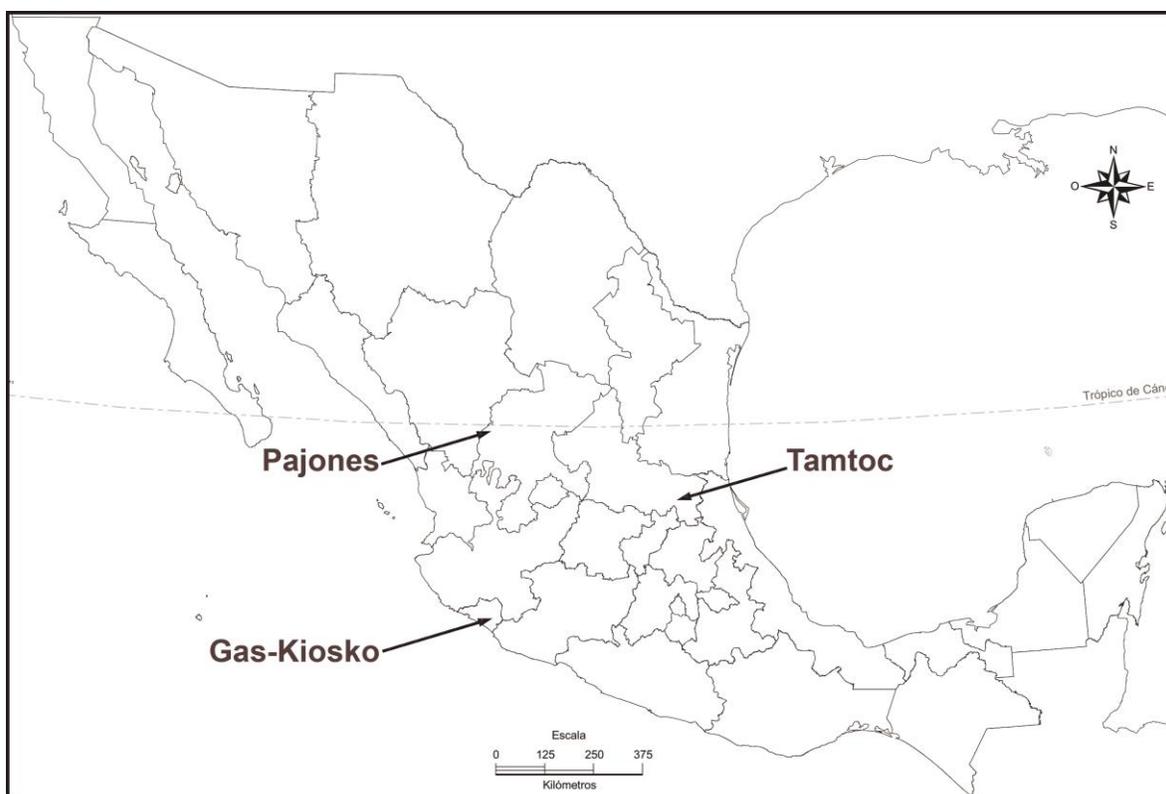


Figura 4.1. Ubicación de los tres sitios arqueológicos de donde se obtuvieron las muestras analizadas en este estudio.

## 4.2. Material biológico

Se obtuvieron los restos óseos de siete individuos provenientes de los sitios arqueológicos Tamtoc, Pajones y Gasolinera Kiosko. Todos presentaban marcas sugerentes de una infección severa.

Los huesos obtenidos fueron las dos tibias de cada individuo de los entierros 14-1, 14-2, 17 y 19, hallados en la zona de La Noria, en Tamtoc; las dos tibias del entierro 9 de Pajones; la tibia izquierda y partes del cúbito, radio, húmero y fémur izquierdo del entierro 8, así como las dos tibias del entierro 42, de la Gasolinera Kiosko.

La información referente a los cuatro individuos de Tamtoc y el individuo de Pajones, proviene de comunicación personal de la Dra. Patricia Hernández, el M. en Arqueol. Guillermo Córdova Tello y la M. en Arqueol. Estela Martínez Mora, así como del libro titulado *“Tamtoc: Esbozo de una antigua sociedad urbana”* (Córdova-Tello et al., 2012).

El entierro 14 de Tamtoc era múltiple y contenía cuatro individuos, un infante, un adolescente y dos adultos (hombre y mujer). Estos individuos fueron depositados sobre una cama elaborada con tres hiladas de piedra de río con argamasa. Sobre el cráneo del adolescente se encontró un plato trípode. Se hallaron diversas vasijas de cerámica asociadas a los cuatro individuos. Los dos adultos se denominaron Entierro 14-1 y 14-2, y sus tibias fueron proporcionadas para este estudio.

### *Entierro 14-1, Tamtoc*

La tibia izquierda tiene “forma de sable” y abultamientos a lo largo de la diáfisis (figura 4.2). Se encontró completamente articulado y en posición sedente, con algunos dientes sueltos que muestran limado dental, sólo se recuperaron algunos fragmentos del cráneo.



**Figura 4.2. Tibias del entierro 14-1. Arriba, izquierda; abajo, derecha.**

#### *Entierro14-2, Tamtoc*

Es el esqueleto postcraneal más completo. Del cráneo sólo se recuperaron fragmentos, el maxilar muestra huellas de un absceso a nivel del incisivo central izquierdo e inflamación a lo largo de toda la mandíbula. El lado derecho muestra un proceso infeccioso severo que ocasionó la pérdida de algunas piezas dentales en vida. A lo largo de las diáfisis de los huesos largos hay huellas de un proceso infeccioso severo. La tibia izquierda tiene “forma de sable” (figura 4.3).



Figura 4.3. Tibias del entierro 14-2. Arriba, izquierda; abajo, derecha.

### *Entierro 17, Tamtoc*

Se halló en posición sedente, sobre una cama de piedra chica de río, de tres hiladas. A unos 15 cm se encontró el torso de una figurilla antropomorfa de una mujer. El cráneo presenta deformación tabular erecta (figura 4.4), tiene limado dental en dientes superiores, los inferiores no son observables por el sarro. Tiene huellas de lesiones de *caries sicca* en el frontal; criba orbitaria ligera (marcas porosas en el techo de la órbita), espongio hiperostosis (aparición esponjosa y porosa de la bóveda craneal) y engrosamiento del diploe. Tibias y fémur presentan remodelación de arquitectura del hueso, el peroné con proceso osteomielítico. Las extremidades superiores ligeramente afectadas, principalmente las epífisis distales del húmero y las proximales del cúbito. Las costillas con evidencia de un proceso infeccioso severo en la parte media.



Figura 4.4. Entierro 17 *in situ*. Fotografías: Guillermo Córdova.

### *Entierro 19, Tamtoc*

Se encontró en posición sedente sobre un banco cuadrangular de 30 x 50 cm de piedras rodadas de río de tres hileras, sin ajuar funerario ni ofrenda. El esqueleto estaba completamente articulado y bien conservado. Era una mujer robusta y más alta comparada con los otros restos hallados en Tamtoc. Presenta deformación cefálica intencional de tipo tabular oblicuo, y limado dental (figura 4.5).



Figura 4.5. Entierro 19 *in situ*. Cráneo, izquierda; esqueleto post-craneal, derecha. Fotografías: Guillermo Córdova.

Originalmente se consideró que pertenecía al periodo Clásico Medio (600 d. C.), ya que se halló en un estrato correspondiente a ese periodo (Córdova-Tello *et al.*, 2012), posteriormente se realizó el análisis de  $^{14}\text{C}$  en el Laboratorio de Espectrometría de Masas con Aceleradores (LEMA), perteneciente al Instituto de Física de la UNAM; este análisis reveló una antigüedad de  $1370 \pm 35$ , lo que sugiere que para realizar este entierro se cavó más profundo que para el resto (G. Córdova-Tello, comunicación personal).

La columna vertebral tiene osteofitosis vertebral (protuberancias óseas), más aguda en la región lumbar. Con características de osteomielitis en las extremidades inferiores y un callo óseo en el tercio medio de la tibia izquierda (figura 4.6). Los dientes inferiores con acumulación de sarro, hay evidencias de infección periodontal, tanto en dientes superiores como inferiores. Presenta espongio hiperostosis ligera.



**Figura 4.6. Tibias del entierro 19.** Arriba, izquierda; abajo, derecha.

### *Entierro 9, Pajones*

Por asociación cerámica vivió entre el 200 a 650 d.C. Un trozo de carbón asociado a este entierro se fechó en el LEMA por medio de  $^{14}\text{C}$ , y reveló que el individuo vivió alrededor del 520 d.C.

Las vértebras cervicales presentan osteofitosis en los bordes, y el cuerpo está colapsado, sólo están completas la sexta y la séptima vértebras. Se identificaron once vértebras dorsales, las cuales están afectadas en su cuerpo por lesiones escleróticas, principalmente la novena y la décima (figura 4.7). Estas lesiones vertebrales son características de la tuberculosis juvenil o tuberculosis vertebral, denominada Mal de Pott.

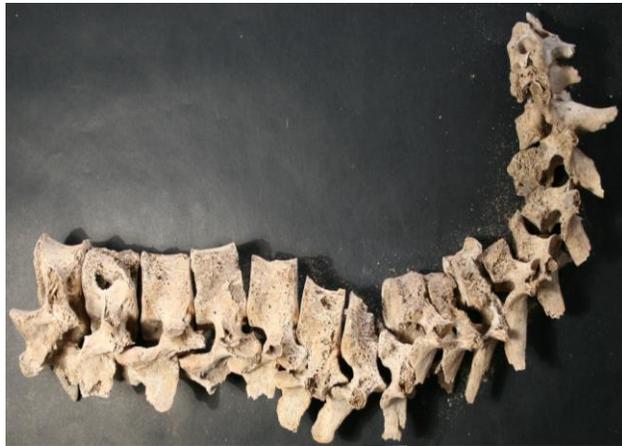


Figura 4.7. Vértebras del entierro 9. Fotografía: Guillermo Córdova.

Las costillas y los huesos largos tienen huellas de periostitis. Las tibias presentan “forma de sable” (figura 4.8).



**Figura 4.8. Tibias del entierro 9.** Arriba, izquierda; abajo, derecha.

#### *Entierro 8, Gasolinera Kiosko*

Se halló en posición decúbito dorsal extendida. Por asociación a los materiales arqueológicos con los que fue sepultado el individuo, corresponde a la fase Tuxcacuesco-Ortices. Presenta sarro, desgaste medio en dientes y reabsorción alveolar en los molares inferiores derechos. Se observó criba orbitaria, osteomielitis en extremidades superiores e inferiores de ambos lados (figura 4.9). Con espongio hiperostosis en cráneo (R. M. Flores-Ramírez, comunicación personal).



Figura 4.9. Huesos del entierro 8. Tibia izquierda arriba; húmero abajo.

#### *Entierro 42, Gasolinera Kiosko*

Se trata de un entierro múltiple, el individuo 42 se halló en posición decúbito dorsal extendida. Con abscesos en molares superiores, caries en segundo molar inferior izquierdo, reabsorción alveolar de segundo y tercer molar derecho e izquierdo. Presenta osteomielitis en dientes y en huesos largos de ambos lados (figura 4.10), así como en clavícula derecha y espongio hiperostosis en cráneo. No fue posible asignarle una cronología tentativa (R. M. Flores-Ramírez, comunicación personal).



**Figura 4.10. Tibias del entierro 42. Arriba, izquierda; abajo, derecha.**

En la tabla 4.1 se presenta la información referente a la antigüedad, sexo, edad de muerte, tipo de entierro y orientación de los siete individuos analizados en este estudio.

**Tabla 4.1. Entierros analizados.**

<b>Entierro</b>	<b>Sitio</b>	<b>Antigüedad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad muerte (años)</b>	<b>Tipo</b>	<b>Orientación</b>
8	Gas-Kiosko	400 a. C. — 200 d. C.	♀	30-35	primario-indirecto	este-oeste
9	Pajones	520 d.C.	♀	~30	primario-directo	-----
14-1	Tamtoc	1200 a 1523 d. C.	♂	20-24	primario-indirecto	este franco
14-2	Tamtoc	1200 a 1523 d. C.	♀	25-29	primario-indirecto	-----
17	Tamtoc	1200 a 1523 d. C.	♀	30-34	primario-indirecto	este franco
19	Tamtoc	1370 d.C.	♀	25-29	primario-indirecto	este franco
42	Gas-Kiosko	-----	♂	40-45	primario-indirecto	este-oeste

### 4.3. Medidas preventivas

Los procedimientos pre-PCR (extracción y PCR) se efectuaron en una habitación separada del laboratorio principal, dedicada exclusivamente al análisis de DNA antiguo. En este lugar se cuenta con una campana de flujo laminar horizontal, equipada con un filtro HEPA (*high-efficiency particulate air*) de 0.3  $\mu\text{m}$  y lámparas UV. Las micropipetas, abridor de microtubos, marcador indeleble, vórtex, mesas de trabajo y campana, se limpiaron con gasas estériles remojadas con hipoclorito de sodio al 20%. La campana se irradió con ultravioleta (UV-254 nm) antes de cada procedimiento, así como el material, en un CL-1000 *Ultraviolet crosslinker* durante 15 minutos. Todos los procedimientos se realizaron con puntas con filtro estériles; y se efectuaron con reactivos grado biología molecular de las marcas de *Sigma Aldrich*, *Invitrogen* y *Applied Biosystem* que garantizan la ausencia de DNA en éstos.

Los procedimientos de extracción y amplificación por PCR se realizaron con micropipetas, puntas y abridores de microtubos, exclusivos para cada uno. El material de cristalería, los microtubos, las soluciones preparadas y el agua ultrapura del módulo de purificación Q-Gard® 1 (QGARD00R1), fueron esterilizados en autoclave a 126 °C y 0.7 Kg/cm<sup>2</sup> durante 30 minutos. Todo el material se secó y esterilizó adicionalmente por calor seco a 100 °C.

Durante todos los procedimientos se empleó bata limpia, indumentaria estéril y desechable como cofia, cubrebocas, protectores para zapatos (cubrebotas) y guantes quirúrgicos (sin talco). Al ingresar al laboratorio de aDNA se realizó un cambio de bata y zapatos (estrictamente cerrados), exclusivos para el trabajo con aDNA. Se tuvo precaución de no dejar piel al descubierto, se utilizaron lentes de seguridad para cubrir pestañas y cejas, se mantuvo el cabello perfectamente recogido, siempre se ingresó sin aretes, collares o cualquier tipo de joyería.

El acceso al laboratorio de aDNA se restringió a dos estudiantes que trabajaron de manera independiente y en horario diferente. Previamente se identificó su haplotipo mitocondrial, el cual fue comparado con las secuencias de las muestras para poder detectar resultados de contaminación.

Con el fin de monitorear la contaminación de los reactivos y las condiciones de manipulación de los procedimientos, todas las extracciones y amplificaciones se acompañaron de controles negativos, que incluyen todos los reactivos, excepto la muestra antigua. Cuando algún control negativo amplificó, se desecharon todos los productos de esa amplificación o extracción, de acuerdo con el tipo de control negativo contaminado. Se esterilizaron nuevamente las soluciones y el material, y se hizo una prueba de contaminación, sólo con controles negativos; si la contaminación persistía, se sustituyeron todos los reactivos, se esterilizó una vez más las soluciones y material y se realizó de nuevo la prueba de contaminación hasta obtener resultados óptimos de limpieza.

Los procedimientos post-PCR (electroforesis, restricción, purificación, secuenciación) se efectuaron en una habitación (cuarto de productos) que se encuentra totalmente aislada del laboratorio principal. En este cuarto se realizó un cambio de bata, exclusiva para el manejo de productos de amplificación. Se utilizaron micropipetas y material exclusivo, así como puntas con filtro para inhibir la dispersión de los amplicones. El flujo diario del personal, fue del cuarto de aDNA al cuarto de productos, una vez que se ingresó al segundo cuarto, no se permitió la entrada al laboratorio de aDNA para evitar el acarreo de amplicones.

En el laboratorio de Bioquímica no se manejó el DNA contemporáneo del patógeno buscado (control positivo), para evitar contaminación. En todo el edificio nunca se ha manipulado el DNA del género *Treponema*.

#### 4.4. Registro fotográfico

Debido a que se realizó un procedimiento destructivo del material, previo a la extracción, se llevó a cabo el registro fotográfico de los restos óseos de todos los individuos (excepto el entierro 17, que son unos cuantos fragmentos de hueso). Se tomaron fotos de perfil y de frente, destacando las marcas que indican alguna patología (sección 4.2).

#### 4.5. Limpieza de las muestras

La superficie de cada hueso se removió con una navaja nueva, lavada con cloro y estéril; posteriormente se irradió cada plano del hueso con ultravioleta por 3 minutos en un *Ultraviolet Crosslinker*. El material utilizado para la extracción se tomó de la región menos expuesta del hueso, como se muestra en la figura 4.11.



Figura 4.11. Tibia del entierro 19 con el corte realizado para la extracción.

Un fragmento de uno a dos gramos fue molido con mortero y pistilo, se pesaron 400 mg de polvo de hueso en microtubos de dos mL marca eppendorf y se procedió con la extracción. Manejándose un máximo de cuatro tubos más el control negativo en cada extracción.

Se probó un método alternativo de limpieza de las muestras óseas. Se tomó un fragmento de hueso (entierro 17) de 700 mg y se sumergió en hipoclorito de sodio

concentrado, durante cuatro minutos, posteriormente se enjuagó dos veces con agua estéril ultrapura. El fragmento de hueso se molió con mortero y pistilo, y se colocó en un microtubo de dos mL.

#### 4.6. Extracción de DNA

Se llevó a cabo la extracción del DNA por el método de Krings *et al.* (1997), que implicó el uso de sarcosyl-EDTA para la solubilización de lípidos; proteinasa K, fenol y cloroformo para la eliminación de proteínas; y precipitación del DNA con sílica, etanol y acetona (Boom *et al.*, 1990). Inicialmente se usó polvo de hueso de dos individuos antiguos que forman parte del acervo del Laboratorio de Bioquímica, destinados a la implementación de nuevos métodos o entrenamiento práctico de los estudiantes. Una vez calibrado el método, se trabajó con los individuos en cuestión.

El total de extractos de DNA fueron 56, en la tabla 4.2 se muestra el número de extractos por individuo.

**Tabla 4.2. Extractos realizados.**

Entierro	Hueso	Extractos
8	Húmero	6
9	tibia derecha	7
14-1	tibia izquierda	4
14-2	tibia izquierda	8
17	tibia derecha	11
19	tibia izquierda	12
42	tibia izquierda	8

#### 4.7. Amplificación por PCR

Se realizó una serie de PCR's con cada extracto con la finalidad de evaluar la presencia de *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis* (diagnóstico diferencial) y mtDNA humano.

Para buscar DNA de *T. pallidum* se utilizó el marcador *tpp15*, con los *primers* que amplifican un fragmento de 119 pb, que contiene un sitio polimórfico característico de la subespecie *pallidum* (Kolman *et al.*, 1999). Estos *primers* se estandarizaron en un laboratorio independiente que pertenece al Departamento de Antropología de la Universidad de Florida y se cotejaron *in silico* con el software FastPCR 6.5 (Kalendar *et al.*, 2014). La secuencia de estos oligonucleótidos y las condiciones utilizadas, se muestran en la tabla 4.3.

Para *Mycobacterium tuberculosis* se utilizaron los *primers* diseñados por Eisenach *et al.* (1990) (IS1-IS2) buscando amplificar un fragmento de 123 pb, perteneciente a la secuencia de inserción IS6110 del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Thierry *et al.*, 1990). Con el fin de obtener una sola banda y aumentar la sensibilidad, se llevó a cabo una PCR anidada (*nested-PCR*) (Haqqi *et al.*, 1988) empleando los *primers* diseñados por Taylor *et al.* (1996) (IS3-IS4). La PCR anidada utiliza dos *primers* externos y dos internos; los segundos se recorren de 10 a 15 pb hacia adentro de la secuencia amplificada, produciendo un producto anidado en el primero, lo que aumenta la especificidad de la reacción. También se llevaron a cabo combinaciones de estas parejas de *primers*, que amplifican fragmentos de 107 pb y 108 pb (tabla 4.3). Todos los *primers* se analizaron *in silico* con el software FastPCR 6.5 (Kalendar *et al.*, 2014), antes de ser enviados a sintetizar.

Cinco de los siete individuos se analizaron para buscar mtDNA humano con los marcadores para los cuatro haplogrupos americanos principales (A, B, C y D) (Wallace, Garrison, y Knowler, 1985; Schurr *et al.*, 1990; Torroni *et al.*, 1992), así como sus correspondientes sitios polimórficos de la RHI (Horai *et al.*, 1993; Torroni

*et al.*, 1993a, b; Tamm *et al.*, 2007). Los entierros 14-1 y 14-2 no se consideraron apropiados para trabajarse con marcadores de DNA humanos, debido al nivel de fragmentación de los huesos. Se intentó amplificar la RHI en un fragmento de 455 pb (15975-16429) para comprobar la integridad del DNA. También, se realizó en dos fragmentos superpuestos, uno de 263 pb (15975-16237) y 238 pb (16192-16429); y un máximo de tres fragmentos (tabla 4.3).

Los programas de amplificación fueron específicos para cada marcador y se realizaron en el termociclador *Eppendorf Master Cycler Gradient* modelo AG22331. Todos los programas constaron de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 40 segundos, 1 minuto a la temperatura de alineación específica de cada *primer* y elongación a 72°C por 1 minuto, y un ciclo final de elongación a 72°C durante 7 minutos. Los detalles de las PCR's y los *primers* empleados se muestran en la tabla 4.3.

Se implementó una PCR *touchdown* a fin de reducir las bandas inespecíficas en el marcador IS6110. Esta variante de la técnica, consiste en utilizar una temperatura inicial de alineamiento ( $T_m$ ) por encima de la  $T_m$  de los *primers*, que se va reduciendo progresivamente en cada ciclo. Cualquier diferencia de  $T_m$  entre el alineamiento correcto e incorrecto produce una ventaja exponencial de dos veces por ciclo, aumentando la especificidad de la reacción (Korbie y Mattick, 2008).

**Tabla. 4.3. Primers y condiciones utilizadas para cada marcador.**

Marcador	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto (pb)	Concentración de magnesio (mM)	Temperatura de alineamiento (°C)	Referencia
<i>tpp15</i>	F-GAGCAGGATGTCTCTATGAGTTATAAAGAG R-GAAGCCACTACCGATGTGCG	119	1.5	56	Kolman <i>et al.</i> , 1999
IS6110 ext	F-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG R-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123	1-1.5	68	Eisenach <i>et al.</i> , 1990
IS6110 int	F-TCGGTGACAAAGGCCACGTA R-TTCGGACCACCAGCACCTAA	92	1-1.5	58	Taylor <i>et al.</i> , 1996
A	F-ACCTCCTCAAAGCAATACACTG R-GTGCTTGATGCTTGTTCTTTTG	176	1.5	63	Stone y Stoneking, 1993
B	F-ACAGTTTTTCATGCCCATCGTC R-ATGCTAAGTTAGCTTTACAGTG	112-121	1.5	52	González-Oliver <i>et al.</i> , 2001
C	F-CGCTATCACCCTCTGTTCGC R-CAGATGTGCAGGAATGCTAGG	147	1.5	60	González-Oliver <i>et al.</i> , 2001
D	F-TAACTACTACCGCATTCTACT R-AAAGCCGGTTAGCGGGGGCA	149	1.5	55	González-Oliver <i>et al.</i> , 2001
RHI 15975-16429	F-CTCCACCATTAGCACCCAAAGC R-GTGGTAGGAGGCACTTTAGT	455	1.5	59	Vigilant <i>et al.</i> , 1989
RHI-1° 15975-16158	F-CTCCACCATTAGCACCCAAAGC R-TACTACAGGTGGTCAAGTAT	184	1.5	60	Vigilant <i>et al.</i> , 1989
RHI-2° 16111-16237	F-CCACCATGAATATTGTACGGT R-TGTGTGATAGTTGAGGGTTG	127	1.5	57	Vigilant <i>et al.</i> , 1989
RHI-3° 16192-16429	F-CCATGCTTACAAGCAAGT R-GCGGGATATTGATTTACGG	238	1.5	55	Vigilant <i>et al.</i> , 1989

El programa de *touchdown*-PCR consistió de una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, nueve ciclos de: desnaturalización a 94°C por 20 segundos, alineación inicial de 68°C por 45 segundos, reduciendo 1°C cada ciclo; y elongación a 72°C por 20 segundos; posteriormente, 20 ciclos con una temperatura de alineamiento fija a 60°C y las mismas condiciones que los ciclos anteriores, con un ciclo final de elongación a 72°C durante 5 minutos.

Todas las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen final de 25 µL, se probaron cantidades de 0.5 µL, 1 µL y 3 µL de cada extracto de DNA, ya que las muestras varían en cuanto a la integridad del DNA y la cantidad de inhibidores. Para las amplificaciones de mtDNA se utilizó la enzima *Platinum® Taq* DNA Polimerasa de *Invitrogen*. Para los marcadores *Tpp15* e IS6110 se usó una *GoTaq® Hot Start* Polimerasa de *Promega*. Las concentraciones *Stock* y finales utilizadas para los distintos marcadores se muestran en la tabla 4.4.

**Tabla 4.4. Reactivos y concentraciones utilizadas para las amplificaciones por PCR.**

Reactivos	GoTaq Hot Start			Platinum Taq	
	Concentración <i>Stock</i>	<i>Tpp15</i> Final	IS6110 Final	Concentración <i>Stock</i>	mtDNA Final
Buffer	5X	1X	1X	10X	1X
Mg <sup>2+</sup>	25mM	1.5mM	1.5mM	50mM	1.5mM
dNTP's	5mM	0.2mM	0.2mM	1.25mM	0.1mM c/u
Forward primer:	10µM	0.5µM	0.4µM	10µM	0.1µM
Reverse primer:	10µM	0.5µM	0.4µM	10µM	0.1µM
BSA	5 mg/mL	0.1µ/µL	0.1µ/µL	5 mg/mL	0.1µ/µL
Polimerasa	5U/µL	1U/µL	1U/µL	5U/µL	0.02U/µL
DNA	-----	0.5-3µL	0.5-3µL	-----	0.5-3µL
H <sub>2</sub> O	-----	restante	restante	-----	restante

µL = microlitros, mM = milimolar, µM = micromolar, U = unidades de enzima

#### 4.8. Análisis Electroforético

Los productos de PCR se analizaron en geles de poliacrilamida al 12%, excepto la deleción de 9pb, que se cargó en geles al 14%. Se utilizó Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) (Sambrook y Russell, 2001) como amortiguador de corrida. En los geles se colocaron seis  $\mu\text{L}$  del DNA amplificado de cada muestra y seis  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol. Para determinar el tamaño de los productos se utilizó 1.5  $\mu\text{L}$  del marcador de tamaño molecular  $\phi\text{X174}$  cortado con la enzima *HaeIII*. Las electroforesis se corrieron a 170 volts durante una hora y la deleción de 9 pb a 120 volts durante tres horas. Los geles se tiñeron en una solución de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de bromuro de etidio durante cinco minutos en agitación constante. Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados en un transiluminador con radiación UV y fotografiados con una cámara Canon C6.

#### 4.9. Aislamiento del fragmento buscado

Con el fin de aislar las bandas de interés, se empleó la técnica de purificación denominada *Gene-Clean* (Vogelstein y Gillespie, 1979), en la que se migraron las muestras en un gel de agarosa al 3%, se tiñó con bromuro de etidio para visualizarse con UV, se cortó la banda de interés con una navaja estéril; se colocó en un microtubo de 1.5 mL, se adicionaron tres volúmenes de yoduro de sodio 6M, se incubó a 55 °C por 30 minutos para disolver la agarosa. Se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de sílica ( $\text{SiO}_2$ ), se agitó suavemente por 10 minutos, se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 30 segundos. Se lavó con 300  $\mu\text{l}$  de etanol al 95%, se centrifugó nuevamente a 12,000 r.p.m. por 30 segundos. Se repitió el lavado dos veces más, se incubó 10 minutos a 55°C y se eluyó con 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril ultrapura. A fin de obtener una mayor cantidad de producto, se realizó una reamplificación con 0.5 a 3  $\mu\text{L}$ , empleando 25 ciclos y las mismas condiciones de la PCR original.

Otra forma de aislar la banda de interés fue con *Band Stab-PCR* (Bjourson y Cooper, 1992), una vez que se amplificó el marcador IS6110, el DNA se migró y tiñó en un gel de agarosa al 3%, se enjuagó el gel con agua estéril ultrapura, se secó con papel filtro previamente irradiado con UV, se picó la banda de interés con una aguja nueva y estéril (o con una punta esterilizada) y se colocó en un microtubo de 0.2 mL que contenía todos los reactivos de PCR excepto DNA, se realizó la reamplificación con las mismas condiciones que la primera PCR (tabla 4.3), aunque se disminuyó la concentración final de *primers* a 0.1  $\mu\text{M}$  cada uno, la de  $\text{Mg}^{2+}$  a 1 mM, y se redujo el número de ciclos a 25, para evitar la formación de bandas inespecíficas y dímeros de *primer*.

#### 4.10. Análisis de Restricción

Seis  $\mu\text{L}$  del producto de PCR de los haplogrupos A, C, D y *tpp15* (aislado con *Gene-Clean*) fueron incubados toda la noche a 37°C, con dos unidades de la enzima de restricción específica de cada marcador (*HaeIII*, *HincII*, *AluI* y *AfeI*, respectivamente). En este estudio se empleó la enzima *AfeI* para la detección del polimorfismo *tpp15*, ya que es un isoesquizómero de *Eco47III*, por lo que reconoce la misma secuencia (AGCGCT). Posteriormente, los productos de restricción se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% y se tiñeron con bromuro de etidio. Los tamaños de los fragmentos de restricción se indican en la tabla 4.5.

**Tabla 4.5. Tamaño de los productos de PCR y de los fragmentos de restricción.**

Marcador	Enzima de restricción	Tamaño del producto (pb)	Tamaño de los fragmentos de restricción (pb)
A	<i>HaeIII</i>	176	101/75
C	<i>HincII</i>	147	83/64
D	<i>AluI</i>	149	72/77
<i>tpp15</i>	<i>AfeI</i>	119	93/26

#### 4.11. Secuenciación

Los productos a secuenciar se purificaron con el *Kit* de purificación BS364 (*BIO BASIC INC*) que utiliza columnas EZ10, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA aislado y purificado se sometió a secuenciación automatizada, en la cual se emplearon didesoxinucleótidos trifosfato marcados con fluoróforos (rodamina) (Prober *et al.*, 1987; Bergot *et al.*, 1996; Rosenblum *et al.*, 1997), basado en el método didesoxi de Sanger *et al.* (1977). Para esto se utilizó *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (ABI PRISM®)* y los *primers* de la PCR, específicos de cada marcador (tabla 4.4).

Se secuenciaron ambas hebras del DNA (forward y reverse). En una reacción típica de secuenciación se utilizó 1 µL de *BigDye v3.1*, 1.5 µL de *buffer BigDye 5X*, 1 µL de primer (3pmol), 1 µL de DNA purificado (con una concentración de 1 a 10 ng/µL) y 5.5 µL de agua ultrapura, para un volumen final de 10µL. Se empleó una desnaturalización inicial de 95°C por 4 minutos, y 30 ciclos de: 94°C por 15 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 60 °C por 2 minutos.

Los productos de la reacción de secuenciación se purificaron con columnas Centri-Sep (*Princeton Separations, INC.*), que utilizan gel dextrano (*sephadex®*) para eliminar los terminadores (ddNTP's) marcados que quedaron libres y pueden producir ruido de fondo en el electroferograma; se realizó el protocolo siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se deshidrataron en un *Speed-Vac Plus*

modelo SC110A y se leyeron en un secuenciador *ABI Prism 310* (*Applied Biosystems*).

## V. RESULTADOS

### 5.1. Obtención de DNA

De todos los entierros se obtuvo un total de 56 extractos, de los cuales en 24 se observó por lo menos un producto de amplificación (inespecífico) para los marcadores *tpp15* o IS6110. En cinco extractos se obtuvo un producto de amplificación positivo de mtDNA. La relación de la cantidad de extractos por entierro y los productos de amplificación se resumen en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1. Extracciones exitosas de DNA a partir de los restos arqueológicos analizados.**

Entierro	Extractos	Productos PCR inespecíficos <i>tpp15</i> o IS6110	Productos PCR con marcadores mitocondriales	Total
8	6	2	1	3
9	7	1	1	2
14-1	4	4	----	4
14-2	8	4	----	4
17	11	8	2	10
19	12	0	1	1
42	8	5	0	5
Total	56	24	5	29

### 5.2. DNA treponémico

Para el marcador *tpp15*, se obtuvieron productos de amplificación con el tamaño esperado (119 pb) en dos extractos pertenecientes al entierro 42 (figura 5.1). No obstante, se intentó replicar este resultado sin éxito.



Figura 5.1. Productos del tamaño esperado de *tpp15* a partir del entierro 42.

El resultado de la restricción con la enzima *AfeI* de los productos del tamaño esperado de *tpp15* fue negativa. La secuenciación de estos productos presentó electroferogramas con picos traslapados (figura 5.2). Se obtuvieron los mismos resultados aun cuando se realizaron modificaciones a los protocolos de amplificación y secuenciación, como son: la reducción de las concentraciones de DNA hasta 1 ng/ $\mu$ L, las temperaturas de alineamiento, y los tiempos de duración de los ciclos del termociclador.

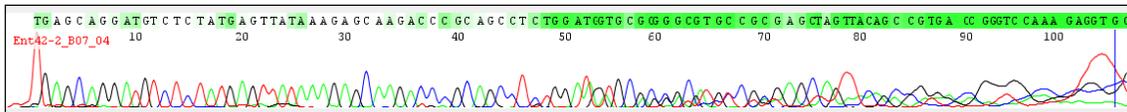


Figura 5.2. Electroferograma del fragmento de 119 pb obtenido del entierro 42.

La comparación del fragmento legible en la herramienta BLAST del NCBI, mostró similitud con el DNA de distintos organismos saprófitos (figura 5.3).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rufibacter tibetensis strain 1351, complete genome</a>	34.2	141	100%	2.7	100%	<a href="#">CP012643.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Desulfovibrio magneticus RS-1 DNA, complete genome</a>	34.2	88.7	100%	2.7	100%	<a href="#">AP010904.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paucibacter sp. KCTC 42545, complete genome</a>	34.2	336	100%	2.7	100%	<a href="#">CP013692.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Moorella thermoacetica strain DSM 2955, complete genome</a>	34.2	86.7	100%	2.7	100%	<a href="#">CP012370.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Moorella thermoacetica strain DSM 521, complete genome</a>	34.2	86.7	100%	2.7	100%	<a href="#">CP012369.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Burkholderia cepacia GG4 chromosome 2, complete sequence</a>	34.2	34.2	89%	2.7	100%	<a href="#">CP003775.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Laribacter hongkongensis HLHK9, complete genome</a>	34.2	222	94%	2.7	100%	<a href="#">CP001154.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Moorella thermoacetica ATCC 39073, complete genome</a>	34.2	86.7	100%	2.7	100%	<a href="#">CP000232.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain BAMCPA07-48, complete genome</a>	32.2	323	94%	11	100%	<a href="#">CP015377.1</a>

Figura 5.3. BLAST del fragmento de 119 pb del entierro 42.

### 5.3. Diagnóstico diferencial, *M. tuberculosis*

En todos los ensayos para IS6110, del complejo *M. tuberculosis*, se presentaron bandas inespecíficas de diferentes tamaños. En los entierros 17, 19 y 8 se obtuvieron bandas de 123 y 107 pb, directamente del extracto y por PCR semianidada, respectivamente. Del entierro 14-1 se obtuvo la banda de 107 pb directamente del extracto (figura 5.4).

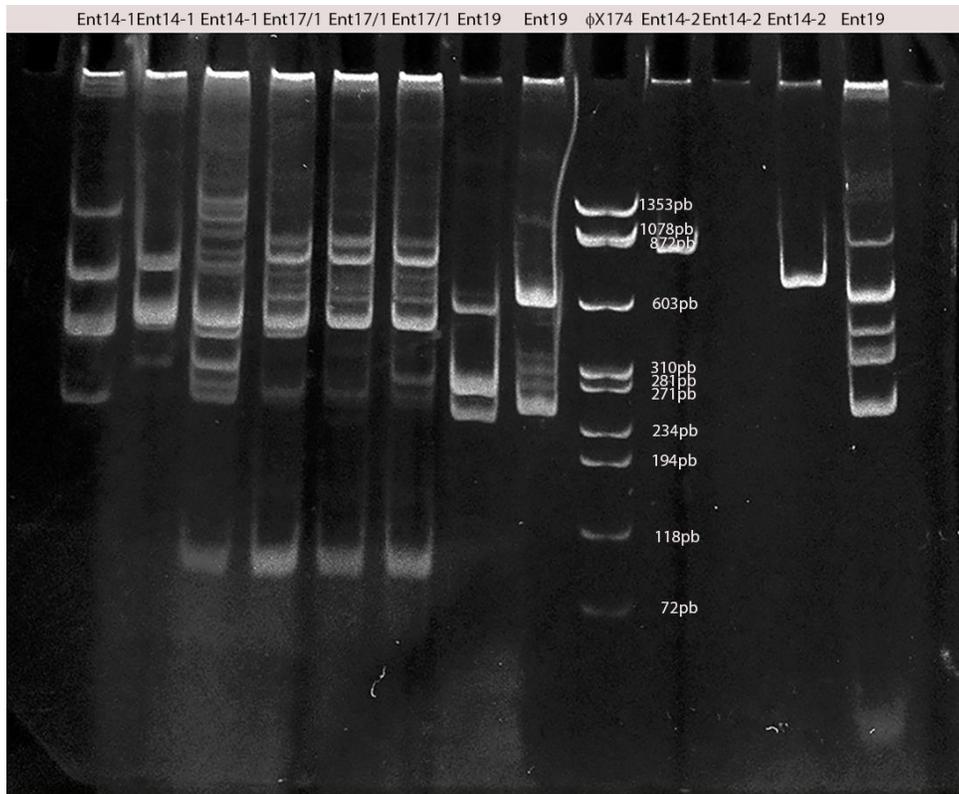


Figura 5.4. Productos de 107 pb (IS6110).

Los ensayos de PCR *band-stab* y semianidada, permitieron la obtención de una banda única de 107 pb (figura 5.5). La secuenciación de estos productos produjo electroferogramas con picos traslapados y con ruido de fondo, lo que no permitió identificar el DNA de *M. Tuberculosis*.



Figura 5.5. Productos aislados con tamaño cercano a 107 pb (IS6110).

#### 5.4. Haplogrupos mitocondriales

Se identificó el haplogrupo mitocondrial en tres individuos, entierros 8, 9 y 19, por análisis de restricción. En cada individuo la asignación del haplogrupo se basó en la presencia de uno y la confirmación de la ausencia de los otros tres (tabla 5.2).

La tipificación por restricción del extracto uno (tratado con hipoclorito de sodio) del entierro 17 lo ubicó en el haplogrupo C y el haplotipo de la RHI en el haplogrupo B. El segundo extracto se ubicó en el haplogrupo A por restricción y en el C por el haplotipos de la RHI. Estos resultados contradictorios sugieren contaminación con DNA actual.

Tabla 5.2. Resultados de haplogrupos mitocondriales.

<b>Entierro</b>	<b>Sito</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>RHI</b>	<b>*Fragmentos</b>
8	Gas-Kiosko	Si	No	No	No	A	1
9	Pajones	Si	No	No	No	A	3
14-1	Tamtoc	—	—	—	—	—	—
14-2	Tamtoc	—	—	—	—	—	—
17	Tamtoc	Si	No	Si	—	B y C	1
19	Tamtoc	Si	No	No	No	A	3
42	Gas-Kiosko	—	—	—	—	—	—

\*Número de fragmentos para obtener la RHI

Los entierros 8 y 9 tuvieron las tres mutaciones 16,223, 16,319 y 16,290 del haplotipo característico de la RHI que se corresponde con el haplogrupo A. El entierro 19 presentó los sitios polimórficos 16,111, 16,223, 16,266 y 16,319; sin embargo, no presentó el polimorfismo 16,290. Tampoco presentó sitios polimórficos relacionados con otros haplogrupos.

## VI. DISCUSIÓN

La evidencia histórica documentada y osteológica de restos con marcas sugerentes de treponematosis es controvertida, debido a esto no ha sido posible confirmar las hipótesis respecto al origen de la sífilis. Es por esto que la presente tesis se enfocó en la identificación molecular de *T. pallidum*, con el fin de comprobar la presencia del patógeno en restos prehispánicos de México.

### 6.1. DNA endógeno y microbiano

La obtención de los productos de amplificación, aunque inespecíficos, sugiere que la extracción de aDNA fue exitosa en 29 extractos, sin embargo, no implica que se trate exclusivamente del aDNA endógeno. Debido a que los restos óseos se encontraron en contacto directo con el suelo, por cientos de años, se espera que la mayor parte del DNA amplificado sea de origen microbiano (Höss *et al.*, 1996). Esto explica por qué en todos los ensayos de PCR realizados con *primers* para *tpp15* e IS6110, se obtuvieron bandas inespecíficas. A pesar de que se utilizó un protocolo específico de PCR, *touch down*, y se redujo la concentración de  $MgCl_2$ , no se obtuvo una banda única. El número mínimo de bandas obtenidas fue de tres, en la mayoría de las muestras. El entierro 17 con el marcador IS6110, fue el único que presentó una sola banda de baja intensidad, que no pudo registrarse con la cámara fotográfica y únicamente fue posible detectarla al observarla directamente en el transiluminador. La secuenciación de esta banda mostró que se trataba de DNA de distintos moldes de origen microbiano, con el mismo tamaño molecular. Estos resultados son comunes en las muestras de restos antiguos (Wintzingerode *et al.*, 2006).

La obtención de mtDNA en cinco extractos de cuatro individuos diferentes, sugiere que, en estas extracciones en particular, se obtuvo el DNA endógeno. Los *primers*

para los haplogrupos mitocondriales y de la RHI, son sumamente específicos, comparados con los de *tpp15* e IS6110. Los productos obtenidos, fueron de una banda única, excepto en un ensayo en el que se obtuvo un producto con un tamaño mayor al esperado. Se trata de una secuencia de 550 pb, amplificada con los *primers* de la RHI que amplifican un fragmento de 455pb (15,975-16,429), perteneciente a un extracto del entierro 19. La secuenciación mostró que se trata de una secuencia quimérica que contiene DNA de distintos organismos, principalmente saprófitos, así como organismos no registrados en las bases de datos.

Las extracciones fallidas (27 extractos) pueden deberse a la presencia de inhibidores de la PCR o a que el DNA se encontraba demasiado fragmentado como para contener una hebra molde amplificable. La cuantificación indicó la presencia de DNA, sin embargo, cuando se cuantifica un extracto de aDNA, no es posible saber la longitud de los fragmentos. Aun cuando, las longitudes pueden estimarse en una prueba de integridad, el DNA procedente de microorganismos recientes, suele sesgar la evaluación (Hummel, 2003).

En once extractos del entierro 19, la ausencia de bandas inespecíficas así como de dímeros de *primers*, indicó la presencia de inhibidores (Hummel, 2003), por lo que obtener DNA de este individuo fue complicado. Los resultados con la RHI del mtDNA mostraron que el DNA se encontraba fragmentado en extremo.

## 6.2. Ausencia de DNA treponémico

La ausencia de restricción de las dos bandas, con tamaño cercano a 119 pb del entierro 42, indica que estos fragmentos de DNA no contienen la secuencia específica de la subespecie *pallidum* (AGCGCT), reconocida por la enzima *AfeI*. Este resultado no descarta a las otras subespecies de *T. pallidum*, así como a *T. pallidum* cepa Fribourg-Blancn (Simian) y *T. paraluisuniculi*, ni los artefactos producidos por los microorganismos presentes en la microbiota del suelo.

La obtención de electroferogramas con picos traslapados sugiere la presencia de más de un molde de DNA, debido a la complejidad de la microbiota del suelo, en el cual estuvieron estos huesos durante varios siglos. El análisis de BLAST mostró que se trata de un producto quimérico producido por el *jumping* PCR y la diversidad del DNA proveniente de distintos organismos saprófitos. Este tipo de artefactos es común cuando se trabaja con muestras antiguas (Pääbo *et al.*, 1990).

La ausencia de una secuencia auténtica de DNA *T. pallidum* en los resultados de este estudio tiene varias explicaciones, analizadas a continuación:

- Las marcas producidas en estos huesos pudieron ser causadas por algún treponema, sin embargo, no fue posible detectar su DNA por la falta de sensibilidad de la PCR. También podría ser que el DNA del patógeno se encontraba en bajas cantidades, y no estuvo presente en los fragmentos de hueso que se cortaron y pulverizaron durante este estudio. Tanya von Hunnius *et al.* (2007) atribuyen el éxito de Kolman *et al.* (1999) a la cantidad de material óseo utilizado (15 g). En este estudio, los huesos de los entierros 17 y 19, fueron los que se exploraron más, con 11 y 12 extractos de 400 mg cada uno, lo que da un total de 4.4 y 4.8 gramos, respectivamente. De ser así, la única forma de comprobar esto es continuar con el muestreo aleatorio de cada hueso hasta detectar un amplicón de *tpp15*. Otra opción es el empleo de un método más sofisticado y con una sensibilidad mayor en la detección de DNA como es la PCR en Tiempo Real (Pruvost y Geigl, 2004),

en la actualidad las tecnologías de secuenciación de nueva generación podrían contribuir en la solución de este problema (Overballe-Petersen, *et al.*, 2012).

- Es probable que el DNA treponémico en estos huesos, se encontrara en un estado de degradación elevado, lo que impidió su amplificación por PCR, o se degradó completamente por los procesos tafonómicos a los que estuvieron expuestos los restos óseos. La mayoría de las muestras óseas se encontraban fragmentadas o con las epífisis destruidas; la tierra del suelo había penetrado en toda la estructura ósea, lo que debió acelerar la degradación hidrolítica y el daño oxidativo del DNA. Aunado a la temperatura y humedad elevadas que presentan estos sitios arqueológicos (G. Córdova-Tello, comunicación personal), hacen que la conservación del aDNA sea un evento poco probable en estos huesos. La degradación del DNA es la causa más común de falla de la PCR (Hummel, 2003).
  
- Otra explicación es que los individuos analizados en este estudio tuvieron alguna treponematosi s en etapas avanzadas, en las cuales se producen las deformaciones óseas y la carga bacteriana es baja lo que implica una reducción del DNA del patógeno (von Hunnius *et al.*, 2007; Montiel *et al.*, 2012) Por lo que es complicado, encontrar DNA treponémico, en estos restos que además estuvieron sometidos a las condiciones climáticas y de conservación descritas anteriormente. Por otra parte, la probabilidad de conservación del DNA treponémico en restos de recién nacidos afectados por sífilis congénita es alta. Distintas publicaciones (Jaffe, 1972; Bauer, 1944; Armangil *et al.*, 2009) apoyan la hipótesis de que el número de treponemas en el esqueleto de neonatos es lo suficientemente amplio como para garantizar la preservación de su DNA, debido a que la diseminación de las bacterias por todo el esqueleto es rápida en estos casos. Entre más joven es el individuo afectado, es mayor la probabilidad de obtener DNA amplificable En contraste con los adultos afectados por la sífilis venérea, en los que el número de espiroquetas en los huesos se reduce a medida que la enfermedad avanza (Montiel *et al.*, 2012). En consecuencia, la utilización de restos óseos de neonatos sería una opción viable para detectar DNA treponémico en huesos antiguos.

- Finalmente, es posible que el DNA treponémico, nunca estuviera presente en los huesos analizados porque los individuos no estaban infectados con este patógeno. Por lo tanto, el resultado de este estudio reflejaría un diagnóstico negativo adecuado. Sin embargo, estos individuos presentan signos de una enfermedad infecciosa que provocó deformaciones óseas. Si el agente causal no es *T. pallidum*, sería un patógeno que deje marcas similares. Los análisis morfológicos sugieren que podría tratarse de *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente por las deformaciones de las vértebras (Córdova-Tello *et al.*, 2012). Por lo que se implementó el marcador IS6110 con el fin de realizar el diagnóstico diferencial para esta micobacteria. No obstante, Hernández-Espinoza (2012) indica que varios de los individuos hallados en Tamtoc, presentan signos característicos de tuberculosis y frambesia, esto daría lugar a la posibilidad de co-infección de ambos patógenos. Debido a que las deformaciones en columna vertebral y costillas, son típicas en la tuberculosis osteoarticular, mientras que las deformaciones de los huesos largos de las extremidades inferiores, son características de treponematosis, principalmente en la frambesia (Meyer *et al.*, 2002; Hernández-Espinoza, 2012).

### **6.3. Tuberculosis antigua**

En estudios previos se analizaron molecularmente restos óseos con signos de sífilis, pero no se encontró DNA de *T. pallidum*, en cambio, se detectó DNA de *M. tuberculosis* en algunas de sus muestras (Bouwman y Brown, 2005). Lo que demostró que el aDNA de micobacterias es más fácil de detectar, debido a que la cápsula proporciona protección contra la degradación del DNA, aún después de la muerte. Por otra parte, los treponemas carecen de cápsula y son susceptibles a la degradación ambiental, lo que explicaría la dificultad para recuperar DNA treponémico en los restos arqueológicos (Bouwman y Brown, 2005; von Hunnius *et al.*, 2007).

En este estudio, la ausencia de amplificación con la PCR anidada para la identificación de IS6110 de *M. tuberculosis*, podría deberse a que los productos de la primera PCR fueron amplicones inespecíficos con el tamaño esperado. Para descartar una falla metodológica no relacionada a la secuencia (temperatura de alineamiento no óptima para los *primers* internos, un exceso de DNA o artefactos), que pudieran estar inhibiendo la segunda PCR, se realizó el *band-stab* PCR, que también ha mostrado ser útil para aislar productos entre varios amplicones inespecíficos en estudios de aDNA (Taylor *et al.*, 1996).

Sin embargo, la obtención de un producto de amplificación a partir de una PCR semianidada sugirió un resultado positivo para *M. tuberculosis*, en los entierros 17, 19 y 8, debido a que esta técnica aumenta la especificidad. No obstante, los resultados de la secuenciación sugieren la presencia de varios moldes de DNA provenientes de distintos organismos, principalmente saprófitos.

Esto se comprobó al realizarse un análisis *in silico* con la herramienta *primer-BLAST* en la página del NCBI. Los *primers* externos IS1 e IS2 (Eisenach *et al.*, 1990), presentaron potenciales productos no deseados, principalmente de arqueas de los géneros *Haloferax* y *Haloarcula*. Por su parte, los *primers* internos IS3 e IS4 (Taylor *et al.*, 1996), podrían producir amplicones de arqueas del género *Thermoproteus*. Incluso se amplifican productos con las combinaciones *forward-forward* y *reverse-reverse* (resultados no mostrados). Lo que explicaría los resultados obtenidos en la secuenciación, ya que los *primers* de IS6110 podrían unirse a secuencias de DNA procedentes de la microbiota del suelo, y generarían artefactos de secuenciación (Höss *et al.*, 1996).

Esta inespecificidad de los *primers* para IS6110 puede deberse a que las especies de arqueas y bacterias, secuenciadas y registradas en las bases de datos, son pocas, comparadas con la abundante diversidad microbiana (Ward *et al.*, 1992;

Wintzingerode, Göbel y Stackebrandt, 2006), que suele colonizar los restos arqueológicos.

La presencia de estos artefactos en la amplificación del producto de la PCR semianidada, no permitió detectar la presencia de la secuencia de IS6110 de *M. tuberculosis*. Lo que podría resolverse al separar los productos de PCR del mismo tamaño mediante clonación. Por lo que en futuros análisis se propone la realización de esta técnica, que permitirá identificar la variedad de secuencias presentes en las muestras.

#### **6.4. Resultados no concluyentes de *M. tuberculosis* en otros estudios**

El resultado de Steffani-Vallejo (2014) sobre el entierro 47 de Tamtoc debe tomarse con cautela. En un análisis detallado se observó que podría haber un error de interpretación. Debido a que en su alineamiento de BLAST incluyó los *primers*, esto arrojó un porcentaje de identidad del 77%, respecto a la inserción repetitiva IS1081 de *M. tuberculosis*. No obstante, es de esperarse que durante una PCR los amplicones tengan la misma secuencia que los *primers* en sus extremos 5' y 3', por lo que podrían existir varios moldes del mismo tamaño, con secuencias distintas en la parte interna e idénticas en los extremos. Debe considerarse que los *primers* se diseñan y sintetizan artificialmente; por lo tanto, una secuencia que haya sido amplificada por PCR requiere ser editada para eliminar los *primers* antes de su análisis. En particular cuando se trabaja con secuencias cortas como en el aDNA, ya que estos pueden sesgar el análisis y producir falsos positivos.

El fragmento obtenido por Steffanni-Vallejo, tiene un tamaño de 141 pb, que incluye 38 pb con ambos *primers*, lo que deja una secuencia real de 103 pb. Cuando se realizó el BLAST con esta secuencia de 103 pb del entierro 47 de Tamtoc, se encontró que no pertenece al DNA de algún miembro del complejo *M. tuberculosis*.

Al excluir los *primers*, el organismo que aparece en primer lugar de la lista en el BLAST, al igual que en el análisis hecho por el autor, es *Frankia sp*, ahora con 83% (80 de 96 pb) de identidad y 93% de cobertura, lo que abarca casi el total de la secuencia real. Esta es una bacteria fijadora de nitrógeno, común en el suelo. Entre los miembros del género *Mycobacterium* que se presentan en este alineamiento son *M. kansasii* con una cobertura del 44% e identidad del 95%; y de forma similar *M. gilvum* con una cobertura del 48% e identidad del 90%.

Con esta evidencia es más probable que la secuencia aislada por Steffani-Vallejo (2014) a partir del DNA del entierro 47 de Tamtoc, pertenezca a la microbiota del suelo.

Por otra parte, el reporte de amplificación exitosa de la inserción IS6110 de *M. tuberculosis*, reportada por Martínez-Mora *et al.*, (2014), a partir de una vértebra del entierro 9 de Pajones; también debe tomarse con cautela, ya que el análisis molecular se realizó en un laboratorio donde se trabaja con *M. tuberculosis*. Lo que potencia la probabilidad de contaminación con DNA actual del patógeno. Por lo tanto, este resultado molecular no es concluyente.

## 6.5. Análisis de mtDNA

La obtención de mtDNA y tipificación exitosa de tres individuos (entierros 8, 9 y 19) por análisis de restricción, los asignó al haplogrupo mitocondrial A, el más común en México.

Las tibias de los entierros 9 y 19 se encontraban completas, en un estado óptimo para trabajarse con aDNA humano. Un hueso conservado en forma íntegra protege el contenido interno de los daños tafonómicos y de la contaminación con DNA actual. Esto puede explicar porque estos individuos pudieron tipificarse de forma

confiable. La ausencia de amplificación con los *primers* que abarcan la RHI completa (455 pb) y el grado de dificultad que implicó la obtención de los tres fragmentos traslapados, permite inferir que se trata de aDNA, con un nivel de fragmentación típico. En contraste, el fragmento de la RHI del entierro 8 fue de 455 pb, por lo que este resultado debe tomarse con cautela, ya que podría tratarse de DNA contemporáneo. Debido a que el DNA de un individuo con cerca de 2,000 años de antigüedad, en condiciones de daño tafonómico extenso es poco probable que conserve una secuencia de DNA de esa longitud. Asimismo, los restos óseos del entierro 8 estaban fragmentados, lo que pudo exponerlos a la contaminación.

La RHI del entierro 19 presentó dos de tres sitios polimórficos 16,223 y 16,319 característicos del haplotipo que corresponde al haplogrupo A. La ausencia del polimorfismo 16,290 puede deberse a los cambios producidos por el daño *post-mortem*, que originaron una mutación en esta base; evento común en el aDNA (Gilbert *et al.*, 2003a). También es posible que se trate de un haplotipo raro, ya que no presentó sitios polimórficos relacionados con los otros haplogrupos, por lo que no contradice el resultado de restricción. Recientemente se han encontrado indígenas actuales pertenecientes a poblaciones mazahuas, otomíes y mixtecas, que no presentan el sitio 16,290 y son del haplogrupo A (comunicación personal A. González-Oliver). Este es el primer reporte de esta variante del haplogrupo A en un individuo antiguo de Mesoamérica.

Los resultados del entierro 17 muestran la presencia de por lo menos dos moldes de DNA contaminantes, por lo que se considera que uno de los tres haplogrupos identificados, pertenece al individuo. Aunado a esto, ambos productos obtenidos de la RHI tienen una longitud de 455 pb; lo que indica que es más probable que se trate de un fragmento de DNA contemporáneo. Este resultado puede atribuirse a que el hueso proporcionado se encontraba completamente fragmentado. Con el fin de eliminar la contaminación, un fragmento de hueso se sumergió en hipoclorito de sodio concentrado, durante cuatro minutos, sin embargo, esto no eliminó el DNA exógeno. Una fuente común de contaminación de los restos arqueológicos es el

DNA de los mismos arqueólogos y antropólogos que manipulan los huesos durante las excavaciones y en el proceso de transporte, limpieza y almacenamiento, previo al análisis molecular (Cooper, 1997; Gilbert *et al.*, 2003a; Serre, *et al.*, 2004). La porosidad del hueso y la dentina son las principales vías de entrada del DNA generado por el sudor, fragmentos de piel y células exhaladas (Willerslev y Cooper, 2005). Una vez que el DNA contaminante llega a la muestra parece imposible de eliminar, a pesar de los tratamientos intensivos con radiación UV y cloro (Gilbert *et al.*, 2005).

La ausencia de mtDNA en el entierro 42, probablemente se debe a que no había DNA endógeno amplificable en estos restos. Las tibias en particular presentaban las epífisis destruidas por el daño tafonómico, la tierra había penetrado en toda la estructura interna, lo que pudo ocasionar la degradación del DNA endógeno.

Debido a los resultados obtenidos con los entierros 8, 17 y 42, los entierros 14-1 y 14-2 se descartaron para el análisis de mtDNA, al no encontrarse en estado óptimo para trabajar con aDNA humano, cualquier resultado sería dudoso.

Los resultados de este estudio, así como los de otros estudios de aDNA realizados a partir de los restos de los mismos sitios arqueológicos, evidencian la necesidad de analizar únicamente huesos en estado de conservación adecuada para los análisis moleculares. Las condiciones de preservación de las muestras son fundamentales para considerar someterlos a un análisis de aDNA. Principalmente en paleopatología molecular, ya que las bacterias y arqueas del suelo invaden las muestras óseas arqueológicas y son una fuente de contaminación difícil de eliminar, lo que provoca artefactos de PCR y falsos positivos.

## VII. CONCLUSIONES

La ausencia de detección de DNA treponémico en los restos arqueológicos utilizados en este estudio, podría deberse a alguna de las siguientes razones: 1) la falta de sensibilidad del método empleado, 2) la degradación del DNA del patógeno, 3) la carga bacteriana reducida al momento de la muerte, y 4) a que los signos en los huesos fueron producidos por otro microorganismo.

Las bacterias y arqueas que se encuentran en el suelo invaden los restos óseos, lo que provoca artefactos de PCR y falsos positivos en los estudios de paleopatología molecular.

Los restos óseos que presentan marcas sugerentes de una treponematosi, conservan poco o nada de DNA de treponémico, por lo que no son recomendables para los análisis de paleopatología molecular.

Los análisis de *M. tuberculosis* realizados en los huesos de los sitios arqueológicos de Pajones y Tamtoc, en estudios previos, así como los de este estudio, no permiten asegurar que alguno de estos individuos haya estado infectado de tuberculosis, debido a que no existe un resultado molecular positivo confiable.

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación pueden contribuir en la detección de aDNA de *T. pallidum*, lo que mejoraría los diagnósticos en restos arqueológicos, que a su vez generarían un panorama detallado a nivel mundial sobre los casos positivos de sífilis en poblaciones antiguas y, en consecuencia, permitiría tener una tasa de reloj molecular viable para *T. pallidum*, necesaria para realizar una estimación precisa de las fechas de divergencia de los clados treponémicos. Información que se desconoce actualmente y puede auxiliar en la resolución de la controversia en torno al origen de la sífilis.

## LITERATURA CITADA

- Anderson, J. E. (1965). Human skeletons of Tehuacan. *Science*, 148(3669), 496–497.
- Antal, G. M., Lukehart, S. A. y Meheus, A. Z. (2002). The endemic treponematoses. *Microbes and Infection*, 4(1), 83–94.
- Armangil, D., Canpolat, F. E., Yiğit, Ş., Demir, H. A. y Ceyhan, M. (2009). Early congenital syphilis with isolated bone involvement: A case report. *Turkish Journal of Pediatrics*, 51(2), 169–171.
- Austin, J. J., Ross, A. J., Smith, A. B., Fortey, R. A. y Thomas, R. H. (1997). Problems of reproducibility--does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1381), 467–474.
- Baker, B. J. y Armelagos, G. J. (1988). The origin and antiquity of syphilis: paleopathological diagnosis and interpretation. *Current Anthropology*, 29(5), 703–38.
- Baker-Zander, S. y Sell, S. (1980). A histopathologic and immunologic study of the course of syphilis in the experimentally infected rabbit. Demonstration of long-lasting cellular immunity. *The American Journal of Pathology*, 101(2), 387–414.
- Bandyopadhyay, B. N. (1926). Congenital Yaws. *Indian Medical Gazette*, 61(3), 120–121.
- Barnes, I. y Thomas, M. G. (2006). Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collections. *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society*, 273(1587), 645–653.
- Bauer, W. H. (1944). Tooth Buds and Jaws in Patients with Congenital Syphilis: Correlation between Distribution of *Treponema pallidum* and Tissue Reaction. *The American Journal of Pathology*, 20(2), 297–319.
- Bergot, B. J., Chakerian, V., Connell, C. R., Eadie, J. S., Fung, S., Davi, N. H., ... Woo, S. L. (1996). Spectrally resolvable rhodamine dyes for nucleic acid sequence determination. *Biotechnology Advances*, 1(14), 85.
- Bhavsar, D., Zheng, H. y Drysdale, J. (1994). Chimerism in PCR Products from a Multigene Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Bjourson, A. J. y Cooper, J. E. (1992). Band-stab PCR: a simple technique for the purification of individual PCR products. *Nucleic Acids Research*, 20(17), 4675.
- Blondiaux, J. y Alduc-Le Bagousse, A. (1994). Une treponematose du Bas-Empire romain en Normandie. In O. Dutour, Gy. Pálfi, J. Bérato, JP Brun (eds). *L'origine de la syphilis en Europe, avant ou après* (pp. 99–100).
- Blondiaux, J., Bagousse, A. A., Dutour, O., Pálfi, G. y Berato, J. (1994). A treponematoses dated from the Late Roman Empire in Normandie, France. In *The Origin of Syphilis in Europe: Before or After 1493* (pp. 99–100).

- Bogdan, G. y Weaver, D. S. (1988). Possible treponematoses in human skeletons from a Pre-Columbian ossuary of coastal North Carolina. In *American Journal of Physical Anthropology* (Vol. 75, pp. 187–188).
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. y van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503.
- Bouis, D. A., Popova, T. G., Takashima, A. y Norgard, M. V. (2001). Dendritic Cells Phagocytose and Are Activated by *Treponema pallidum*. *Dendritic Cells Phagocytose and Are Activated by Treponema pallidum*, 69(1), 518–528.
- Bouwman, A. S. y Brown, T. A. (2005). The limits of biomolecular palaeopathology: ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis. *Journal of Archaeological Science*, 32(5), 703–713.
- Brooks, S. T., Brooks, R. H. y Perizonius, W. R. K. (1994). Possible Syphilitic Lesions: Problem Cases from Holland and New Guinea. In *L'origine de la Syphilis en Europe: Avant Ou Après 1493* (pp. 226–232).
- Brothwell, D. (1970). Real history of syphilis. *Science Journal*, 6(9), 27.
- Brothwell, D. (1978). Possible Evidence of Parasitisation of Early Mexican Communities by the Micro-organism *Treponema*. *Bulletin of the Institute of Archaeology*, (15), 113–130.
- Brown, D. L. y Frank, J. E. (2003). Diagnosis and management of syphilis. *American Family Physician*, 68(2), 283–290.
- Brues, A. M. (1958). Skeletal material from the Horton Site. *Bulletin of the Oklahoma Anthropological Society*, 6, 27–32.
- Buckley, H. R. (2000). Subadult health and disease in prehistoric Tonga, Polynesia. *American Journal of Physical Anthropology*, 113(January 1999), 481–505.
- Bullen, A. K. (1972). Paleoepidemiology and distribution of prehistoric treponemiasis (syphilis) in Florida. *Florida Anthropologist*, 25(4), 133–174.
- Burgos, J. D., Correal-Urrego, G. y Arregocés, C. (1994). Treponematoses en restos óseos precerámicos de Columbia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 19, 273–281.
- Burstain, J. M., Grimprel, E., Lukehart, S. A., Norgard, M. V y Radolf, J. D. (1991). Sensitive Detection of *Treponema pallidum* by Using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(1), 62–69.
- Butler, C. S. (1936). *Syphilis sive morbus humanus*. Lancaster: Pa: Science Press.
- Cartwright, F. F. y Biddiss, M. D. (1972). *Disease and history*. New York: Marboro Books.
- Cassidy, C. M. (1980). Nutrition and Health in Agriculturalists and Hunter-Gatherers: a Case Study of the Prehistoric Populations. In N. W. Jerome, R. F. Kandel y G. H. Peltó (Eds.), *Nutritional Anthropology* (pp. 117–145). Redgrave.
- Centurion-Lara, A., Castro, C., Van Voorhis, W. C. y Lukehart, S. A. (1996). Two 16S-23S ribosomal DNA intergenic regions in different *Treponema pallidum* subspecies contain tRNA genes. *FEMS Microbiology Letters*, 143(2-3), 235–240.

- Centurion-Lara, A., Arroll, T., Castillo, R., Shaffer, J. M., Castro, C., Van Voorhis, W. C. y Lukehart, S. A. (1997). Conservation of the 15-kilodalton lipoprotein among *Treponema pallidum* subspecies and strains and other pathogenic treponemes: Genetic and antigenic analyses. *Infection and Immunity*, 65(4), 1440–1444.
- Centurion-Lara, A., Castro, C., Castillo, R., Shaffer, J. M., Van Voorhis, W. C. y Lukehart, S. a. (1998). The flanking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(4), 1036–40.
- Centurion-Lara, A., LaFond, R. E., Hevner, K., Godornes, C., Molini, B. J., Van Voorhis, W. C. y Lukehart, S. A. (2004). Gene conversion: A mechanism for generation of heterogeneity in the tprK gene of *Treponema pallidum* during infection. *Molecular Microbiology*, 52(6), 1579–1596.
- Centurion-Lara, A., Molini, B. J., Godornes, C., Sun, E., Hevner, K., Van Voorhis, W. C. y Lukehart, S. a. (2006). Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3377–80.
- Cimino, G. D., Metchette, K., Isaacs, S. T. y Zhu, Y. S. (1990). More false-positive problems. *Nature*, 345(6278), 773–774.
- Cockburn, T. A. (1961). The origin of the treponematoses. *Bulletin of the World Health Organization*, 24, 221–228.
- Cole, H. N., Harkin, J. C., Kraus, B. S. y Moritz, A. R. (1955). Pre-Columbian Osseous Syphilis: Skeletal Remains Found at Kinishba and Vandal Cave, Arizona, with Some Comments on Pertinent Literature. *Archives of Dermatology*, 71(2), 231–238.
- Conde-González, C. J., Valdespino, J. L., Juárez-Figueroa, L. A., Palma, O., Olamendi-Portugal, M., Olaiz-Fernández, G. y Sepúlveda, J. (2007). Prevalencia de anticuerpos antitreponémicos y características sociodemográficas de la población mexicana adulta en el año 2000. *Salud Publica de Mexico*, 49(SUPPL. 3).
- Conde-Sendín, M. A., Hernández-Fleta, J. L., Cárdenes-Santana, M. A. y Amela-Peris, R. (2002). Neurosyphilis: forms of presentation and clinical management. *Revista de Neurología*, 35(4), 380–386.
- Cone, R. W. y Fairfax, M. R. (1993). Protocol for ultraviolet irradiation of surfaces to reduce PCR contamination. *Genome Research*, 3(3), 15–18.
- Cooper, A. (1997). Ancient DNA: how do you really know when you have it? *American Journal of Human Genetics*, 60, 1001–1002.
- Cooper, A. y Poinar, H. N. (2000). Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, 289(5482), 1139b–1139.
- Córdova, G. (2004). Proyecto arqueológico Valle del río Súchil, Zacatecas y Durango. Archivo Técnico de La Coordinación Nacional de Arqueología Del INAH, México.
- Córdova-Tello, G., Martínez-Mora, E. y Hernández-Espinoza, P. (2009). Proyecto arqueológico Origen y desarrollo del paisaje urbano de Tamtok, San Luis Potosí. Informe Técnico Parcial 2009, 1.

- Córdova-Tello, G., Martínez-Mora, E. y Hernández-Espinoza, P. (2012). Tamtoc: esbozo de una antigua sociedad urbana. México D. F.: Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Córdova-Tello, G. Dirección de Estudios Arqueológicos, INAH (comunicación personal), 9 de marzo de 2016.
- Cox, C. D. y Barber, M. K. (1974). Oxygen uptake by *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 10(1), 123–127.
- Crespo, E. (1999). Evidencia de treponematosi precolombina procedente de Paso del Indio: un sitio arqueológico en la isla de Puerto Rico. *Estudios de Antropología Biológica*, 9, 247–263.
- Crosby, A. W. (1969). The Early History of Syphilis: A Reappraisal. *American Anthropologist*, 71, 218–227.
- Daws, J. D. y Magilton, J. R. (1980). The Archeology of York. Vol. 12, fasc. I: The cemetery of St. Helen-on-the-Walls. York, England (Archaeolog). York: Aldwark, England: Archeological Trust.
- de Melo, F. L., de Mello, J. C. M., Fraga, A. M., Nunes, K. y Eggers, S. (2010). Syphilis at the crossroad of phylogenetics and paleopathology. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(1), e575.
- de Villalba, J. (1803). *Epidemiología Española, o Historia cronológica de las Pestes, Contagios, Epidemias y Epizootias, que han acaecido en España des de la Venida de los Cartagineses hasta el año 1801*. Villalpando.
- Deacon, W. E., Falcone, V. H. y Harris, A. (1957). A fluorescent test for treponemal antibodies. *Experimental Biology and Medicine*, 96(2), 477–480.
- Dennie, C. C. (1962). *A history of syphilis*. Springfield: Charles C. Thomas.
- Denninger, H. S. (1938). Syphilis of Pueblo skull before 1350. *American Medical Association*.
- Díaz de Isla, R. (1539). *Tractado llamado Fructo de todos los Santos contra el mal serpentina venido de la Isla Española fecho y ordenado en el grande e famoso hospital de Todos los Santos*. Siviglia: de Robertis.
- Douglas, M. T. (2016). Skeletal biology of Apurguan: A precontact Chamorro site on Guam *Skeletal Biology of Apurguan: A Precontact*, 8644(January).
- Donoghue, H. D., Hershkovitz, I., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y.-C., Galili, E., ... Bar-Gal, G. K. (2009). Biomolecular archaeology of ancient tuberculosis: response to “Deficiencies and challenges in the study of ancient tuberculosis DNA” by Wilbur *et al.* (2009). *Journal of Archaeological Science*, 36(12), 2797–2804.
- Eisenach, K. D., Cave, M. D., Bates, J. H. y Crawford, J. T. (1990). Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 161(5), 977–981.
- El-Najjar, M. Y., DeSanti, M. V. y Ozbek, L. (1978). Prevalance and Possible Etiology of Dental Enamel Hypoplasia. *American Journal of Physical Anthropology*, 48, 185–192.

- El-Najjar, M. Y. (1979). Human Treponematosi and Tuberculosis: Evidence from the New World. *American Journal of Physical Anthropology*, 51(4), 599–618.
- Elting, J. J. y Starna, W. A. (1984). A possible case of pre-columbian treponematosi from New York State. *American Journal of Physical Anthropology*, 65(3), 267–273.
- Evans, D. (2000). Buried with the friars. *Br Archaeol*, 53, 1–6.
- Faerman, M., Jankauskas, R., Gorski, A., Bercovier, H. y Greenblatt, C. L. (1997). Prevalence of human tuberculosis in a medieval population of Lithuania studied by ancient DNA analysis. *Ancient Biomolecules*, 1, 205–214.
- Fieldsteel, A. H., Cox, D. L. y Moeckli, R. A. (1981). Cultivation of *Treponema pallidum* in tissue culture. *Infection and Immunity*, 32(2), 908–915.
- Flores-Ramírez, R. M. (2009). Informe técnico del análisis antropofísico realizado a los restos óseos recuperados en el sitio Gasolinera-Kiosco, Colima, Colima.
- Flores-Ramírez, R. M. Centro INAH Colima (comunicación personal), 21 de septiembre de 2013.
- Fornaciari, G., Naccarato A. G., Fabbri, P. F. y Mallegni, F. (1994). A case of diffuse skeletal treponematosi from the late Middle-Ages (14-16 th century) in Southern Italy. In *The Origin of Syphilis in Europe. Before or After 1493?* Editions E. Paris. pp. 211–214.
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., ... Venter, J. C. (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5375), 375–88.
- Fribourg-Blanc, A. y Mollaret, H. H. (1968). Natural treponematosi of the African primate. *Primates in Medicine*, 3, 113–121.
- Gejvall, N. G. y Henschen, F. (1971). Anatomical evidence of pre-columbian syphilis in the West Indian Islands. *Beiträge Zur Pathologie*, 144(2), 138.
- Gerszten, P. C., Gerszten, E. y Allison, M. J. (1998). Diseases of the skull in pre-Columbian South American mummies. *Neurosurgery*, 42(5), 1145–1151.
- Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Rudbeck, L., Barnes, I., Lynnerup, N. y Cooper, A. (2003a). Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *American Journal of Human Genetics*, 72(1), 48–61.
- Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Hansen, A. J., Barnes, I., Rudbeck, L., Lynnerup, N. y Cooper, A. (2003b). Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics*, 72(1), 32–47.
- Gilbert, M. T. P., Rudbeck, L., Willerslev, E., Hansen, A. J., Smith, C., Penkman, K. E. H., ... Collins, M. J. (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.
- Gladkowska-Rzeczycka, J. J. (1994). Syphilis in ancient and medieval Poland. In *The Origin of Syphilis in Europe. Before or After* (pp. 116–118).
- Goebel, T., Waters, M. y Dikova, M. (2003). The Archaeology of Ushki Lake, Kamchatka, and the Pleistocene Peopling of the Americas. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5632), 501–505.

- Goldstein, M. S. (1957). Skeletal pathology of early Indians in Texas. *American Journal of Physical Anthropology*, 15(3), 299–311.
- González-Oliver, A., Márquez-Morfin, L., Jiménez, J. C. y Torre-Blanco, A. (2001). Founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in ancient Maya from Xcaret, Quintana Roo. *American Journal of Physical Anthropology*, 116(3), 230–235.
- González-Oliver, A. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM (comunicación personal), 2 de enero de 2016.
- Gram, H. C. J. y Friedlaender, C. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten. Theodor Fischer's medicinischer Buchhandlung.
- Gray, R. R., Mulligan, C. J., Molini, B. J., Sun, E. S., Giacani, L., Godornes, C., ... Centurion-Lara, A. (2006). Molecular evolution of the tprC, D, I, K, G, and J genes in the pathogenic genus *Treponema*. *Molecular Biology and Evolution*, 23(11), 2220–33.
- Grimprel, E., Sanchez, P. J., Wendel, G. D. y Burstain, J. M. (1991). Use of Polymerase Chain Reaction and Rabbit Infectivity Testing To Detect *Treponema pallidum* in Amniotic Fluid, Fetal and Neonatal Sera, and Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(8), 1711–1718.
- Grin, E. I. (1956). Endemic syphilis and yaws. *Bulletin of the World Health Organization*, 15(6), 959–973.
- Hackett, C. J. (1963). On the Origin of the Human Treponematoses. *Bulletin of the World Health Organization*, 29, 7–41.
- Haltrom, W. L. y Shands Jr, A. R. (1938). Evidences of syphilis in Mound Builders' bones. *Arch Pathol*, 25, 228–242.
- Hamlin, H. (1939). The Geography Of Treponematoses. *Yale Journal of Biologu and Medicine*, 12(1), 29–50.
- Handt, O., Krings, M., Ward, R. H. y Pääbo, S. (1996). The retrieval of ancient human DNA sequences. *American Journal of Human Genetics*, 59(2), 368–76.
- Haqqi, T. M., Sarkar, G., David, C. S. y Sommer, S. S. (1988). Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 16(24), 11844.
- Harper, K. N., Ocampo, P. S., Steiner, B. M., George, R. W., Silverman, M. S., Bolotin, S., ... Armelagos, G. J. (2008). On the origin of the treponematoses: a phylogenetic approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(1), e148.
- Harper, K. N., Zuckerman, M. K., Harper, M. L., Kingston, J. D. y Armelagos, G. J. (2011). The origin and antiquity of syphilis revisited: an appraisal of Old World pre-Columbian evidence for treponemal infection. *American Journal of Physical Anthropology*, 146 Suppl, 99–133.
- Harris, A., Rosenberg, A. A. y Riedel, L. M. (1946). A Microflocculation Test for Syphilis using Cardiolipin Antigen. Preliminary Report. *Journal of Venereal Disease Information*, 27(7), 169–174.
- Harrison, L. W. (1959). The Origin of Syphilis. *British Journal of Venereal Diseases*, 35(1), 1–7.

- Hayhurst, E. R. (1927). The Origin Of Syphilis. *British Medical Journal*, 1(3455), 596.
- Henneberg, M. y Henneberg, R. J. (1994). Treponematosi in an ancient Greek colony of Metaponto, southern Italy, 580–250 BCE. The Origin of Syphilis in Europe: Before or After 1493.
- Henneberg, R. J. y Henneberg, M. (1995). Possible occurrence of treponematosi in the ancient Greek colony of Metaponto. *Am J Phys Anthropol*, 107–108.
- Hernández-Espinoza, P. O. (2012). Los entierros de La Noria: esbozo bioarqueológico. In Tamtoc. Esbozo de una antigua sociedad urbana (pp. 95–126).
- Hernández-Espinoza, P. O. Centro INAH Sonora (comunicación personal), 16 de mayo de 2013.
- Hernández-Trejo, M., Hernández-Prado, B., Uribe-Salas, F., Juárez-Figueroa, L. y Conde-González, C. J. (2006). Sífilis materna y congénita en dos hospitales mexicanos: Evaluación de una prueba diagnóstica rápida. *Revista de Investigación Clínica*, 58(2), 119–125.
- Herrera-Ortiz, A., Uribe-Salas, F. J., Olamendi-Portugal, L., García-Cisneros, S., Conde-Glez, C. J. y Sánchez-Alemán, M. A. (2015). Análisis de la tendencia de sífilis adquirida en México durante el periodo 2003-2013. *Salud Pública de México*, 57(4), 335–342.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. y Wilson, A. C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312(5991), 282–284.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M. y Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews. Genetics*, 2(5), 353–9.
- Holcomb, R. C. (1934). Christopher Columbus and the American origin of syphilis (Vol. 32). US Government Printing Office.
- Holcomb, R. C. (1937). The history of syphilis. *Journal of the American Medical Association*, 109(12), 972.
- Holcomb, R. C. (1940). Syphilis of the Skull among Aleuts, and the Asian and North American Eskimo about Bering and Arctic Seas. *US Naval Medical Bulletin*, 38, 177–192.
- Holt, S. C. (1978). Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiological Reviews*, 42(1), 114–160.
- Hong, J. (1997). Origin and spread of syphilis. The University of Montana.
- Hook, E. W., Martin, D. H., Stephens, J., Smith, B. S., Smith, K. I. M. y Ascp, M. T. (2002). Benzathine Penicillin G for Treatment of Early Syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*, 29(8), 486–490.
- Hooton, E. A. (1930). Indians of Pecos Pueblo: A study of their skeletal remains. Yale University Press.
- Horai, S., Kondo, R., Nakagawa-Hattori, Y. y Hayashi, S. (1993). Peopling of the Americas, Founded by Four Major Lineages of Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 10(1), 23–47.

- Höss, M., Handt, O. y Pääbo, S. (1994). Recreating the past by PCR. *The Polymerase Chain Reaction*, 257–264.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M. y Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, 24(7), 1304–7.
- Hudson, E. H. (1928). Treponematoses among the Bedouin Arabs of the Syrian Desert. *Naval Medical Bulletin*, 26(4), 817–825.
- Hudson, E. H. (1958). The Treponematoses or Treponematoses? *Sexually Transmitted Infections*, 34(1), 22–23.
- Hudson, E. H. (1965). Treponematoses and Man's Social Evolution. *American Anthropologist*, 67(4), 885–901.
- Hummel, S. (2003). *Ancient DNA Typing*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hunnius, T. E. Von, Roberts, C. A., Boylston, A. y Saunders, S. R. (2006). Histological Identification of Syphilis in Pre-Columbian England. *American Journal of Physical Anthropology*, 129, 559–566.
- Hutchinson, D. L. (1993). Treponematoses in regional and chronological perspective from central Gulf Coast Florida. *American Journal of Physical Anthropology*, 92(3), 249–261.
- Hutchinson, J. (1863). *A clinical memoir on certain diseases of the eye and ear, consequent on inherited syphilis*. Birmingham, Ala.: Classics Ophthalmology Library.
- Hyde, J. N. (1891). A contribution to the study of pre-Columbian syphilis in America. *The American Journal of the Medical Sciences*, 102(2), 117–130.
- Ingraham, J. L. y Ingraham, C. A. (1998). *Introduction to Microbiology*. (developmental ed. H. Prentiss, Ed.). Barcelona.
- Inhorn, M. C. y Brown, P. J. (1990). The anthropology of infectious disease. *Annual Reviews of Anthropology*, 19, 89–117.
- Izard, J., Renken, C., Hsieh, C.-E., Desrosiers, D. C., Dunham-Ems, S., La Vake, C., ... Radolf, J. D. (2009). Cryo-electron tomography elucidates the molecular architecture of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Journal of Bacteriology*, 191(24), 7566–80.
- Jacobi, K. P., Cook, D. C., Corruccini, R. S. y Handler, J. S. (1992). Congenital syphilis in the past: slaves at Newton Plantation, Barbados, West Indies. *American Journal of Physical Anthropology*, 89(2), 145–158.
- Jaffe, H. L. (1972). *Metabolic, degenerative, and inflammatory diseases of bones and joints*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Jones, J. (1880). *Explorations of the aboriginal remains of Tennessee (Vol. 22)*. Smithsonian institution.
- Kalendar R, Lee D, Schulman A. H. (2014). FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *DNA Cloning and Assembly Methods, Methods in Molecular Biology*, 1116: 271-302.

- Kaye, M. (2008). Molecular Identification and Analysis of Treponematoses (syphilis, Bejel, Yaws, Or Pinta) in Ancient Mummified Remains from Northern Chile and Southern Peru. ProQuest.
- Kellogg, D. S. y Mothershed, S. M. (1969). Immunofluorescent detection of *Treponema pallidum*: a review. *Jama*, 207(5), 938–41.
- Kennedy, K. A. R. (1990). Reconstruction of trauma, disease and lifeways of prehistoric peoples of South Asia from the skeletal record. In International Conference Association (pp. 61–77). in: Maurizio Taddei (Ed.), I.
- Kolman, C. J., Centurion-lara, A., Lukehart, S. A., Owsley, D. W. y Tuross, N. (1999). Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(6), 2060–2063.
- Korbie, D. J. y Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M. y Pääbo, S. (1997). Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell*, 90, 19–30.
- Krumbhaar, E. B. (1936). A Pre-Columbian Peruvian tibia exhibiting syphilitic (?) periostitis. *Annals of Medical History*, 8, 232–235.
- Kuhnen, C., Schultz, M., Bosse, A., Weber, A., Preuschoft, H. y Mueller, K.-M. (1999). Endemische Syphilis an den rekonstruierten Reliquien des Gottfried von Cappenberg. Eine palaeopathologische Studie. *Pathologie*, (20), 292–296.
- Lafond, R. E. y Lukehart, S. A. (2006). Biological Basis for Syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 29–49.
- Lamb, D. S. (1898). Pre-Columbian syphilis. In Proceedings of the Association of American Anatomists (pp. 63–69).
- Lanz, C. (1997). Ein möglicher Fall von tertiärer Syphilis aus dem Spätmittelalter: Dokumentation eines Skelettfundes aus dem ehemaligen Niederspital von Burgdorf.
- Larsen, S. A., Hambie, E. a., Pettit, D. E., Perryman, M. W. y Kraus, S. J. (1981). Specificity, sensitivity, and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody-absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(4), 441–445.
- Larsen, S. A., Steiner, B. M. y Rudolph, A. H. (1995). Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 1–21.
- Lee D. Cady. (1938). Syphilis. *The American Journal of Nursing*, 38(2), 115–121.
- Lewis, B. (1994). Treponematoses and Lyme borreliosis connections: explanation for Tchefuncte disease syndromes? *American Journal of Physical Anthropology*, 93(4), 455–475.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709–715.
- Livingstone, F. B. (1991). On the Origin of Syphilis: An Alternative Hypothesis. *Current Anthropology*, 32(5), 587–590.

- Lobdell, J. E., Owsley, D. y Harrison, L. W. (1974). The Origin of Syphilis. *The Journal of Sex Research*, 10(1), 76–79.
- López, C. y Estrada, S. (2005). Comparación de la técnica de inmunocromatografía con la prueba de aglutinación de partículas contra *T. pallidum* (TP-PA) para el diagnóstico confirmatorio de sífilis. *MEDICINA UPB*, 24(2), 159–163.
- MacCurdy, G. G. (1923). Human skeletal remains from the highlands of Peru. *American Journal of Physical Anthropology*, 6(3), 217–329.
- Madrid, A. (1986). Work in historical osteology at the National Museum of Antiquities in Sweden. *Museum International*, 38(3), 155–157.
- Magnuson, H. J., Thomas, E. W., Olansky, S., Kaplan, B. I., De Melo, L. y Cutler, J. C. (1956). Inoculation syphilis in human volunteers. *Medicine*, 34(1), 33–82.
- Mansilla, J. y Pijoán, C. (2000). La cueva de La Candelaria: bultos mortuorios y materiales. *Chungara*, 32(2), 211–215.
- Marangoni, A., Sambri, V., Storni, E., D'Antuono, A., Negosanti, M. y Cevenini, R. (2000). *Treponema pallidum* surface immunofluorescence assay for serologic diagnosis of syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(3), 417–421.
- Marsik, A. (1994). Data to the epidemiology of syphilis in ancient populations in Central Europe. *L'Origine de La Syphilis En Europe Avant Ou Aprés*, 1493, 233–236.
- Marra, C. M., Maxwell, C. L., Smith, S. L., Lukehart, S. a, Rompalo, A. M., Eaton, M., ... Barnett, S. H. (2004). Cerebrospinal fluid abnormalities in patients with syphilis: association with clinical and laboratory features. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(3), 369–376
- Martin, I. E., Gu, W., Yang, Y. y Tsang, R. S. W. (2009). Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(4), 515–521.
- Martinez del Rio, P. (1953). A preliminary report on the mortuary cave of Candelaria, Coahuila, Mexico. *Bulletin of Texas Archeological Society*, 24, 208–254.
- Martínez-Mora, E., Hernández-Espinoza, P. O. y Córdova-Tello, G. (2014). La presencia de tuberculosis vertebral en Chalchihuites, Zacatecas: una explicación desde la bioarqueología. *Boletín de Antropología. Universidad de Antioquía*, 29(47), 11–27.
- Martínez-Mora, E. Dirección de Estudios Arqueológicos, INAH (comunicación personal), 13 de noviembre de 2013.
- Means, H. J. (1925). A roentgenological study of the skeletal remains of the prehistoric mound builder Indians of Ohio. Paul B. Hoeber.
- Meyer, C., Jung, C., Kohl, T., Poenicke, A., Poppe, A. y Alt, K. W. (2002). Syphilis 2001 – a palaeopathological reappraisal. *HOMO - Journal of Comparative Human Biology*, 53(1), 39–58.
- Mindel, A., Tovey, S. J., Timmins, D. J. y Williams, P. (1989). Primary and secondary syphilis, 20 years' experience. 2. Clinical features. *Genitourin Med*, 65, 1–3.

- Mitchell, S. J., Engelman, J., Kent, C. K., Lukehart, S. A., Godornes, C. y Klausner, J. D. (2006). Azithromycin-Resistant Syphilis Infection: San Francisco, California, 2000 – 2004. *Clinical Infectious Diseases*, 42(3), 337–345.
- Montiel, R., Solórzano, E., Díaz, N., Álvarez-Sandoval, B. a, González-Ruiz, M., Cañadas, M. P., ... Malgosa, A. (2012). Neonate human remains: a window of opportunity to the molecular study of ancient syphilis. *PloS One*, 7(5), e36371.
- Moore, C. B. (1913). Some Aboriginal Sites in Louisiana and in Arkansas. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 16, 13.
- Morant, G. M. y Hoadley, M. F. (1931). A Study of the Recently Excavated Spitalfields Crania. *Biometrika*, 23(1/2), 191–248.
- Morse, D. (1967). Two Cases of Possible Treponemal Infection in Prehistoric America. *Miscellaneous Papers In Paleopathology*, 1(7), 48–60.
- Mulligan, C. J., Norris, S. J. y Lukehart, S. A. (2008). Molecular studies in *Treponema pallidum* evolution: toward clarity? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(1), e184.
- Murillo-Rodríguez, S. y Macín-Pérez, G. (2007). Los antiguos pobladores de Colima: un acercamiento osteológico. Sus costumbres funerarias. *Estudios de Antropología Biológica*, 13(1), 249–266.
- Nichols, J. C. y Baseman, J. B. (1975). Carbon Sources Utilized by Virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 12(5), 1044–1050.
- Niederhauser, C., Höfelein, C., Wegmüller, B., Lüthy, J. y Candrian, U. (1994). Reliability of PCR decontamination systems. *PCR Methods and Applications*, 4(2), 117–23.
- Noordhoek, G. T., Wolters, E. C., De Jonge, M. E. J. y Van Embden, J. D. a. (1991). Detection by Polymerase Chain Reaction of *Treponema pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid from Neurosyphilis Patients before and after Antibiotic Treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(9), 1976–1984.
- Norris, S. J. (1982). In vitro cultivation of *Treponema pallidum*: Independent confirmation. *Infection and Immunity*, 36(1), 437–439.
- Ortner, D. J. (1992). Skeletal paleopathology: probabilities, possibilities, and impossibilities. In *Disease and Demography in the Americas* (pp. 5–13). Washington: Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Ortner, D. J. (2003). Identification of pathological conditions in human skeletal remains. Academic Press.
- Orton, S. T. (1905). A Study of the Pathological Changes in Some Mound-builders' Bones from the Ohio Valley: With Especial Reference to Syphilis. *University of Pennsylvania Medical Bulletin*, 18, 36–44.
- Overballe-Petersen, S., Orlando, L. y Willerslev, E. (2012). Next-generation sequencing offers new insights into DNA degradation. *Trends in Biotechnology*, 30(7), 364–8.
- Pääbo, S. (1985). Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314(6012), 644–645.

- Pääbo, S. y Wilson, A. C. (1988). Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature*, 334(6181), 387–388.
- Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 1939–43.
- Pääbo, S., Higuchii, R. G. y Wilson, A. C. (1989). Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9709–9712.
- Pääbo, S., Irwin, D. M. y Wilson, A. C. (1990). DNA Damage Promotes Jumping between Templates during Enzymatic Amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(8), 4718–4721.
- Pálfi, G., Dutour, O. O., Borreani, M., Brun, J. y Berato, J. (1992). Pre-Columbian congenital syphilis from the late antiquity in France. *International Journal of Osteoarchaeology*, 2(June), 245–261.
- Penn, C. W., Cockayne, A. y Bailey, M. J. (1985). The outer membrane of *Treponema pallidum*: biological significance and biochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 131(9), 2349–2357.
- Penn, C. W. y Rhodes, J. G. (1982). Surface-associated antigens of *Treponema pallidum* concealed by an inert outer layer. *Immunology*, 46(1), 9–16.
- Pětrošová, H., Zabaníková, M., Čejková, D., Mikalová, L., Pospíšilová, P., Strouhal, M., ... Šmajš, D. (2012). Whole genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, strain Mexico A, suggests recombination between yaws and syphilis strains. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9), e1832.
- Piepenbrink, H. (1989). Examples of chemical changes during fossilisation. *Applied Geochemistry*, 4(3), 273–280.
- Pietrusewsky, M. (1969). An osteological study of cranial and infracranial remains from tonga. *Records of the Auckland Institutional Museum*, 6(4-6), 287–402.
- Pineda, C., Mansilla, J., Pijoan, C., Fernandez, S. y Martinez-Lavin, M. (1998). Radiographs of an ancient mortuary bundle support theory for the new world origin of syphilis. *American Journal of Roentgenology*, 171(2), 321–324.
- Portnoy, J., Brewer, J. H. y Harris, A. (1962). Rapid plasma reagin card test for syphilis and other treponematoses. *Public Health Reports*. Washington, D.C. 77(8), 645–652.
- Powell, M. L. (1988). On the eve of the conquest: life and death at Irene Mound, Georgia. In D. H. Thomas & C. S. Larsen (Eds.), *Postcontact biocultural adaptation of Native American populations on St. Catharines Island, Georgia*. American Museum of Natural History.
- Power, C. (1992). The spread of syphilis and a possible early case in Waterford. *Archaeology Ireland*, 20–21.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., ... Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4825), 336–341.
- Pruvost, M. y Geigl, E.-M. (2004). Real-time quantitative PCR to assess the

- authenticity of ancient DNA amplification. *Journal of Archaeological Science*, 31(9), 1191–1197.
- Quétel, C. (1990). History of syphilis. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland. pp 342.
- Rabkin, S. (1942). Dental conditions among prehistoric Indians of Northern Alabama. *Journal of Dental Research*, 21(2), 211–222.
- Radolf, J. D., Chamberlain, N. R., Clausell, A. y Norgard, M. V. (1988). Identification and localization of integral membrane proteins of virulent *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* by phase partitioning with the nonionic detergent triton X-114. *Infection and Immunity*, 56(2), 490–8.
- Radolf, J. D., Moomaw, C., Slaughter, C. A. y Norgard, M. V. (1989a). Penicillin-binding proteins and peptidoglycan of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infection and Immunity*, 57(4), 1248–1254.
- Radolf, J. D., Norgard, M. V. y Schulz, W. W. (1989b). Outer membrane ultrastructure explains the limited antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 2051–2055.
- Rao, V. V., Vasulu, T. S. y Rector Babu, A. D. W. (1996). Possible paleopathological evidence of treponematosi from a megalithic site at Agripalle, India. *American Journal of Physical Anthropology*, 100(1), 49–55.
- Ratnam, S. (2005). The laboratory diagnosis of syphilis. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 16(1), 45–51.
- Regazzi-Avelleira, J. C. y Bottino, G. (2006). Syphilis: diagnosis, treatment and control Sifilis: diagnóstico, tratamento e controle. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 81(2), 111–126.
- Reichs, K. J. (1989). Treponematosi: a possible case from the late prehistoric of North Carolina. *American Journal of Physical Anthropology*, 79(3), 289–303.
- Richards, M. B. B., Sykes, B. C. C. y Hedges, R. E. M. E. M. (1995). Authenticating DNA Extracted From Ancient Skeletal Remains. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 291–299.
- Roberts, C. A. (1994). Treponematosi in Gloucester, England: a theoretical and practical approach to the pre-Columbian theory. In *The Origin of Syphilis in Europe. Before or After 1493?* (Éditions E, pp. 101–108). Paris: Centre Archeologique du Var; Editions Errance.
- Rodríguez, J. V., Rodríguez, C. A. y Bernal, F. (1998). Dos posibles casos de treponematosi en restos prehispánicos del Valle del Cauca, Colombia. *Maguaré*, 13(4), 85–98.
- Rokhlin, D. G. (1965). Diseases of Ancient Men (bones of the men of various epochs-normal and pathological changed). Moscow-Leningrad: Publishing House Nauka.
- Rollo, F., Marota, I. y Fornaciari, G. (1996). La Sifilide nel Rinascimento: Identificazione di sequenze ribosomali batteriche nel DNA isolato dallo Mummia di Maria D'Aragona (XVI Secolo). *Antropo Contemp*, 19, 157–174.

- Roman, G. C. y Roman, L. N. (1986). Occurrence of congenital, cardiovascular, visceral, neurologic, and neuro-ophthalmologic complications in late yaws: A theme for future research. *Reviews of Infectious Diseases*, 8(5), 760–770.
- Rompalo, A. M., Joesoef, M. R., O'donnell, J. A., Augenbraun, M., Brady, W., Radolf, J. D., ... Donnell, J. A. O. (2001). Clinical Manifestations of Early Syphilis by HIV Status and Gender: Results of the Syphilis and HIV Study. *Sexually Transmitted Diseases*, 28(3), 158–165.
- Roney, J. G. (1966). Palaeoepidemiology: an example from California. In *Human palaeopathology* (pp. 99–120). Yale University Press New Haven.
- Roratto, P. A., Buchmann, D., Santos, S. y Bartholomei-santos, M. L. (2008). PCR-mediated recombination in development of microsatellite markers: Mechanism and implications. *Genetics and Molecular Biology*, 63, 58–63.
- Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R. y Chen, S. M. (1997). New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4500–4504.
- Rösing, F. W. (1999). *Gesundheit und Krankheit: Eine evolutionäre Perspektive*. Dickhuth (Eds.), *Gesundheit für alle. Fiktion oder Realität*, Schattauer, Stuttgart (Dickhuth). Stuttgart.
- Rothschild, B. M., Hershkovitz, I. y Rothschild, C. (1995). Origin of yaws in the Pleistocene. *Nature*, 378(6555), 343–4.
- Rothschild, B. M. y Rothschild, C. (1996). Treponemal Disease in the New World. *Current Anthropology*, 37(3), 555.
- Rothschild, B. M. y Rothschild, C. (1997). Congenital Syphilis in the Archaeological Record: Diagnostic Insensitivity of Osseous Lesions. *International Journal of Osteoarchaeology*, 7(July 1995), 39–42.
- Rothschild, B. M., Calderon, F. L., Coppa, A. y Rothschild, C. (2000). First European Exposure to Syphilis: The Dominican Republic at the Time of Columbian Contact. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), 936–941.
- Rothschild, B. M. (2003). *Infectious processes around the dawn of civilization. Emerging Pathogens: The Archaeology, Ecology, and Evolution of Infectious Disease*. Oxford University Press, London, 111(5).
- Salas-Cuesta, M. E. (1982). *La población de México-Tenochtitlán: estudio de osteología antropológica*. Instituto Nacional de Antropología e Historia, Departamento de Antropología Física.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–7.
- Sarkar, G. y Sommer, S. (1990). Shedding light on PCR contamination. *Nature*. 343(6253), 27.
- Saul, F. P. (1972). The human skeletal remains of Altar de Sacrificios. An osteobiographic analysis. *Pap. Peabody Mus.*, 63(2), 3–123.

- Schaudinn, F. R. y Hoffmann, E. (1905). Vorläufiger Bericht über das Vorkommen von Spirochaeten in syphilitischen Krankheitsprodukten und bei Papillomen. Springer.
- Schell, R. F., LeFrock, J. L., Chan, J. K. y Bagasra, O. (1981). LSH hamster model of syphilitic infection and transfer of resistance with immune T cells. In *Hamster Immune Responses in Infectious and Oncologic Diseases* (Vol. XXXIII, pp. 291–300). Springer.
- Schiller, N. L. y Cox, C. D. (1977). Catabolism of glucose and fatty acids by virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 16(1), 60–68.
- Schurr, T. G., Ballinger, S. W., Gan, Y. Y., Hodge, J. A., Merriwether, D. a, Lawrence, D. N., ... Wallace, D. C. (1990). Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *American Journal of Human Genetics*.
- Sell, S., Gamboa, D., Baker-Zander, S. A., Lukehart, S. A. y Miller, J. N. (1980). Host response to *Treponema pallidum* in intradermally-infected rabbits: Evidence for persistence of infection at local and distant sites. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Serre, D., Hofreiter, M. y Pääbo, S. (2004). Mutations induced by ancient DNA extracts? *Molecular Biology and Evolution*, 21(8), 1463–7.
- Smith, J. L., David, N. J., Indgin, S., Israel, C. W., Levine, B. M., Justice Jr, J., ... Santana, E. (1971). Neuro-ophthalmological study of late yaws and pinta. II. The Caracas project. *British Journal of Venereal Diseases*, 47(4), 226.
- Snow, C. E. (1948). Indian Knoll Skeletons of Site Oh 2, Ohio County, Kentucky, (4), 371–554.
- Snow, C. E. (1962). Indian Burials from St. Petersburg, Florida (Contributi). Gainesville: University of Florida.
- Stamm, L. V., Gherardini, F. C., Parrish, E. A. y Moomaw, C. R. (1991). Heat Shock Response of Spirochetes. *Infection and Immunity*, 59(4), 1572–1575.
- Stamm, L. V. (2010). Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 583–9.
- Steffani-Vallejo, J. L. (2014). Detección molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras arqueológicas precolombinas y coloniales mexicanas y españolas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Steinbock, R. T. (1976). Paleopathological diagnosis and interpretation: bone diseases in ancient human populations. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Pub Limited.
- Stewart, T. D. y Spoehr, A. (1952). Evidence of the Paleopathology of Yaws.
- Steyn, M. y Henneberg, M. (1995). Pre-Columbian Presence of Treponemal Disease: A Possible Case from Iron Age Southern Africa. *Current Anthropology*, 36(5), 869–873.
- Stirland, A. (1991). Pre-Columbian treponematosi in medieval Britain. *International Journal of Osteoarchaeology*, 1(1), 39–47.

- Stirland, A. (1994). Evidence for pre-Columbian treponematosi in Medieval Europe. In Ns (Ed.), *The origin of syphilis in Europe. Before or After 1493?* (Éditions E, pp. 109–115). Paris.
- Stone, A. C. y Stoneking, M. (1993). Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population. *American Journal of Physical Anthropology*, 92(4), 463–471.
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D. G., Mulligan, C. J., ... Malhi, R. S. (2007). Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One*, 2(9), e829.
- Taylor, G. M., Crossey, M., Saldanha, J. y Waldron, T. (1996). DNA from *Mycobacterium tuberculosis* Identified in Mediaeval Human Skeletal Remains Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Archaeological Science*, 23, 789–798.
- Thierry, D., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Crawford, J. T., Bates, J. H., Gicquel, B. y Guesdon, J. L. (1990). IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Research*, 18(1), 188.
- Torres-Sanders, L. (2003). La Muerte en el Occidente del México Prehispánico. In VII Congreso Nacional de Paleopatología (pp. 265–270).
- Torres-Sanders, L. (2001). Condiciones de Salud en Individuos depositados en Tumbas de Tiro del Cañón de Solanos, México. Universidad de Granada, España.
- Torroni, A., Schurr, T. G., Yang, C. C., Szathmary, E. J., Williams, R. C., Schanfield, M. S., ... Weiss, K. M. (1992). Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*, 130(1), 153–62.
- Torroni, A., Schurr, T. G., Cabell, M. F., Brown, M. D., Neel, J. V., Larsen, M., ... Wallace, D. C. (1993a). Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 563–590.
- Torroni, A., Sukernik, R. I., Schurr, T. G., Starikovskaya, Y. B., Cabell, M. F., Crawford, M. H., ... Wallace, D. C. (1993b). mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 591–608.
- Totten, P. A., Manhart, L. E., Centurion-Lara, A., Persing, D. H., Tenover, F. C., Tang, Y. W., ... Belkum, A. van. (2004). PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and *Mycoplasma genitalium*. In *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. ASM Press. pp. 349–360.
- Turner, T. B. y Hollander, D. H. (1957). Biology of Treponematosi. In World Health Organization. Geneva, Switerland. pp. 9–12.
- UNDP y WHO. (2003). Laboratory-based Evaluation of Rapid Syphilis Diagnostics. *The Sexually Transmitted Disease Diagnostics Initiative (SDI)*, (1), 1–40.
- Uruñuela y Ladrón de Gevara, G. (1998). Organización social, medio ambiente y enfermedad: identificación de treponematosi en un individuo de la fase Sayula en Atoyac. En: “El Occidente de México: arqueología, historia y medio ambiente,

- perspectivas regionales”, actas del IV coloquio internacional de Occidentalistas. pp. 364–386.
- Wintzingerode, V. F., Göbel, U. B. y Stackebrandt, E. (2006). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 213–229.
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T. D. y Wilson, A. C. (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9350–4.
- Virchow, R. Von. (1858). Ueber die Natur der constitutionell-syphilitischen Affectionen. *Virchow's Archives of Pathological and Anatomical Physiology*, 15(3), 217–336.
- Vogelstein, B. y Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(2), 615–619.
- von Hunnius, T. E., Yang, D., Eng, B., Waye, J. S. y Saunders, S. R. (2007). Digging deeper into the limits of ancient DNA research on syphilis. *Journal of Archaeological Science*, 34(12), 2091–2100.
- Wakefield, E. G., Dellinger, S. C. y Camp, J. D. (1937). A study of the Osseus remains of the “mound builders” of Eastern Arkansas. *The American Journal of the Medical Sciences*, 193(4), 488–494.
- Walker, E. M., Zampighi, G. A., Blanco, D. R., Miller, J. N. y Lovett, M. A. (1989). Demonstration of rare protein in the outer membrane of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* by freeze-fracture analysis. *Journal of Bacteriology*, 171(9), 5005–5011.
- Wallace, D. C., Garrison, K. y Knowler, W. C. (1985). Dramatic Founder Effects in Amerindian Mitochondrial DNAs. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(2), 149–155.
- Ward, D., Bateson, M., Weller, R. y Ruff-Roberts, A. (1992). Ribosomal RNA Analysis of Microorganisms as They Occur in Nature. In K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology SE - 5* (Vol. 12, pp. 219–286). Springer US.
- Wassermann, A., Neisser, A. y Brück, C. (1906). Eine serodiagnostische reaction bei syphilis. *Dtsch Med Wochenschr*, 32, 745–746.
- Webb, S. (1995). *Paleopathology of Australian aboriginals: health and disease across a hunter-gatherer continent*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Webb, S. (2009). *Palaeopathology of Aboriginal Australians: health and disease across a hunter-gatherer continent*. Cambridge University Press.
- Weisman, A. I. (1966). Syphilis: Was it endemic in pre-Columbian America or was it brought here from Europe? *Bulletin of New York Academy of Medicine*, 42, 284–300.
- Willcox, R. R. (1960). The Evolutionary Cycle of the Treponematoses. *Sexually Transmitted Infections*, 36(2), 78–91.

- Willcox, R. R. (1972). The treponemal evolution. *Transactions of the St. John's Hospital Dermatological Society*, 58(1), 21.
- Willcox, R. R. (1974). Changing patterns of treponemal disease. *Sexually Transmitted Infections*, 50(3), 169–178.
- Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T. P., Shapiro, B., ... Cooper, A. (2003). Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5620), 791–5.
- Willerslev, E., Anders, J., Rønn, R., Tina, B., Barnes, I., Gilichinsky, D. y Cooper, A. (2004a). Long-term persistence of bacterial DNA. *Current Biology*, 14(1), R9 – R10.
- Willerslev, E., Hansen, A. J. y Poinar, H. N. (2004b). Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(3), 141–7.
- Willerslev, E. y Cooper, A. (2005). Ancient DNA. *Proceedings. Biological Sciences. The Royal Society*, 272(1558), 3–16.
- Williams, H. U. (1932). The origin and antiquity of syphilis: the evidence from diseased bones: a review, with some new material from America. American Medical Association.
- Zhang, Z. (1993). The skeletal evidence of human leprosy and syphilis in ancient China. *Acta Anthropologica Sinica*, 13(4), 294–299.
- Zink, A., Haas, C. J., Reischl, U., Szeimies, U. y Nerlich, A. G. (2001). Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient egyptian population. *Journal of Medical Microbiology*, 50(4), 355–366.
- Zoechling, N., Schlupe, E. M., Soyer, H. P., Kerl, H. y Volkenandt, M. (1997). Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. *The British Journal of Dermatology*, 136(5), 683–686.