

# Un enfoque molecular a la paleopatología: estudios genómicos de patógenos humanos antiguos

COPPOLA-BOVE L.<sup>1,2</sup>, BOTELLA-LÓPEZ M.C.<sup>1</sup>, LÓPEZ-GIJÓN R.<sup>1</sup>, MARTÍN-ALONSO J.F.<sup>1</sup>  
Y BOS K.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Antropología. Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física. Universidad de Granada, España.

<sup>2</sup>Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology. Department of Archaeogenetics. Leipzig, Germany.

Corresponding Author: [lcoppolab@correo.ugr.es](mailto:lcoppolab@correo.ugr.es)

## RESUMEN

La paleopatología es la rama de la antropología física que, a través del estudio de restos humanos esqueléticos (o momificados), procura estudiar el origen de las enfermedades y el estado de salud en las poblaciones del pasado. Según el estado de conservación de los restos y las características de las muestras, se pueden emplear herramientas distintas para realizar la diagnosis diferencial. Desde sus orígenes, ligados a la figura de Sir Marc Armand Ruffer (1896-1917), los estudios paleopatológicos se han basado en la observación de manifestaciones clínicas de las enfermedades en los restos. A lo largo del siglo XX, se desarrollaron técnicas y herramientas complementarias, como la aplicación de estudios por imágenes de la muestra, empleando técnicas radiográficas, y más recientemente a través de los análisis moleculares. Durante la última década, la aplicación de técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS) en las investigaciones sobre el ADN antiguo ha permitido realizar estudios paleogenómicos de patógenos antiguos. Estos datos abren las puertas a investigaciones más detalladas de la historia evolutiva de los patógenos. En el presente trabajo se plantea resumir la historia y las aportaciones del estudio del ADN de patógenos antiguos en el campo de la paleopatología, a partir de sus primeros pasos hasta los últimos avances, incluyendo investigaciones genómicas y metagenómicas. Con la obtención de datos moleculares, es posible identificar la presencia de enfermedades infecciosas incluso en los casos que no presentan signos de reacción en los huesos o de infecciones inespecíficas que complican el cuadro del diagnóstico diferencial.

### Palabras claves:

ADN antiguo  
Paleopatología  
NGS  
Patógenos humanos

Recibido: 19-10-2021

Aceptado: 15-12-2021

## ABSTRACT

Paleopathology is a branch of physical anthropology whose main aim is the study of health and disease in past populations. Analyses can be based both on human skeletal and mummified remains. Differential diagnosis to estimate the presence of a pathological condition is often influenced by factors such as the preservation of the remains and the sample origin. During the years, many tools have been developed to better harness information available through the study of bones. Since its early stages with Sir Marc Armand Ruffer (1896-1917), paleopathological investigations have focused on the observation of clinical manifestation of disease that are visible on bones. During the 20th century, anthropologists have made use of a great variety of complementary tools, such as radiography, digital imaging, histology, and most recently molecular analysis. During the last decade, the application of Next Generation Sequencing techniques to ancient DNA (aDNA) has permitted the reconstruction of ancient pathogens at the genomic level. Through these data, the deep evolution of pathogens can be studied at unprecedented detail. In this paper, we present a summary of the contributions given by aDNA studies in the field of paleopathology. We will explore the early literature that created the foundation for the field and will explore in detail recent work that incorporates metagenomic and genomic analysis. Thanks to molecular data, it is possible to estimate the presence of a pathogen even in unexpected cases, such as when bone reaction is not evident or when ambiguous gross pathology complicates a differential diagnosis.

### Keywords:

Ancient DNA  
Paleopathology  
NGS  
Human pathogens

## **Introducción**

Como subdisciplina de la antropología física, la finalidad principal de la paleopatología es investigar las condiciones de salud en las poblaciones del pasado a través del estudio de las enfermedades cuyos análisis aportan informaciones sobre su origen, su evolución y su impacto en la historia de la humanidad. Las fuentes escritas y las representaciones pictóricas son por lo general los medios más usados, pero en realidad los restos biológicos y otros sustratos, como los cálculos dentales o la biota que acompaña a los humanos, resultan serla más valiosa fuente de información cuando se les puede estudiar. Solo ellos ofrecen datos de primera mano sobre los acontecimientos pasados, y aunque muchas veces no proporcionen todo lo que sería deseable, lo que revelan es incuestionable.

Esta disciplina adquirió visibilidad gracias al bacteriólogo Sir Marc Armand Ruffer (1896-1917), cuya metodología novedosa y sistemática aplicada al material arqueológico aceleró el desarrollo de un nuevo capítulo en la historia de los estudios de nuestro pasado. Su profundo interés por la paleopatología y las manifestaciones clínicas de las enfermedades en los tejidos momificados le llevaron a estudiar una inmensa variedad de aspectos que caracterizan las condiciones patológicas, desde las enfermedades infecciosas hasta lesiones traumáticas (Ruffer y Rietti, 1912).

Figuras iniciales en este campo, tales como Aleš Hrdlička y Earnest Hooton siguieron su ejemplo, aplicando protocolos rigurosos desde el punto de vista científico, para realizar el diagnóstico diferencial en base a sus evaluaciones macroscópicas de los cambios visibles en el material esquelético (como se revisa en Aufderheide, Rodríguez-Martín y Langsjoen, 1998).

La aplicación de dichos enfoques al estudio de restos humanos antiguos llevó a la integración de métodos diagnósticos complementarios a los conocidos hasta entonces, para poder investigar con más detalle las condiciones patológicas en tejidos momificados y en los huesos. Los estudios radiológicos permitieron visualizar los estratos más internos de los individuos momificados y del material óseo patológico; los patrones de las fracturas y los daños internos al hueso podían observarse y estudiarse bajo una nueva luz. Además, los avances sucesivos de las tecnologías empleadas en el diagnóstico por imágenes alcanzaron

niveles impresionantes de detalle anatómico, usando métodos no invasivos, como en el caso de la tomografía computarizada (Bewers et al., 2016; Romell et al., 2018).

Mientras estas herramientas ofrecían una mayor resolución para el diagnóstico diferencial basado en observaciones morfológicas, proporcionaban un conocimiento limitado para una gran serie de patologías infecciosas que presentan cambios morfológicos ambiguos. Los datos morfológicos son fundamentales para comprender y describir mejor los rasgos patofisiológicos que se observan en los huesos, pero a menudo los diagnósticos diferenciales permanecían elusivos.

Dado que los estudios paleopatológicos incluyen una amplia casuística de condiciones, en tiempos recientes ha sido necesario adoptar un enfoque multidisciplinar para alcanzar una mejor comprensión e identificación de las enfermedades en las muestras antiguas. Las preparaciones histológicas pueden representar una buena alternativa a una observación morfológica superficial: las resinas pueden fijar la apariencia del hueso y permitirnos visualizar cambios microscópicos en las estructuras que pueden ocurrir en las condiciones patológicas. Cabe destacar que el hueso seco no se porta como el hueso fresco, ni siquiera desde un punto de vista histológico. De hecho, algunas estructuras se pierden, ya que el componente orgánico no es presente en los huesos secos incluidos en las resinas (De Boer y Van der Merwe, 2016). No obstante, este enfoque ha sido ampliamente empleado en el estudio de deficiencias metabólicas (Brickley, Mays e Ives, 2007), lesiones traumáticas, y también en los casos de aquellas enfermedades cuyos signos patognomónicos son tradicionalmente bien conocidos, como en el caso del síndrome de Paget (Seitz et al., 2009). Sin embargo, el empleo de preparaciones histológicas se sigue debatiendo, a pesar de la importancia que tuvo para realizar el diagnóstico de algunas enfermedades y para conocer los cambios patognomónicos que afectan a los huesos a nivel microscópico.

### **De lo invisible a lo “visible”: aplicación del análisis del ADN antiguo de patógenos**

Las informaciones y los conocimientos obtenidos de los estudios realizados a nivel macro y

microscópico pueden ser complementados gracias a la aplicación de los análisis moleculares. Esta técnica ofrece el poder analítico para investigar aquellas condiciones que se manifiestan con lesiones esqueléticas ambiguas, y también las que no dejan signos morfológicos en el esqueleto. Desde su primera aplicación en los años noventa del siglo XX, el desarrollo de análisis moleculares para identificar la presencia de patógenos específicos ha incrementado de modo drástico el conocimiento básico de las enfermedades antiguas y ha generado una gran variedad de preguntas y áreas de investigación (como se revisa en Bos et al., 2019; Duchêne et al., 2020). Condiciones como la osteítis o la osteomielitis, por ejemplo, se observan muy a menudo en las colecciones osteológicas, pero por mucho tiempo no se consideró asequible la identificación del agente causal de la infección (Ortner, 2003), pero ahora los análisis moleculares representan un importante vehículo para relacionar los cambios patológicos observados con el posible agente causal de la infección.

Las moléculas orgánicas proporcionan informaciones muy relevantes sobre los procesos biológicos y las enfermedades que caracterizaron las poblaciones del pasado. Por ejemplo, las investigaciones realizadas en el ámbito de la paleoproteómica han permitido identificar proteínas asociadas a la respuesta inmunitaria, sugiriendo el posible desarrollo de una infección en el momento de la muerte del individuo (Corthals et al., 2012). Además, algunas investigaciones han conseguido identificar la presencia de proteínas y factores asociados a la presencia de varios patógenos, como el agente Ag 85, asociado al *Mycobacterium tuberculosis* (Schmidt-Schultz y Schultz, 2015).

En el caso de infecciones que se hayan extendido por vía hemática, es posible que trazas moleculares del patógeno se hayan conservado, permitiéndonos caracterizar la enfermedad incluso en ausencia de cambios esqueléticos. Las lesiones del tejido óseo se hacen visibles sólo tras una larga exposición al ataque infeccioso, en los procesos crónicos, y están relacionadas con otros factores también, como la edad, el estado de salud subyacente y eventuales predisposiciones genéticas (Ortner, 2003). A lo largo de nuestra historia evolutiva, se pueden recopilar muchos ejemplos de infecciones agudas que

causaron una mortalidad muy rápida, cuya casuística se extiende desde un solo individuo hasta eventos de afectación masiva.

En el caso de algunas enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, las lesiones óseas han sido estudiadas con detalle, con la consecuente descripción y el reconocimiento de un preciso patrón patognomónico en los huesos (por ejemplo, la presencia del mal de Pott en los estadios tardíos de la enfermedad; Roberts y Buikstra, 2003). Sin embargo, en estadios precoces de la enfermedad puede ser difícil o imposible establecer un diagnóstico diferencial preciso y no es infrecuente que se confunda con diferentes procesos patológicos como el de la brucelosis (Mutolo et al., 2012). La brucelosis y la tuberculosis, se caracterizan por una serie de signos y síntomas que se pueden confundir por su similitud. La infección en los humanos conlleva fiebre, sudoración, dolor musculoesquelético y osteólisis en las vértebras y su consiguiente colapso, con una serie variable de alteraciones esqueléticas complejas (Ortner, 2003). Sin embargo, estas enfermedades son causadas por bacterias distintas: *Brucella melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* en el caso de brucelosis y *Mycobacterium tuberculosis* en el caso de tuberculosis. Ambos patógenos se han podido identificar a nivel genómico en restos humanos (Bos et al., 2014; Guellil et al., 2018), lo que nos permitiría distinguir estas dos condiciones a nivel molecular.

La elevada fiabilidad de estos estudios relacionados con los patógenos, llevados a cabo gracias a las técnicas de análisis del ADN antiguo, ha permitido elaborar una revisión de las hipótesis sobre el origen, la evolución y la transmisión de varias enfermedades a lo largo de la historia humana (Spyrou et al., 2019). Además, el estudio de la arquitectura genética de los patógenos es fundamental para investigar el origen de los mecanismos que causan su virulencia y les han favorecido en la interacción con los huéspedes humanos (Bos et al., 2011).

De hecho, las enfermedades infecciosas del pasado más estudiadas son las que llaman la atención por sus números, es decir, por su tasa de mortalidad, su rápida difusión y por presentar casos de reemergencia. A lo largo de la historia de la humanidad, hubo varios brotes caracterizados por estos rasgos y que tuvieron importantes consecuencias en el plano demográfico,

social y económico de las sociedades antiguas. Se pueden citar distintos casos al respecto, como la peste de Justiniano (ca. 541-750 d. C.), cuyo agente causal fue identificado gracias a los estudios de ADN antiguo y se pudo observar que se caracterizaba por una marcada variabilidad entre las cepas de *Yersinia pestis* que se difundieron en Europa durante esta primera epidemia de peste (Keller et al., 2019).

Además de permitirnos conocer los agentes causales de las epidemias del pasado, de conocer su forma de adaptarse a los humanos y volver a aparecer en la historia en oleadas distintas, las técnicas de investigación molecular se han aplicado también cuando sólo se dispone de una descripción histórica o una representación pictórica de alguna enfermedad que acabó con centenares de vidas en poco tiempo. En este sentido, tenemos el ejemplo del estudio de la epidemia de *cocoliztli* (1545-1550) a partir de los restos esqueléticos de los individuos fallecidos durante este brote en América (Vâgene et al., 2018). Los análisis se llevaron a cabo a partir de unas muestras esqueléticas del cementerio de Teposcolula-Yucundaa en Oaxaca (México), cuyas evidencias arqueológicas e históricas relacionaban el sitio con la epidemia que estalló entre los años 1545-1550 y que fue causada con elevada probabilidad por patógenos introducidos en Mesoamérica tras la llegada de los europeos. Entre ellos, figura *Salmonella enterica Paratyphi C*, detectada en los restos objeto de esta investigación (Vâgene et al., 2018).

### **Métodos para obtener ADN antiguo y técnicas de validación**

Tras la publicación de los primeros estudios (Higuchi et al., 1984; Zink et al., 2001) llevados a cabo sobre la extracción y la secuenciación del ADN antiguo, los investigadores han utilizado esta técnica para aumentar sus conocimientos de las poblaciones antiguas y de la evolución humana. De hecho, desde entonces el ADN antiguo ha sido obtenido a partir de una variedad de sustratos: el tártaro dentario, por su estado de preservación (Fotakis et al., 2020), tejidos momificados (tanto humanos como de otros animales; Khairat et al., 2013; Schuenemann et al., 2017), pelo (Rasmussen et al., 2010), huesos, dientes y sedimentos (Bos et al., 2011; Slon et al., 2017).

La contaminación por material moderno y por el ambiente, junto a una baja conservación, representa el desafío más relevante para el estudio del ADN antiguo. Normalmente, el ADN endógeno (tanto humano como patógeno) está presente en un estado de fragmentación y degradación variable y típicamente representa menos del 1% de todo el material molecular obtenido de restos arqueológicos. Es muy frecuente encontrar una serie de datos metagenómicos que representen el contexto ambiental y de deposición de los restos. Por eso se han introducido distintos métodos para reducir la prevalencia de ADN contaminante durante el proceso de análisis (Korlevič et al., 2018).

Aunque se hayan realizado muchos avances para controlar los procesos de contaminación, no existe un protocolo estándar para todos los laboratorios y las muestras empleadas para la extracción de ADN antiguo. Sin embargo, es importante mantener un control muy estricto en cada fase de manipulación de la muestra: se recomienda el empleo de guantes y herramientas de un solo uso y llevar a cabo todas las fases de catalogación, preparación de la muestra y extracción del ADN en ambientes distintos y estériles. La aplicación de métodos específicos de descontaminación de la muestra está relacionada con el tipo de sustrato y con los estudios que se quieren realizar. Por ejemplo, se suele tratar el polvo obtenido de un hueso con un *buffer* de fosfato o hipoclorito de sodio, aumentando significativamente la depleción de ADN contaminante, pero causando también la pérdida de parte del ADN endógeno (Korlevič et al., 2018).

Tradicionalmente, la *pars petrosa* del temporal ha sido utilizada por la abundante cantidad de ADN endógeno humano obtenida, en particular de la cápsula ótica (Pinhasi et al., 2015); sin embargo, no se suele considerar una fuente adecuada para obtener datos genéticos de patógenos (Margaryan et al., 2018). Debido a ello, los sitios ideales que se recomiendan para tomar muestras en búsqueda de ADN patógeno son la cámara pulpar de los dientes y/o las lesiones esqueléticas activas en el momento de la muerte (Bos et al., 2011; Bos et al., 2014). Los nódulos calcificados también han demostrado ofrecer una mejor conservación del ADN antiguo, además de ser una fuente de datos genéticos de patógenos (Devault et al., 2017; Sabin et al., 2020).

El proceso de preparación de las muestras se suele llevar a cabo en un ambiente estéril, descontaminado e irradiado con luz UV con regularidad. El proceso de muestreo sigue unos protocolos específicos que pueden variar según el laboratorio, pero su principal finalidad es evitar por completo la contaminación y obtener la mayor cantidad de ADN endógeno posible conservado en el tejido muestreado. Tras la fase de muestreo, es necesario procesar el material obtenido para la siguiente fase de extracción, que ha ido aumentando su eficacia en la última década gracias a la introducción de protocolos basados en la sílice (Dabney et al., 2013; Rohland et al., 2018), que puede estar tanto en suspensión como en la superficie de pequeñas bolas magnéticas. Además, es importante preparar un *buffer* adecuado para ligar el ADN, tras haber eliminado las estructuras que lo contienen, optimizando la captura de los fragmentos más cortos, que se perderían durante la fase de amplificación. En los últimos años, las investigaciones se han centrado en la preparación de dichas soluciones, para alcanzar una proporción entre los distintos compuestos ajustada al tratamiento de sustratos diferentes (Rohland et al., 2018).

Si bien los extractos pueden seguir directamente con la amplificación basada en la PCR, se está consolidando como procedimiento estándar la generación de librerías, seguida de la amplificación del ADN a través de la tecnología *Next Generation Sequencing* (NGS). De hecho, esta tecnología ofrece distintas ventajas: 1) produce una gran cantidad de datos necesarios para los análisis genómicos de forma muy beneficiosa en términos de coste/eficiencia; 2) está diseñada para moléculas cortas, una condición común en el ADN antiguo; 3) los datos de secuenciación se obtienen a lo largo de toda la extensión de la molécula, permitiendo llevar a cabo la autenticación. De hecho, el ADN antiguo presenta una serie de características que se pueden utilizar como indicadores de autenticidad. Como estas moléculas se presentan degradadas por lo general, la prevalencia de fragmentos cortos se suele considerar un indicador de conservación molecular. Algunos marcadores bioquímicos, como la característica deaminación de la citosina, que causa la transición de C a T en las extremidades de las moléculas de ácido nucleico (Orlando et al., 2021), representa hasta ahora el método más fiable de

autenticación y sólo se realiza gracias a los datos obtenidos del NGS (empleando plataformas como Illumina HiSeq 4000 e Illumina GAII platform; Bos et al., 2001; Giffin et al., 2020).

### Aplicaciones de la paleopatología molecular

La exitosa aplicación de los métodos descritos hasta ahora a la paleopatología se debe principalmente a la conservación de los residuos moleculares de patógenos antiguos en restos humanos. Este fenómeno se ha documentado para una gran variedad de bacterias, aunque recientemente también se haya demostrado la posibilidad de extraer material de virus y parásitos (como se revisa en Duchêne et al., 2020). La reconstrucción de los genomas antiguos ofrece los medios analíticos para poder realizar análisis detallados de los cambios genéticos a lo largo del tiempo. Gracias a ello, estas investigaciones se pueden emplear para muchas finalidades.

La comparación de los genomas de patógenos antiguos, realizada en bases de datos comprensivos tanto de la diversidad de distintas variantes como de las formas más modernas, ofrece la posibilidad de realizar estimaciones más precisas con respecto a la tasa de mutación. Este dato resulta muy importante, pues facilita información sobre la emergencia cronológica de las enfermedades. Asumiendo que el reloj molecular de estas especies siga un patrón regular, los genomas antiguos pueden servirnos como puntos de calibración para establecer la tasa de cambios moleculares en una gran escala temporal. Por ejemplo, gracias al estudio del genoma excepcionalmente conservado de *Mycobacterium tuberculosis*, procedente de un nódulo pulmonar del siglo XVII, Sabin y colegas estimaron que la emergencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* se sitúa en época neolítica (Sabin et al., 2020). Este período abarca la época caracterizada por los cambios culturales más drásticos en la historia humana, en cuanto a la organización social, la alimentación y la salud. La adopción de un estilo de vida sedentario y la práctica de la ganadería llevaron a un contacto con los animales domesticados más cercano y frecuente, junto al aumento de la concentración de la densidad de la población. Estos factores habrían facilitado la emergencia de zoonosis (Armstrong, Goodman y Jacobs, 1991).

Los análisis genéticos realizados en unos restos humanos de época neolítica han permitido identificar con éxito varios patógenos, cuya emergencia se puede relacionar directamente con las actividades antropogénicas típicas de este período. Por ejemplo, los dientes de un individuo de 6500 años ofrecieron evidencia de la presencia y difusión de *Salmonella enterica* en el Oeste eurasiático (Key et al., 2020). Además, las comparaciones con cepas modernas revelaron un patrón de pérdida de genes a lo largo del tiempo por un proceso de pseudogenización, supuestamente relacionado con el proceso de adaptación al huésped. En este sentido, este dato se puede interpretar como una falta de especificidad de la bacteria, es decir, que las formas antiguas de *Salmonella enterica* no estaban adaptadas de modo específico a los humanos, sino que podían infectar a una variedad de mamíferos más amplia (Key et al., 2020).

El patógeno humano más estudiado hasta la fecha es seguramente *Yersinia pestis*, el agente causal de la peste. El análisis de un número creciente de genomas de *Y. pestis* procedentes de individuos del Neolítico tardío y de la Edad del Bronce permitió aclarar las diferencias entre las formas antiguas y las modernas de la bacteria y obtener una estimación de la fecha extrapolada de la emergencia de la bacteria (5000-7500 años calBP; Andrades Valtueña et al., 2017; Rascovan et al., 2019; Susat et al., 2021). De la comparación de la estructura genética de formas antiguas y modernas emergieron unas diferencias importantes: las bacterias del Neolítico tardío carecen de un factor de virulencia fundamental, la toxina murina de *Yersinia*, también llamada *ymt*, esencial para que la bacteria pueda colonizar el ambiente hostil representado por el sistema digestivo de las pulgas (Rasmussen et al., 2015). Además, las formas antiguas no presentaban una mutación específica en la Ureasa D (*ure D*), causando una reacción tóxica en las pulgas y disminuyendo su eficiencia de transmisión (Andrades Valtueña et al., 2017). Se considera que, en el conjunto, estas características hacían que la bacteria tuviese una menor transmisibilidad por pulgas a los humanos respecto a las variedades responsables de los históricamente famosos brotes de peste.

La evolución de las islas patogénicas y los factores de virulencia representan el foco de las

investigaciones actuales, ya que proporcionan detalles esenciales sobre la adaptación específica de un patógeno a su huésped y sobre el impacto que supuestamente tuvo en la virulencia y la mortalidad. La combinación de estos datos y de la elaboración de modelos matemáticos probabilísticos, que permitan visualizar las relaciones filogenéticas, puede revelar la correlación entre la adaptación y un cuadro más amplio de los patrones de evolución (Key et al., 2020).

La presencia de ADN de patógenos específicos en los restos esqueléticos antiguos puede aportar también informaciones de tipo geográfico y cronológico, con lo cual se obtienen detalles esenciales sobre su origen o distribución geográfica en el pasado. Estos conceptos se ven bien reflejados en el caso de las treponemosis (pinta, yaws, bejel y sífilis venérea). El brote que supuestamente representa la primera evidencia histórica de su emergencia se remonta al siglo XV, entre las filas de mercenarios del rey Carlos VIII de Francia, durante el asedio de Nápoles por las tropas españolas del Gran Capitán. Sin embargo, estas referencias no ofrecen ninguna aclaración sobre el origen de la enfermedad. Se han propuesto tres principales hipótesis sobre el origen de las treponemosis y de la sífilis venérea, en particular. La hipótesis de Colón propone que la enfermedad se desarrolló en las Américas y que fue el famoso navegante y sus hombres quienes trajeron la sífilis a Europa, tras realizar la vuelta a través del Atlántico. Por otro lado, según la hipótesis pre-colombina, la sífilis ya era endémica en Europa antes del viaje de Colón, aunque la identificación de la enfermedad se vio perjudicada por la confusión con otras condiciones desfiguradoras. Por último, la teoría alternativa supone que las espiroquetas que causan treponemosis en los humanos procedan del continente africano, y que fueron introducidos en Europa por los intensos intercambios comerciales con África. En este escenario, el viaje a América de Colón causó la difusión de la enfermedad en el Nuevo Mundo (Livingstone, 1991). El estudio del ADN de yaws (*Treponema pallidum pertenue*) obtenido de un individuo de un yacimiento lituano de época post medieval añadió una pieza más al árbol filogenético, demostrando un origen reciente del yaws, sin apoyar la hipótesis de un origen común de *Treponema spp.* (Giffin et al., 2020).

## Limitaciones presentes y perspectivas futuras

El empleo de las últimas tecnologías NGS ha contribuido a superar la mayoría de las limitaciones que se encuentran trabajando con ADN antiguo. Sin embargo, sigue habiendo unas limitaciones comunes al estudio del material antiguo, debidas sobre todo a su estado de conservación. De hecho, la contaminación y la conservación del material pueden variar en función de muchas condiciones, como la temperatura (es más probable que se encuentre material bien conservado en el *permafrost* que en los ambientes más cálidos; van der Valk et al., 2021) o el tipo de protocolo empleado para manejar y conservar el material tras su recuperación (Orlando et al., 2021). Además, el ADN endógeno se caracteriza por su baja presencia y alta fragmentación; por esto, el ADN moderno y ambiental representan una amenaza para la obtención de ácido nucleico endógeno, que suele ser en cantidad ínfima respecto a las moléculas modernas. Esa es la causa por la que aumenta el interés hacia los protocolos post-excavación para reducir la contaminación (Orlando et al., 2021). En el caso de los patógenos antiguos se añaden otros factores epidemiológicos que influyen en su distribución en los restos antiguos. Algunos se caracterizan por ciclos vitales complicados y necesitan de varios vectores para llegar al huésped definitivo, así que puede que se queden insuficientemente representados en los restos humanos; otros pueden presentar una baja complejidad genética (genoma rico en AT), complicando su identificación molecular en las bases de datos metagenómicos. Para limitar parcialmente este fenómeno, se pueden desarrollar nuevos ensayos de hibridación con una elevada especificidad. Asimismo, se pueden personalizar las bases de datos para los análisis metagenómicos, incluyendo una mayor diversidad genética y generando una elevada fiabilidad para la asignación taxonómica (para ello, se siguen procesos de trabajo como *HOPS*; Hübner et al., 2019).

Los análisis publicados hasta la fecha están dominados por estudios realizados en tejidos calcificados como los huesos y los dientes. A lo largo del proceso infeccioso, los patógenos pueden establecerse también en tejidos no calcificados del cuerpo humano. Además, la distribución de un patógeno en el organismo depende del tipo de

microorganismo, del estadio de la infección y de la susceptibilidad del huésped al ataque. En este sentido, los análisis de otros substratos, además de los tejidos humanos calcificados, podrían revelarse prometedores, sobre todo si se consideran los desarrollos técnicos que permiten obtener ADN de tejidos antiguos (Wales et al., 2018). La arqueofauna debería ser también material de investigación para la búsqueda de ADN de patógenos, ya que potencialmente podría añadir más detalles sobre la especificidad de la cepa patógena para su huésped en las zoonosis antiguas (Key et al., 2020).

El yugo de las enfermedades infecciosas ha ejercido una profunda presión selectiva en los humanos a lo largo de nuestra historia. Otro camino que se pretende emprender es el estudio combinado de los patógenos antiguos y de la evolución de los genes inmunitarios en los humanos, siendo que estos dos componentes están indisolublemente relacionados y que se afectan mutuamente. Para entender con más detalle los resultados de esta interacción en las poblaciones modernas, se puede mirar a las variantes que contribuyen a la virulencia en el contexto de los cambios registrados en las defensas inmunitarias de las poblaciones del pasado (Immel, 2021).

## Agradecimientos

Este trabajo se ha llevado a cabo dentro del proyecto CoDisEASe, financiando por *Horizon 2020 European Research Council Starting Grant 805268* (financiación asignada a Kirsten I. Bos).

Los autores quieren manifestar su agradecimiento a la Dra. Aida Andrades Valtueña por sus comentarios durante la redacción del manuscrito y por las opiniones y las aportaciones de los revisores, que han contribuido indudablemente a mejorar la calidad de nuestro trabajo.

## Bibliografía

- Andrades Valtueña A., Mittnik, A. Key, F.M., Haak W., Allmäe R., Belinskij A., et al. (2017). The Stone Age plague and its persistence in Eurasia. *Curr Biol* 27(23): 3683-3691. <https://doi.org/10.1101/094243>
- Armstrong G.J., Goodman A.H., Jacobs K.H. (1991). The origins of agriculture: population growth during a period of declining health. *Popul Environ* 13(1): 9-22. <https://doi.org/10.1007/BF01256568>
- Aufderheide A.C., Rodríguez-Martín C., Langsjoen O. (1998). *The Cambridge Encyclopedia of Human*

- Paleopathology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bewes J.M., Morphett A., Pate F.D., Henneberg M., Low A.J., Kruse L., Craig B., Hindson A., Adams E. (2016). Imaging ancient and mummified specimens: dual-energy CT with effective atomic number imaging of two ancient Egyptian cat mummies. *J Archaeol Sci Rep* 8: 173-177. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1614-6\\_17-1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1614-6_17-1)
- Bos K.I., Harkins K.M., Herbig A., Coscolla M., Weber N., Comas I., et al. (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 514: 494-497. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/paper\\_00280836\\_v514\\_n7253\\_p494\\_Bos](http://hdl.handle.net/20.500.12110/paper_00280836_v514_n7253_p494_Bos)
- Bos K.I., Kühnert, D., Herbig A., Esquivel-Gomez L.R., Andrades Valtueña, A., Barquera R., et al. (2019). Paleomicrobiology: Diagnosis and Evolution of Ancient Pathogens. *Annu Rev Microbiol* 73: 639-666. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062436>
- Bos, K. I., Schuenemann, V. J., Golding, G. B., Burbano, H. A., Waglechner, N., Boombes B.K., et al. (2011). A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature* 478: 506-510. <https://doi.org/10.1038/nature10549>
- Brickley M., Mays S., Ives R. (2007). An investigation of skeletal indicators of vitamin D deficiency in adults: Effective markers for interpreting past living conditions and pollution levels in 18th and 19th century Birmingham, England. *Am J Phys Anthropol* 132: 67-79. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20491>
- Corthals A., Koller A., Martín D.W., Rieger R., Chen E.I., Bernaski M., Recagno G., Dávalos L.M. (2012). Detecting the immune system response of a 500-year-old Inca mummy. *PLoS ONE* 7: e41244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041244>
- Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.-T., Weihmann A., Nickel B., et al. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *PNAS* 110: 15758-15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
- De Boer H., Van der Merwe A.E. (2016). Diagnostic dry bone histology in human paleopathology. *Clin Anat* 29: 831-843. <https://doi.org/10.1002/ca.22753>
- Devault A.M., Mortimer T.D., Kitchen A., Kiesewetter H., Enk J.M., Golding G.B., et al. (2017). A molecular portrait of maternal sepsis from Byzantine Troy. *eLife* 6: e20983. <https://doi.org/10.7554/eLife.20983>
- Duchêne S., Ho S.Y.W., Carmichael A.G., Holmes E.C., Poinar H. (2020). The Recovery, Interpretation and Use of Ancient Pathogen Genomes. *Curr Biol* 30(19): R1215-R1231. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.081>
- Fotakis A.K., Denham S.D., Mackie M., Orbegozo M.I., Mylopotamitaki D., Gopalakrishnan S., et al. (2020). Multi-omic detection of *Mycobacterium leprae* in archaeological human dental calculus. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 375(1812): 20190584. <http://doi.org/10.1098/rstb.2019.0584>
- Giffin K., Lankapalli A.K., Sabin S., Spyrou M.A., Posth C., Kozakaité J., et al. (2020). A treponemal genome from an historic plague victim supports a recent emergence of yaws and its presence in 15th century Europe. *Sci Rep* 10: 9499. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66012-x>
- Guellil M., Kersten O., Namouchi A., Bauer E.L., Derrick M., Jensen A.Ø., Stenseth N.C., Bramanti B. (2018). Genomic blueprint of a relapsing fever pathogen in 15th century Scandinavia. *PNAS* 115(41): 10422-10427. <https://www.jstor.org/stable/26532194>
- Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A., Wilson A.C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312(5991): 282-284. <https://doi.org/10.1038/312282a0>
- Hübler R., Key, F.M., Warinner C., Bos K.I., Krause J., Herbig A. (2019). HOPS: automated detection and authentication of pathogen DNA in archaeological remains. *Genome Biol* 20: 280. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1903-0>
- Immel A., Pierini F., Rinne C., Meadows J., Barquera R., Szolek A., et al. (2021). Genome-wide study of a Neolithic Wartberg grave community reveals distinct HLA variation and hunter-gatherer ancestry. *Commun Biol* 4: 113. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01627-4>
- Keller M., Spyrou M., Scheib C.L., Neumann G., Kröpelin A., Haas-Gebhard B., et al. (2019). Ancient *Yersinia pestis* genomes from across Western Europe reveal early diversification during the First Pandemic (541-750). *PNAS* 116(25): 12363-12372. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820447116>
- Key F.M., Posth C., Esquivel-Gomez L.R., Hübler R., Spyrou M., Neumann G., et al. (2020). Emergence of human-adapted *Salmonella enterica* is linked to the Neolithization process. *Nature Ecol Evol* 4: 324-333. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1106-9>
- Khairat R., Ball M., Chang C.-C.H., Bianucci R., Nerlich A.G., Trautmann M., et al. (2013). First insights into the metagenome of Egyptian mummies using next-generation sequencing. *J Appl Genet* 54: 309-325 <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0145-1>
- Korlevič P., Gerber T., Gansauge M.T., Hajdinjak M., Najel S., Ayinuer-Petri A., Meyer M. (2018). Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth. *Biotechniques* 59: 87-93. <https://doi.org/10.2144/000114320>



- Livingstone F.B. (1991). On the Origin of Syphilis: An Alternative Hypothesis. *Curr Anthropol* 32: 587-590. <https://doi.org/10.1086/204004>
- Margaryan A., Hansen H.B., Rasmussen S., Sikora M., Moiseyev V., Kholov A., et al. (2018). Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones. *Ecol Evol* 8: 3534-3542. <https://doi.org/10.1002/ece3.3924>
- Mutolo M.J., Jenny L.L., Buszek A.R., Fenton T.W., Foran D.R. (2012). Osteological and molecular identification of brucellosis in ancient Butrint, Albania. *Am J Phys Anthropol* 147(2): 254-263. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21643>
- Orlando L., Allaby R., Skoglund P., Der Sarkissian C., Stockhammer P.W., Ávila-Arcos M.C., et al. (2021). Ancient DNA analysis. *Nat Rev Methods Primers* 1: 14. <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00011-0>
- Ortner D.J. (2003). *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*. 2nd edition, San Diego: Academic Press.
- Pinhasi R., Fernandes D., Sirak K., Novak M., Connell S., Alpaslan-Roodenberg S., et al. (2015). Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. *PLoS ONE* 10: e0129102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129102>
- Rascovan N., Sjögren K.-G., Kristiansen K., Nielsen R., Willerslev E., Desnues C., Rasmussen S. (2019). Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic decline. *Cell* 176(1-2): 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.005>
- Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S., Pedersen J.S., Albrechtsen A., Moltke I., et al. (2010). Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463: 757-762. <https://doi.org/10.1038/nature08835>
- Rasmussen S., Allentoft M.E., Nielsen K., Orlando L., Sikora M., Sjörgen K.-G., et al. (2015). Early Divergent Strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 Years Ago. *Cell* 163(3): 571-582. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.009>
- Roberts C., Buikstra J. (2003). *The Bioarchaeology of Tuberculosis: A Global View on Reemerging Disease*. Gainesville, FL: Univesity Press of Florida.
- Rohland N., Glocke I., Aximu-Petri A., Meyer M. (2018). Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nat protoc* 13: 2447-2461. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0050-5>
- Romell J., Vågberg W., Romell M., Häggman S., Ikram S., Hertz H.M. (2018). Soft-Tissue Imaging in a Human Mummy: Propagation-based Phase-Contrast CT. *Radiol* 289: 670-676. <https://doi.org/10.1148/radiol.2018180945>
- Ruffer M.A., Rietti A. (1912). On osseous lesions in Ancient Egyptians. *J Pathol* 16: 439-465.
- Sabin S., Herbig A., Vågene Å.J., Ahlström T., Bozovic G., Arcini C., Kühnert D., Bos K.I. (2020). A seventeenth-century *Mycobacterium tuberculosis* genome supports a Neolithic emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Genome Biol* 21: 201. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02112-1>
- Schmidt-Schultz T.H., Schultz M. (2015). AG 85, a major secretion protein of *Mycobacterium tuberculosis*, can be identified in ancient bone. *Tuberculosis* 95(Suppl. 1): S87-S92. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.034>
- Schuenemann V., Peltzer A., Welte B., van Pelt W.P., Molak M., Wang C.-C. (2017). Ancient Egyptian mummy genomes suggest an increase of Sub-Saharan African ancestry in post-Roman periods. *Nat Commun* 8: 15694. <https://doi.org/10.1038/ncomms15694>
- Seitz S., Priemel M., Zustin J., Beil F.T., Semler J., Minne H., Schinke T., Amling M. (2009). Paget's disease of bone: Histologic analysis of 754 patients. *J Bone Miner Res* 24: 62-69. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080907>
- Slon V., Hopfe C., Weiss C.L., Mafessoni F., De La Rasilla M., Lalueza-Fox C., et al. (2017). Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science* 356(6338): 605-608. <https://doi.org/10.1126/science.aam9695>
- Spyrou M.A., Bos K.I., Herbig A., Krause J. (2019). Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research. *Nature Rev Genet* 20: 323-340. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0119-1>
- Susat J., Lübke H., Immel A., Brinker U., Macãne A., Meadows J., et al. (2021). A 5000-year-old hunter-gatherer already plagued by *Yersinia pestis*. *Cell Rep* 35(13): 109278. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109278>
- Vågene Å.J., Herbig A., Campana M.G., Robles García N.M., Warinner C., Sabin S. et al. (2018). *Salmonella enterica* genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico. *Nat Ecol Evol* 2: 520-528. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0446-6>
- van der Valk T., Pečnerová P., Díez-del-Molino D., Brgström A., Oppenheimer J., Hartmann S., et al. (2021). Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths. *Nature* 591: 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03224-9>
- Wales N., Carøe C., Sandoval-Velasco M., Gamba C., Barnett R., Samaniego J.A., Ramos Madrigal J., Orlando L., Gilbert T.P. (2018). New insights on single-stranded versus double-stranded DNA library preparation for ancient DNA. *Biotechniques* 59(6): 368-371. <https://doi.org/10.2144/000114364>
- Zink A., Haas C.J., Reischl U., Szeimies U., Nerlich A.G. (2001). Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J Med Microbiol* 50: 355-366. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-4-355>