

ANÁLISIS MOLECULAR DE SÍFILIS ANTIGUA A PARTIR DE RESTOS HUMANOS NEONATALES

**Solórzano, Eduvigis^{1,2}; Díaz, Nancy^{1,2};
Montiel, Rafael³; Malgosa, Assumpció¹**

1 Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal y Ecologia.
Universitat Autònoma de Barcelona. España.

2 Grupo de Investigaciones Biopatológica, Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular,
Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Venezuela.

3 Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad,
CINVESTAV – Campus Guanajuato, México.

Resumen

Se han analizado a nivel molecular cuatro posibles casos de Treponematosis congénita en restos esqueléticos neonatales (de 0 a 6 meses de edad), que proceden de la excavación realizada durante el proceso de restauración de la Ermita de la Soledad (Huelva, España, siglo XVI). El ADN de tres de los cuatro especímenes analizados amplificaron para un segmento específico de *T. pallidum* y mostraron la diana de restricción, produciendo los fragmentos de tamaño previsto. Con ello se confirma que, al menos, dos recién nacidos de la población onubense inhumada sufrieron y probablemente murieron de sífilis congénita.

Palabras clave: ADN antiguo, Treponema Pallidum, Sífilis Congénita.

MOLECULAR ANALYSIS OF ANTIQUE SYPHILIS FROM NEONATAL HUMAN REMAINS

Abstract

Four possible cases of congenital treponematosi s have been submitted to molecular analysis. There remain bones that belonged to individuals between 0 and 6 months of age and were inhumated in the crypt of “La Ermita de la Soledad” (sixteenth century, Huelva, Spain). Three of the analyzed samples showed positive amplification for the *T. Pallidum* segment and were subjected to a restriction analysis producing the expected fragment size. This study confirms that at least two of the buried new born suffered and probably died of congenital syphilis.

Keywords: Ancient DNA, Treponema Pallidum, Congenital Syphilis.

Introducción

Actualmente, algunas patologías de origen infeccioso pueden ser analizadas en restos antiguos óseos o momificados gracias a la aplicación de técnicas de biología molecular. Sin embargo, la literatura es relativamente escasa debido a las limitaciones propias de la técnica de ADN antiguo, tales como: el alto grado de daño molecular, que dificulta la amplificación de fragmentos de tamaño mayor a los 300 pares de bases (pb) y la susceptibilidad de contaminación con ADN exógeno (Kolman, 1999).

El aislamiento de fragmentos de ADN bacterial en restos antiguos, contribuye al esclarecimiento de patologías individuales, a definir la evolución histórica de las enfermedades y a desarrollar modelos de migración de las poblaciones humanas; entre los agentes infecciosos que se han analizado molecularmente, caben destacar: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* y *Treponema pallidum*.

Spigelman y Lemma (1993), Baron et al. (1996), Campillo (1998), Mays (2001), entre otros, han reportado con éxito análisis de ADN de *M. tuberculosis* en restos humanos antiguos. Rafi et al. (1994), amplificaron por medio de nested-PCR dos segmentos del ADN de *Mycobacterium leprae*, aislado en restos óseos que datan del siglo VI y XI-XIII; no obstante, la secuencia nucleotídica no pudo ser determinada. Más tarde, en el 2001, Spigelman y Donoghue publican la amplificación y secuenciación parcial de un fragmento de ADN del *M. leprae*, procedente de un individuo del período bizantino (300-600 AD). En el año 2003, Montiel et al., informan de dos casos de amplificación y secuenciación de ADN de *Mycobacterium leprae* en individuos de una necrópolis islámica del siglo XII AD en Sevilla-España, utilizando también el método de nested-PCR.

En relación al *Treponema pallidum*, Kolman (1999), presenta el caso de un esqueleto de 200 años con lesiones óseas consistentes con un diagnóstico de infección por treponema, en el análisis molecular reportó la amplificación y secuencia de un fragmento de 120 pb del ADN de la bacteria. El *T. pallidum*, es un parásito humano, agente causal de la sífilis, se trata de una espiroqueta helicoidal que posee una membrana plasmática y un flagelo que está situado en el espacio periplásmico. El genoma del *T. pallidum* subespecie *pallidum* (Nichols), fue secuenciado por primera vez en el Instituto de Investigaciones Genómicas de la Universidad de Texas, Houston en el año 1998, consiste en un cromosoma circular de 1.138.006 pb, con un promedio de G+C del 58.2%, y es uno de los genomas procariontas más pequeños (Fraser et al., 1998).

Hasta el presente, no se han reportado casos de análisis molecular de agentes infecciosos en restos arqueológicos infantiles, como son los casos que se muestran en este estudio. Asimismo, debe tenerse en cuenta que el análisis molecular precisa de un primer diagnóstico morfológico y radiológico, para poder enfocar el estudio sobre unos restos concretos o susceptibles de detectar la enfermedad, siendo más difícil el diagnóstico en individuos infantiles, y en general mal conservados.

El objetivo de este trabajo fue el análisis de la eventual presencia del ADN de *Treponema pallidum* en restos antiguos infantiles; de esta manera, esclarecer el diagnóstico presuntivo treponematosis congénita. Se trata de cuatro fragmentos óseos con condiciones patológicas similares en individuos neonatales de entre 0 a 6 meses de edad, que proceden de la excavación arqueológica realizada durante la restauración de la Ermita de la Soledad (Huelva-España), durante el año 1991. Se hallaron restos de un gran número de individuos desconectados y mezclados (Safont et al. 1996); la mayoría habían sido enterrados dentro de una cripta. Datos históricos indican que la cripta fue construida en la segunda mitad del siglo XVI y fue usada hasta finales del siglo XIX (García y Fernández 1999).

Las cuatro muestras patológicas: un fémur izquierdo (ELS 646), dos húmeros izquierdos (ELS 551 y ELS 558) y un hemifrontal derecho (ELS 944), corresponden a un mínimo de dos individuos perinatales (figura 1). Estas muestras fueron estudiadas morfológica y radiográficamente por Malgosa et al., en 1996, observándose principalmente un elevado grado de osteoporosis, separación de la cara externa de la cortical ósea, áreas de osteólisis yuxtametáfisial y destrucción epifisiaria. Mediante un diagnóstico diferencial se estableció como patologías más probables una treponematosis congénita o una osteomielitis hematógena, entre otras de menor peso diagnóstico.



Figura 1 Muestras Patológicas

Materiales y Métodos

La extracción del ADN se realizó siguiendo la metodología utilizada en el Laboratorio de ADN antiguo de la Unidad de Antropología de la Universitat Autònoma de Barcelona, España, con las condiciones de esterilidad y las medidas de precaución adecuadas (Montiel et al. 2001). El proceso consiste en: limpieza del área de la lesión de los especímenes donde se tomará la muestra, extracción de polvo de hueso, usando micromotor con pieza de mano y fresas redondas de tungsteno para uso odontológico (figura 2), lavados con EDTA, digestión con proteinasa K, extracción del ADN con fenol-cloroformo, centrifugación, lavado y concentración en centrifugación 30. Un blanco de extracción (KE) que contiene sólo los reactivos fue incluido en este procedimiento para el control de la contaminación. Finalmente el ADN en suspensión fue almacenado a 4° C por 4 días, con la finalidad de minimizar los efectos de los inhibidores de PCR (Montiel et al., 1997).



Fig. 2 Toma de muestras

El ADN del *T. pallidum* fue amplificado por PCR utilizando primers específicos diseñados para tal fin (tabla 1), en cada proceso de amplificación se utilizó un control negativo (K-) para el control de la contaminación. Los primers amplifican un segmento de 106 pb que contiene una diana de restricción para la enzima NaeI (+303), cuyo corte produce dos fragmentos de 22 y 84 pb respectivamente.

Tabla 1. Primers que amplifican un fragmento de ADN del *T. pallidum*

Ip F284	5'-GTGATCCTCTGTCATCCCCG-3'
Ip R370	5'-TCCACCTCACGAGACAAAGG-3'

Resultados

Los primers amplifican un fragmento de 106 pb del gen arp, entre las posiciones 284 y 370 que se encuentran incluidos entre los 1000 primeros pb del ADN bacteriano donde, según la comparación de secuencia realizada con el programa Blast, no existe homología con otras especies, por lo tanto, el fragmento amplificado es específico del *T. pallidum*, como quedó confirmado en el análisis de especificidad realizado en un laboratorio externo (General Lab-Barcelona, España), utilizando controles positivos de *T. pallidum* subespecie pallidum (Nichols), cultivado en vivo en testículos de conejo.

Tres de las muestras (ELS 551, ELS 558, ELS 944) amplificaron para el fragmento específico de *Treponema pallidum*, las muestras amplificadas fueron sometidas al análisis de restricción utilizando la enzima NaeI (GCC[^]GGC), comprobando la restricción positiva en la posición +303 y generando los dos fragmentos del tamaño esperados (figura 3).

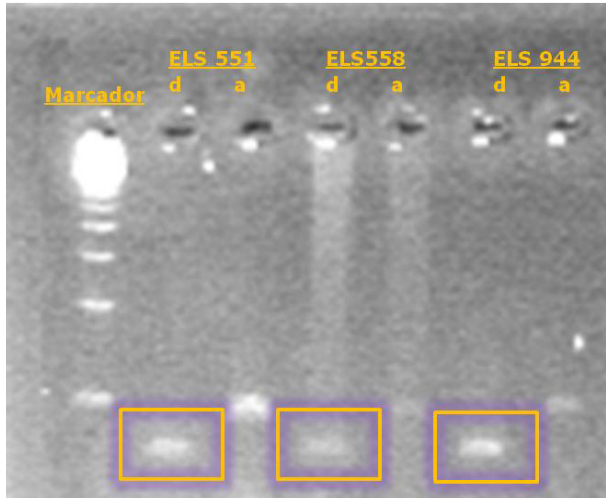


Figura 3 Gel de Agarosa de comprobación de los fragmentos de restricción con la enzima nael. (+303).
d: Producto de PCR digerido a: El mismo producto de PCR que no ha sido sometido a la digestión enzimática.
Marcador: Marcador de peso molecular Recuadro amarillo bandas de 84 pb.

Discusión

Los resultados, obtenidos en el estudio molecular, corroboran la hipótesis preliminar de sífilis congénita, enfermedad que adquiere el feto durante el embarazo o al momento del parto por la transmisión transplacentaria del *T. pallidum*, se manifiesta hasta los dos primeros años de vida. En el caso de que la enfermedad se adquiriera durante el embarazo las lesiones clínicas se forman a partir de la semana 16 de vida intrauterina, los nacimientos se presentan con severas deformidades óseas y una alta mortalidad a muy temprana edad (Ávila-Reyes et al., 2001).

Como se ha indicado en párrafos anteriores, la literatura es escasa en referencia al análisis molecular de agentes infecciosos en restos antiguo. Sólo Kolman (1999), ha reportado amplificación y secuencia del ADN del *T. pallidum* en un individuo adulto, utilizando un fragmento del gen de la lipoproteína de 15-kDa, que contiene el sitio de restricción para la enzima Eco47III, distinto al fragmento analizado en nuestro estudio, por tanto nuestros datos no pueden ser comparados con otros autores.

En el caso del fémur izquierdo (ELS 646), donde no se obtuvo amplificación del fragmento, se planteó una nueva extracción, confirmándose el resultado negativo de los primeros análisis. A pesar de ello, no se descarta definitivamente la presencia del *T. pallidum* en la muestra debido a las dificultades de conservación del ADN en restos antiguos.

Dado que la extracción y análisis por PCR se realizaron en la UAB, donde nunca antes se había trabajado con *T. pallidum* y que los blancos de extracción y amplificación no mostraron la presencia de ADN, la posibilidad de contaminación es nula, por lo que no hay duda en afirmar la presencia del agente infeccioso en los especímenes citados.

Conclusión

Se logró amplificar mediante PCR un fragmento de 106 pb del ADN del *T. pallidum* en tres restos óseos neonatales (hemifrontal derecho y dos húmeros izquierdos) de la Ermita de La Soledad en Huelva, de los cuatro especímenes que habían sido estudiados morfológicamente y diagnosticados como posibles casos de treponematosi. Por lo tanto, se confirma el diagnóstico presuntivo de sífilis congénita, en al menos dos neonatos de la población onubense inhumada.

Agradecimientos

-Museo y Diputación Provincial de Huelva, España, por el acceso al material Antropológico.

-Dra. Mary Paz Cañada. Departament de Biologia Molecular, General Lab. Barcelona, España.

-Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico, Universidad de Los Andes, Venezuela. Código SE: O-05-08-07.

(Artículo recibido en abril 2010, aprobado para la publicación en junio 2010).

Referencias Bibliográficas

AVILA-REYES, Ricardo. et al. 2001. "Sífilis congénita. Comunicación de un caso". En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. N° 21. pp. 115-122.

BARON, H. et al. 1996. "Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones". En *Journal of Archeological Science*. N° 23. pp. 667-671.

CAMPILLO, Domènec. et al. 1998. "El ADN confirma la presencia y expansión de la tuberculosis en el Medioevo". En *Empúrie*. N° 51. pp. 257-265.

GARCÍA, Carmen y Fernández, Jesús. 1999. "La ermita de La Soledad a través de la arqueología". *Arqueología*. Diputación provincial de Huelva. España.

FRASER, Claire. et al. 1998. "Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete". En *Science*. N° 281. pp. 375-388.

KOLMAN, Connie. et al. 1999. "Identification of *Treponema pallidum* Subspecies *pallidum* in a 200-Year-Old Skeletal Specimen". En *Journal of Infectious Diseases*. N° 180. pp. 2060-3.

MALGOSA, Assumpció. et al. 1996. "Pathological evidence in Newborn children from the sixteenth century in Huelva (Spain)". En *International Journal of Osteoarchaeology*. N° 6. pp. 388-396.

MAYS, Simon. et al. 2001. "Paleopathological and biomolecular study of tuberculosis in a medieval skeletal collection from England". En American Journal of Physical Anthropology. N° 114. pp. 298-311.

MONTIEL, Rafael. et al. 1997. "Overcoming PCR inhibitors in Ancient DNA extracts from Teeth". En Ancient Biomolecules. N° 1. pp. 221-225.

MONTIEL, Rafael. et al. 2001. "Authenticating ancient human mitochondrial DNA". En Human Biology. N° 73. pp. 689-713.

MONTIEL, Rafael. et al. 2003. "DNA sequences of Mycobacterium leprae recovered from ancient bones". En Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters N° 226. pp. 413-414.

RAFI, A. et al. 1994. "DNA of Mycobacterium leprae detected by PCR in ancient bone". En The Lancet. N° 343. pp.1360-1361.

SPIGELMAN Mark y Lemma, Eshetu. 1993. "The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons". En: International Journal of Osteoarchaeology. N° 3. pp.137-143.

SPIGELMAN Mark. y Donoghue, Helen. 2001. "Brief Communication: Unusual pathological condition in the lower extremities of a skeleton from ancient Israel". En American Journal of Physical Anthropology. N° 114 pp. 92-93.