

# ADN FÓSIL: ARQUEOPARASITOLOGÍA EN AMÉRICA

por

Felipe Guhl<sup>1</sup>

## Resumen

**Guhl, F.** : ADN fósil: Arqueoparasitología en América. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **29** (111): 229-238. 2005. ISSN 0370-3908.

Los agentes infecciosos suministran información de gran valor, especialmente cuando se identifican a partir de registros arqueológicos y de restos momificados de hombres y animales. Se puede obtener información muy precisa acerca de sus procesos evolutivos, su filogenia, su distribución geográfica, así como de sus huéspedes y reservorios en el caso de los parásitos. De igual manera brindan una clara idea del contacto que pudieron tener diferentes civilizaciones o grupos poblacionales entre sí, sus movimientos migratorios y su posible extinción. Para lograr obtener estos datos es preciso rastrear las evidencias e interpretarlas de manera correcta además de apoyarse en otras ciencias como la geología, la osteopatología, la química, la antropología y la biología molecular. Esta última ciencia en particular ha tomado enorme impulso en los últimos años y dado su alto nivel de resolución y sensibilidad se ha convertido en un aliado muy valioso en los análisis de ADN fósil. Se presenta el aislamiento y amplificación de ADN fósil de *Trypanosoma cruzi*, aislado de restos humanos de 9.000 años de antigüedad.

**Palabras clave:** ADN fósil, paleoparasitología, RCP, momias, filogenia, *Trypanosoma cruzi*.

## Abstract

Infectious agents provide useful data, especially when identified from the mummified remains of humans and animals found in a particular archaeological excavation site. Precise information can be obtained about their evolutionary processes, phylogeny, geographical distribution and their hosts and reservoirs in the case of parasites.

A clear idea regarding the contact which different civilizations or population groups could have had amongst themselves, their migratory movements and possible extinction can also be deduced when medical effects are integrated with archaeological data. Other sciences such as geology, osteopathology, chemistry, anthropology and molecular biology often can provide valuable additional

<sup>1</sup> Director Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT)- Profesor Titular, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. fguhl@uniandes.edu.co

information. The latter science particularly has gained enormous ground during the last few years. Given its high level of resolution and sensitivity, it has become a very valuable ally for studies and analysis in the area of fossil DNA. Extraction and further amplification of fossil DNA from *Trypanosoma cruzi* isolated from human mummified bodies dated 9 000 years is reported.

**Key words:** Fósil DNA, paleoparasitology, PCR, mummies, phylogeny, *Trypanosoma cruzi*.

## Introducción

Las principales teorías evolutivas actuales proponen que la vida sobre la tierra se originó gracias al parasitismo, inicialmente de unas moléculas a otras, dando paso a la formación de las primeras células, y posteriormente de células a células, permitiendo la diversificación de las formas moleculares y celulares. Estas teorías basan sus supuestos en las evidencias moleculares encontradas en los diferentes niveles de vida y organización celular. Por ejemplo, se han observado secuencias cortas de ADN móvil, denominadas transposones, que se insertan, por acción enzimática, en el ADN de las células, por lo que son considerados parásitos de ADN. Son moléculas como los transposones, las que les han permitido a los investigadores establecer una fuerte relación entre el parasitismo y la evolución de la vida sobre la tierra. Un buen ejemplo de cómo la vida ha evolucionado gracias a las relaciones parasíticas es la aparición de los cloroplastos y las mitocondrias. Estos, siendo originalmente pequeñas células parásitas de células más grandes, supuestamente se convirtieron en organelos de las células eucariotas. El hallazgo de este tipo de hechos han reevaluado el concepto de parasitismo; actualmente se define un parásito como cualquier forma de vida, o compuesto orgánico capaz de multiplicarse, que encuentre su hogar (nicho ecológico) en otra forma de vida (Hawdon & Johnston, 2001). Tan importante ha sido este mecanismo en la historia de la vida, que se estima que en la naturaleza existe un número de especies parásitas diez veces mayor que el número de especies de vida libre. Todas las asociaciones ínter específicas como comensalismo, mutualismo y simbiosis, son distintas manifestaciones de un mismo fenómeno: el parasitismo. Por estas razones los parásitos que se encuentran estrechamente relacionados con sus huéspedes constituyen sensibles marcadores evolutivos y se convierten también en marcadores homínidos de alta resolución.

## Técnicas y procedimientos para la detección de agentes infecciosos en arqueología

*Coprolitos:* Las muestras de materias fecales disecadas proveen quizás la fuente de información más inme-

diata. La información que se puede obtener a partir de coprolitos está restringida básicamente a helmintos y excluye la gran mayoría de otros agentes infecciosos.

*Momias:* Existen muchas descripciones detalladas de los principales lugares en el mundo donde se han hallado cuerpos humanos y de animales momificados (Aufderheide, 2003). En realidad los hallazgos y la detección directa o indirecta de agentes infecciosos a partir de estas fuentes son escasos. Sin embargo algunos trabajos pioneros proveen excelentes protocolos y modelos para la evaluación paleoparasitológica, como el interesante informe del hallazgo de huevos de *Trichiurus trichiura* en el área intestinal de una víctima inca destinada al sacrificio (Pizzi & Shenmore, 1954). Las momias constituyen la fuente de información más importante para la paleoparasitología humana y gracias a esta ciencia se han podido esclarecer algunos aspectos acerca del origen, por ejemplo, del hombre americano, y de sus rutas de migración. Pues así como existen parásitos endémicos de América, existen los que acompañaron a los humanos desde su origen en África. De esta forma, se puede considerar a los parásitos como marcadores homínidos, o sea, elementos que pueden dar pistas sobre la evolución de este grupo de primates. Al mismo tiempo se reconstruye la historia evolutiva de los agentes infecciosos.

Una de las importantes fuentes de información son las momias más antiguas del mundo, que se encuentran en Sudamérica. Pertenecen a la cultura Chinchorro que existió hace alrededor de 9000 años en las costas de lo que hoy es Chile. El empleo de estas momias y otras alrededor del mundo, así como de coprolitos, ha permitido a los investigadores, de diferentes disciplinas, dar respuesta a algunas preguntas referentes a la forma de vida, costumbres y posibles causas de muerte de estos seres humanos ancestrales. Estas causas son muy variables e incluyen traumas, enfermedades hereditarias, condiciones ambientales y enfermedades infecciosas.

*Paleoparasitología:* Es una disciplina relativamente nueva que se basa en el concepto del parasitismo como fuente de variación y evolución. Esta ciencia se beneficia de los conocimientos generados por otras disciplinas como



**Figura 1.** Cuerpo humano momificado espontáneamente perteneciente a la cultura Chinchorro.

la historia, la antropología, la medicina, la paleontología, la palinología, la geografía y la genética, para ayudar a reconstruir la historia de la vida en nuestro planeta, en un proceso retroalimentativo entre todas estas disciplinas. Otra importante rama de la ciencia que ayuda al esclarecimiento de estos temas es la epizootiología, la cual estudia las epidemias y como éstas se manifestaron en la historia. Permite correlacionar la distribución de las especies con el impacto patológico, la abundancia de las especies y posibles migraciones.

*La etnografía:* Los códices de San Martín de la Cruz (1552) y el Florentino de Sahagún (1530) constituyen fuentes importantes de información. Hay claras descripciones de *Ascaris lumbricoides* y *Toxocara canis* inmediatamente después de la conquista de México. También

se hace referencia a *Enterobius vermicularis*. Se ha podido establecer por ejemplo el uso, por parte de los aztecas, de plantas que se cocinaban para producir “medicina que mata gusanos”. Los dibujos originales de herbalistas aztecas muestran plantas utilizadas como antihelmínticos y aún no identificadas en tiempos actuales.

*aADN:* La recuperación y el análisis de aADN (ADN antiguo o ADN fósil) proveniente de especímenes paleontológicos, arqueológicos, ejemplares de plantas y animales conservados en museos así como especímenes forenses, son un blanco importante para el análisis genético a través de su amplificación.

El término de ADN fósil se refiere a cualquier traza de ADN proveniente de un organismo muerto o también al ADN de un organismo vivo encontrado extracorporeamente. Así pues, cualquier tipo de ADN que haya sufrido procesos autolíticos o diagenéticos o cualquier tipo de fijación se considera como aADN (Herrmann & Hummel, 1994). La detección de ADN proveniente de restos antiguos (oscila entre menos de 100 años hasta millones de años) se ha convertido en una nueva y fascinante área de investigación con muchas implicaciones, abriendo la posibilidad de estudios evolutivos a nivel molecular en una escala de tiempo ilimitada. El estudio del aADN es un campo relativamente nuevo y está emergiendo como una herramienta valiosa para reconstruir el pasado de una manera muy precisa y en particular el origen de las enfermedades infecciosas humanas. Con el advenimiento de la amplificación *in vitro* del ADN, gracias al descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en la década de los 80's, la biología molecular se revolucionó abriendo campos nuevos en su aplicación y análisis. Diversas disciplinas como la arqueología, las ciencias forenses, la paleoparasitología, la epidemiología molecular se han beneficiado del análisis de aADN.

Diversas aplicaciones que resultan de la investigación del AND fósil incluyen:

- aADN recuperado de tejidos momificados de humanos y animales.
- aADN recuperado de coprolitos.
- Recuperación de aADN de organismos atrapados en ámbar.
- aADN recuperado de especímenes de plantas y animales en colecciones de museo.
- aADN aislado de semillas de plantas o compresión de fósiles.

- aADN aislado de sedimentos orgánicos de pozos sépticos antiguos.

### Métodos tradicionales de diagnóstico

*Reconstrucción de coprolitos:* Los coprolitos se encuentran con alguna frecuencia en restos momificados y pueden someterse a métodos sencillos de rehidratación y reconstrucción sumergiéndolos en una solución de Fosfato trisódico al 0.5%. Una vez obtenido el material reconstituido, este puede someterse a métodos de concentración, tales como centrifugación, formol-eter, métodos de flotación, etc., con el ánimo de poder visualizar mejor el posible material parasitario presente. Huevos de helmintos, fracciones de larvas y eventualmente quistes, son algunos de los elementos que pueden ser recuperados e identificados a través de la rehidratación de los coprolitos.

*Métodos histológicos:* Los diferentes tejidos momificados también pueden reconstruirse cuidadosamente y ser sometidos a cortes histológicos para luego ser coloreados y observados al microscopio de luz. Otras preparaciones podrían ser destinadas a su observación por el microscopio electrónico. La identificación de la presencia de parásitos intracelulares en ejemplares infectados se puede realizar de manera muy específica.

*Métodos inmunológicos:* Recientemente nuestro grupo de investigación ha logrado la recuperación de anticuerpos séricos a partir de tejidos momificados haciendo posible la determinación de infecciones a las cuales estaban sometidos los pobladores antiguos. Mediante la técnica de cromatografía de afinidad, en donde se busca la afinidad entre dos moléculas (proteína G acoplada a sefaroza 4B de manera covalente) muestra elevada afinidad por las inmunoglobulinas. Los anticuerpos son de carácter glicoproteico; al hidratar en una solución de fosfato trisódico, los tejidos que reciben gran irrigación sanguínea como el corazón, el hígado y el bazo, fue posible purificar inmunoglobulinas del tipo G en una concentración suficiente para llevar a cabo exámenes diagnósticos mediante pruebas convencionales tales como Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) o ELISA. Como es sabido la determinación de la producción de anticuerpos contra diferentes antígenos es utilizada para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas. Seguramente las inmunoglobulinas aisladas por este método podrán dar luces para determinar la causa de las infecciones ocasionadas también por hongos, virus y bacterias. La utilización de anticuerpos monoclonales constituye otra herramienta que ofrece una muy alta especificidad en pruebas convencionales de diagnóstico tales como ELISA, IFI

o radioinmunoensayo (RIA). Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en el laboratorio y pueden estar dirigidos virtualmente contra cualquier tipo de antígeno. Teniendo esta herramienta a la mano, es posible buscar antígenos parasitarios en diferentes tejidos utilizando la técnica de inmunoperoxidasa (IP) o de IFI y también en paleo heces. Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de la fusión de células de mieloma y linfocitos sensibilizados. Los híbridos resultantes conservan la propiedad de rápida multiplicación celular del mieloma y la característica de síntesis y secreción de anticuerpos de los linfocitos. Se pueden clonar y mantener indefinidamente en medios de cultivo celular o congelados. Hoy en día se encuentra una enorme gama de anticuerpos monoclonales que cubren un amplio espectro diagnóstico.

*Métodos de biología molecular:* A pesar de que los exámenes directos permiten conocer la morfología de ciertas estructuras de los parásitos o huevos, o quistes de los mismos, se hace muchas veces difícil su hallazgo así como la interpretación de los resultados. Estructuras frágiles de los organismos parasitarios multicelulares pueden destruirse fácilmente a través del tiempo dificultando la labor de su identificación. Los parásitos unicelulares, como es lógico, son prácticamente imposibles de ser detectados a través de los métodos convencionales de diagnóstico. Los métodos en biología molecular sin duda, se han convertido en una herramienta poderosa en el estudio genético permitiendo el análisis de aDNA proveniente de cuerpos humanos momificados y también de animales. Desde el punto de vista de la parasitología estas técnicas proveen también una fuente de información muy valiosa. Muchas veces los organismos que parasitaban a los humanos primitivos y a pobladores antiguos son posibles de ser detectados y de esta manera se pueden establecer correlaciones entre los microorganismos y sus huéspedes y deducir por ejemplo rutas de migración, interrelaciones entre diferentes grupos poblacionales etc. La metodología desarrollada en biología molecular permite no solamente la identificación específica del parásito sino también provee información genética del mismo organismo. A partir de los años 90 y con el advenimiento de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa RCP, ésta se convierte en la técnica de elección preferida por los investigadores, debido a la escasa cantidad de ADN que se requiere para la amplificación y su posterior análisis. La RCP permite amplificar prácticamente cualquier ADN de cualquier célula obtenido a partir de tejidos. La técnica se puede desarrollar utilizando fracciones de ADN (iniciadores) que permiten el proceso de replicación de un fragmento determinado con la ayuda de una enzima polimerasa, la pre-

sencia de nucleótidos y una temperatura de anillaje adecuada proporcionada por un termociclador. Hoy día se puede amplificar aDNA a partir de cortes histológicos *in situ*, revelándose la amplificación con el uso de material radioactivo o enzimático. La hibridación con sondas específicas, es decir con secuencias propias del organismo también marcadas permite la confirmación del producto de amplificación de la RCP. La amplificación de determinadas fracciones de ADN hace posible una identificación mucho más fina y sutil del parásito, además de brindar información adicional acerca de su filogenia y proceso evolutivo a través del tiempo, como por ejemplo la amplificación de genes ribosomales. En un genoma eucariótico se presentan numerosas copias de los genes de 5S y del rARN principal; estos genes forman parte del ADN repetitivo medio. Los cientos o miles de copias del gen principal del rARN se conocen como ADN ribosómico (rADN) y se encuentran agrupadas en la región organizadora del nucleolo de uno o más cromosomas del genoma. Se ha demostrado que se sintetizan numerosos transcritos a un mismo tiempo a partir de un solo gen de rARN y que todos los genes de rARN organizados en tándem participan simultáneamente en la transcripción. Aunque una especie determinada presenta espaciadores con secuencias muy similares, puede existir homología muy escasa entre los organismos estrechamente relacionados. Esto podría indicar que no existe ninguna presión selectiva para mantener una secuencia espaciadora determinada presentándose numerosas variaciones entre especie y especie. Dentro de los genes ribosomales existen secuencias que han evolucionado de un modo relativamente lento y han sido expuestas a presiones de selección fuertes por lo que permanecen constantes en los individuos. Por lo contrario, las secuencias espaciadoras de estos genes han evolucionado de una manera rápida presentando una alta variabilidad dentro de especies de un mismo género o dentro de poblaciones. Estos hechos permiten hallar relaciones filogenéticas entre los individuos teniendo en cuenta que las secuencias que permanecen constantes permitirán el estudio de individuos lejanamente relacionados, mientras que las secuencias espaciadoras que varían mucho serán de interés para el estudio de individuos cercanamente relacionados. Los ácidos nucleicos son moléculas muy estables.

La primera extracción exitosa de aADN y aARN se llevó a cabo en 1980 por parte de un grupo de científicos chinos, a partir de un cartilago de costilla perteneciente a la antigua dama de Mawangtui, un cuerpo preservado por más de 2.000 años. La primera amplificación de aADN se llevó a cabo en un espécimen de museo en 1984, a partir de un ejemplar de quagga, un animal extinto hace relati-

vamente poco tiempo y evolutivamente cercano a los caballos modernos (**Higuchi et al.**, 1984). Un fragmento de ADN mitocondrial de este espécimen fue amplificado y secuenciado. Un año mas tarde, **Pääbo** en 1985, logró amplificar aADN a partir de una momia egipcia de 2.400 años de antigüedad. Fragmentos de ADN fueron amplificados a partir de un hueso humano de 5 500 años de antigüedad (**Hanni et al.**, 1990).

Estos descubrimientos fueron sobrepasados en tiempo con la amplificación de aADN de hojas de *Magnolia* fosilizadas, datadas de 18 millones de años (**Goldenberg et al.**, 1990). También se encuentran registros que describen el aislamiento exitoso de ADN fósil a partir de termitas embebidas en ámbar y que datan entre 25 y 30 millones de años (**DeSalle et al.**, 1992).

### Pistas sobre el hombre americano

Acerca de la evolución y dispersión de algunos organismos parásitos se ha podido establecer que estos fueron procesos continuos que divergieron cuando las masas continentales actuales se separaron del súper continente Pangea hace 100 millones de años. En ese momento empezaron a encontrar nichos ecológicos y a crear relaciones huésped-parásito muy bien definidas, logrando eficientes métodos de dispersión y, en algunos casos, incluyendo dentro de su ciclo de vida a varios huéspedes diferentes. Este proceso en el continente americano tomo miles de años en establecerse, y se supone que existió un punto de equilibrio, el cual fue roto gracias a las interacciones de los primeros humanos pobladores del continente con el medio ambiente. Nuestros antepasados adquirieron estos parásitos de animales, dando cabida a las primeras enfermedades infecciosas, que son las mismas que hoy nos afectan. La capacidad de infectar a los humanos fue posible gracias a que estos organismos no eran completamente especialistas en las relaciones con sus huéspedes, al contrario estas tienen cierto grado de plasticidad, gracias a la variedad morfológica y fisiológica de los parásitos, que les permite tener una amplia gama de huéspedes. Algunas teorías sobre el inicio de las culturas americanas aseguraban que América era un continente libre de parásitos y que estos habían llegado al nuevo mundo con los colonizadores europeos durante la época de la Conquista. Sin embargo, se ha demostrado que varios parásitos autóctonos de América, les dieron la bienvenida a los primeros hombres que llegaron al Nuevo Mundo, causándoles enfermedades debilitantes y mortales (**Reinhard**, 1998). El examen de diversos restos humanos, entre los que se encuentran cazadores de focas de Alaska, pintores prehistóricos de cuevas en Norte Améri-

ca y agricultores Incas en el Perú, han llevado al hallazgo de una serie de parásitos propios de América. Algunos de estos parásitos resistieron el frío que enfrentaron los primeros inmigrantes humanos, que venían desde el Viejo Mundo a través del estrecho de Bering, durante el Pleistoceno, mucho antes de la llegada de los europeos a América.

### **Los primeros habitantes**

El establecimiento, la dispersión y la evolución de organismos parásitos en el continente americano fue un proceso evolutivo continuo que empezó probablemente cuando el supercontinente Pangea se dividió y se separaron las masas continentales actuales, hace alrededor de 100 millones de años. Al igual que todas las especies animales o compartieron los habitats en los continentes separados o se convirtieron en especies endémicas ocupando nichos específicos y guardando ciclos de huésped-parásito bastante definidos. Es importante tener en cuenta que muchas entidades parasitarias se transmiten a través de insectos vectores, muchos de los cuales se alimentan de sangre de animales silvestres y transmiten los parásitos, convirtiéndolos en reservorios. Estos ciclos de transmisión tomaron miles de años en establecerse y en la gran mayoría de los casos se logró un equilibrio huésped-parásito muy bien establecido que solamente se vio alterado cuando el hombre comenzó a intervenir el medio ambiente para construir sus viviendas, cazar y obtener recursos energéticos para su subsistencia.

El origen y la dispersión de humanos al Nuevo Mundo coincidieron con la última parte de las glaciaciones del Pleistoceno y su distribución fue influida por estas glaciaciones de muy diversas formas. El proceso se aceleró periódicamente cuando el estrecho de Bering se angostó suficientemente para permitir el cruce de los humanos hacia el continente americano. Se han realizado excavaciones arqueológicas desde las islas Aleutianas a través de las costas occidentales de los Estados Unidos y Canadá hasta las costas de México, Centro y Sudamérica. La evidencia más cercana de la presencia de actividades humanas data de alrededor de 15.000 años atrás, probablemente 10 a 12.000 años, para comenzar actividades de asentamientos humanos en Sudamérica.

Varias especies de parásitos tuvieron tiempo suficiente para establecerse y para infectar a los primeros humanos que pisaban el Nuevo Continente y a su vez otras especies transportadas pasivamente por estos nuevos visitantes empezaron a encontrar nuevos albergues

y refugios en otras especies animales. El contacto entre hombres y animales se hizo cada vez más estrecho al domesticar muchos de ellos alrededor de sus viviendas y de su peridomicilio en donde se llevaban a cabo actividades de siembra y agricultura en general. Los continentes se reconectaron definitivamente cuando los viajes transoceánicos se volvieron frecuentes, hacia el siglo XVI, resultando en una rápida colonización global muchas veces por parte de humanos exóticos con sus animales domésticos y plantas sumadas a las plantas silvestres y animales salvajes locales. Procesos similares de introducción y extinción continúan hoy en día a pesar de las modernas medidas de control en salud pública en las fronteras.

### **Los primeros parásitos**

Las principales teorías evolutivas actuales proponen que la vida sobre la tierra se originó gracias al parasitismo, inicialmente de unas moléculas a otras, dando paso a la formación de las primeras células, y posteriormente de células a células, permitiendo la diversificación de las formas moleculares y celulares. Estas teorías basan sus supuestos en las evidencias moleculares encontradas en los diferentes niveles de vida y organización celular. Por ejemplo, se han observado secuencias cortas de ADN móvil, denominadas transposones, que se insertan, por acción enzimática, en el ADN de las células, por lo que son considerados parásitos de ADN. Son moléculas como los transposones, las que les han permitido a los investigadores establecer una fuerte relación entre el parasitismo y la evolución de la vida sobre la tierra.

Un buen ejemplo de cómo la vida ha evolucionado gracias a las relaciones parasitarias es la aparición de los cloroplastos y las mitocondrias. Estos, siendo originalmente pequeñas células parásitas de células más grandes, supuestamente se convirtieron en organelos de las células eucariotas. El hallazgo de este tipo de hechos han reevaluado el concepto de parasitismo; actualmente se define un parásito como cualquier forma de vida, o compuesto orgánico capaz de multiplicarse, que encuentre su hogar (nicho ecológico) en otra forma de vida. Tan importante ha sido este mecanismo en la historia de la vida, que se estima que en la naturaleza existe un número de especies parásitas diez veces mayor que el número de especies de vida libre.

### **Las primeras enfermedades infecciosas**

Se ha escrito acerca del origen y rutas de dispersión y del impacto de microbios en el Nuevo Mundo precolom-

bino tales como *Treponema* y el virus del Sarampión, así como también de enfermedades ocasionadas por protozoos parásitos como *Plasmodium* y *Trypanosoma*.

La paleo-epidemiología de enfermedades causadas por helmintos también ha recibido especial mención debido a su amplia ocurrencia. La información de la fauna de helmintos del Nuevo Mundo se ha obtenido principalmente de paleo heces y de cuerpos momificados. Es muy probable que algunas helmintiasis compartidas por humanos, por sus animales domésticos y salvajes tuvieran una distribución circunártica o que fueran comunes a los dos continentes. Trichinosis y Toxocariasis son claros ejemplos. Sin embargo, dentro de los parásitos estrictamente humanos solo *Enterobius vermicularis* y *Trichiurus trichura* están bien documentados al igual que *Ancylostoma duodenale*, que pudieron haber sido transferidos de Asia a América aún cuando parece no haber evidencia para confirmarlo. Por esta razón es muy importante hacer uso de técnicas muy sensibles y específicas que nos permitan rastrear de manera precisa estas incógnitas. Las costumbres alimenticias de nuestros antepasados les causaron graves problemas de salud. El hábito de comer carne y la falta de combustible para cocinarla en el Ártico, permitieron que los primeros Americanos se infectaran con gusanos del género *Trichinella*, que en gran número pueden causar la muerte y terribles dolores musculares, además de inflamaciones alrededor de los ojos y hemorragias debajo de las uñas. Un ejemplo que permite entender más claramente cómo se produjeron las primeras infecciones de Nematodos de la especie *Trichinella nativa* es el consumo de carne de oso polar cruda, por parte de los primeros americanos. Los quistes de esta especie infectan al oso polar. La forma en que lo infectan también se debe a sus hábitos alimenticios. El oso se alimenta de huevos de aves que a su vez han comido roedores infectados con el parásito. Debido a su rápido metabolismo, las aves, al defecar, expulsan pedazos de carne del roedor sin digerir, frecuentemente encima de sus huevos, y es en estos pedazos donde se encuentran los quistes del parásito. Los pequeños gusanos del género *Trichinella* invadieron los músculos y hasta el corazón de los americanos primitivos. Las lombrices de cabeza espinosa pertenecientes a los Acantocéfalos, perforaron las paredes intestinales de los antiguos habitantes de la Gran Cuenca de Estados Unidos. En la región andina, protozoos pertenecientes al género *Leishmania* ulceraron gargantas y bocas. Otros, pertenecientes al género *Trypanosoma*, causaron daños cardíacos y provocaron deformaciones en el tracto digestivo de sus víctimas y muertes súbitas por falla cardíaca.

## Nuevas teorías

La búsqueda de respuestas sobre la presencia de ciertos parásitos en el Nuevo Mundo ha llevado a la formulación de nuevas teorías sobre el poblamiento de América. Este es el caso de la Uncinaria, género de Nematodos que causa un tipo de anemia, la cual afectó a seres humanos en América antes del contacto con los conquistadores. Los nemátodos del género *Enterobius*, que aunque no causan infecciones mortales, producen severas molestias a sus huéspedes, aún hoy día, han acompañado al hombre desde sus orígenes en África. Estos parásitos han sido encontrados en restos de al menos 10.000 años de antigüedad. De igual forma este parásito es mencionado en el Codex Florentino escrito por médicos Aztecas y recopilados en 1550. La presencia de estos parásitos en muestras prehispánicas ha generado una gran controversia, ya que al ser parásitos tropicales (endémicos de zonas ecuatoriales) muy seguramente no habrían podido realizar la travesía a través del Ártico debido a las bajas temperaturas. Para responder a esta incógnita, se ha propuesto que la presencia de estos parásitos es una evidencia del contacto transpacífico entre América y las culturas asiáticas. Últimamente se ha dado otra posible explicación a la presencia de estos parásitos en el Nuevo Mundo, que ha surgido a partir de un fenómeno biológico conocido como hipobiosis, que consiste en que los organismos pasan largos periodos de tiempo en un estado "durmiente" o latente durante el cual detienen su desarrollo hasta que las condiciones vuelvan a ser óptimas. Este fenómeno ha sido observado en Uncinaria y muy posiblemente permitió a estos organismos sobrevivir a la migración trans Beringia. Varios parásitos de animales que ya estaban presentes en América antes de la llegada del hombre en el Pleistoceno, se adaptaron a la presencia de los nuevos primates extremadamente curiosos y entrometidos, llegando a establecer relaciones parasíticas con ellos. Es el caso de unos platelmintos, que pueden llegar a medir hasta 5 metros de longitud y que se alojan en el intestino delgado de sus huéspedes. Pertenecientes al género *Diphyllobothrium*, existían en América mucho antes de la llegada del hombre y se encontraban como parásitos de animales, entre ellos varios peces y el león marino, *Otaria byronia*, como huésped final. Debido al consumo de pescado crudo por parte de los hombres recién llegados, estos se convirtieron en huéspedes finales alternativos, sufriendo una enfermedad a veces bastante grave y debilitante que incluye anemia perniciosa, un tipo de anemia que se relaciona con deficiencia de la vitamina B12. Esta relación parásito-animal-hombre, ha permitido desarrollar nuevas ideas acerca de la evolución de los parásitos.

## La detección de *Trypanosoma cruzi* en las momias humanas más antiguas del mundo

La escogencia de la tripanosomiasis americana, mejor conocida como enfermedad de Chagas, para el presente estudio, se debió principalmente a la alta prevalencia de esta infección en la región. Inicialmente, intentamos identificar la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* con el aislamiento y amplificación por RCP de aADN obtenido de cuerpos humanos momificados que datan 4.000 años de antigüedad, habitantes de desierto de Atacama al norte de Chile (Guhl *et al.*, 1997, 1999). La amplificación de un segmento de ADN de 330 pares de bases correspondiente a una fracción del ADN del cinetoplasto del parásito.

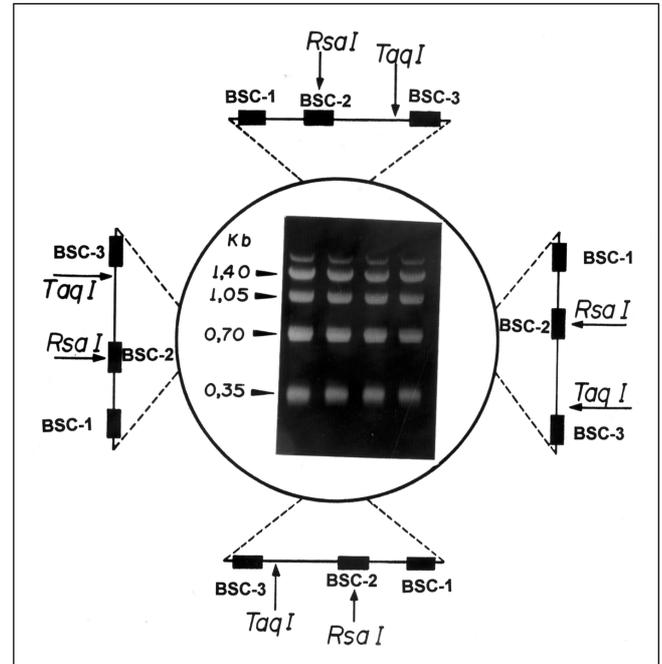
El cinetoplasto del parásito consiste de una compleja red de ADN, conformada por 50 maxicírculos y 10.000 minicírculos de ADN. Los minicírculos constan a su vez de cuatro bloques de secuencia conservada, los cuales al ser digeridos con enzimas de restricción permiten obtener diferentes segmentos de oligonucleotidos de longitud diferente. (Figura 2).

### Extracción del aADN

Pequeños trozos de aproximadamente 3X3 mm de diferentes tejidos de los cuerpos momificados se rehidrataron en 0.5% de solución de fosfato trisódico a temperatura ambiente por 48 horas. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 1.500 g. El sobrenadante se descartó y se agregó 2.5 ml de TENS (tris HCl 10mM, EDTA 50 mM, NaCl 100mM, SDS 0.5%) junto con 10 µl de proteinasa K (stock 10mg/ml) dos veces al día, durante tres días, conservando las muestras a 37°C para la digestión de proteínas.

Se agregaron 200 µl de la muestra digerida a 200 µl de fenol, colocadas en el tubo número 1, después de centrifugar por 5 minutos en microfuga, el sobrenadante se recolectó en el tubo número 2, se agregaron 100 µl de fenol y 100 µl de cloroformo. Después de agitación suave por un minuto, se repitió el proceso de centrifugación, y el sobrenadante se recolectó en el tubo número 3. Después se agregaron 150 µl de H<sub>2</sub>O al tubo 2 con el ánimo de obtener una mayor cantidad de ADN repitiendo el procedimiento anterior.

El sobrenadante fue recolectado en el tubo 3 y un volumen igual de cloroformo fue adicionado a la fase acuosa obtenida. El ADN precipitado por adición de 10% del volumen inicial de acetato de sodio y el doble volumen de etanol absoluto a -20°C precipitado en hielo durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado después de 15 minutos de centrifugación en microfuga. El sedimento se secó a 50°C y fue resuspendido en 30 µl H<sub>2</sub>O.



**Figura 2.** Esquema de un minicirculo de kADN de *Trypanosoma cruzi* con cuatro regiones conservadas. En cada región de 122pb, se muestran los bloques de secuencia conservada: BSC-1, BSC-2, BSC-3 y dos sitios de restricción para las endonucleasas RsaI y TaqI. En la parte interna del esquema se ilustra un gel de agarosa al 1% en el cual aparecen cuatro canaletas idénticas con muestras de ADN de minicirculos digeridos con Hae III. Los cuatro fragmentos de 0.35, 0.70, 1.05 y 1.40kb confirman la existencia de cuatro regiones repetidas dentro del minicirculo.

### Extracción de ADN a partir de muestras de sangre

*T. cruzi* fue cultivado en sangre de ratón. Tanto la sangre infectada como la sangre libre de tripanosomas se utilizaron como control y al ADN extraído con guanidina-EDTA se agregó un volumen igual de guanidina 6 M/EDTA 0.2 M, pH 8.

La mezcla se dejó a temperatura ambiente por 7 días. Para obtener los minicirculos de kADN se calentaron alícuotas de 200 µl por 15 minutos (Britto *et al.*, 1993) y luego fueron mantenidos a temperatura ambiente por otros 7 días. El ADN fue extraído siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente.

### Amplificación de ADN de *T. cruzi*

Para cada una de las reacciones en cadena de la polimerasa (RCP), se utilizó un termociclador (PTC-100; MJ Research Inc., Watertown, MA). La RCP se realizó usando los siguientes iniciadores:

S35: 5'-AAATAATGTACGGG-KGAGATGATGCAGTA-3'

S36: 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'

(Avila *et al.*, 1991; Britto *et al.*, 1993) que amplifican un segmento de 330 pb de la región variable del minicírculo de kADN de *T. cruzi*.

El siguiente protocolo fue usado para una reacción de 20 µl: buffer 10X (Promega, Madison, WI), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (Promega), KCl (50 mM) dNTPs(200µm), S35 y S36 10 picomoles cada uno, y 1 unidad de Taq (Promega). Luego fueron agregados 2 µl del ADN extraído para cada 20 µl de reacción. El perfil térmico usado fue de 35 ciclos a 94°C por 1 minutos, 60°C por 1 minuto, y 72°C por un minuto, con un paso inicial de denaturación de 5 minutos a 94°C y una extensión final de 72°C por un periodo de 5 minutos. La electroforesis fue realizada en un gel de poliacrilamida al 5% con una alícuota de 10 µl para la visualización del fragmento de ADN amplificado. En este estudio una positiva identificación del kADN de *T. cruzi* se define como el aislamiento de una banda de 330 pb en el gel de electroforesis.

Tanto la extracción, como la mezcla de los reactivos para la RCP y la electroforesis fueron realizadas en cuartos separados. Todos los materiales fueron previamente irradiados con luz ultravioleta (UV). Otras medidas, como el uso de puntas anti-aerosoles también fueron tenidas en cuenta.

En ensayos de laboratorio subsiguientes y con el ánimo de aumentar la sensibilidad de la prueba se estandarizó un RCP anidado el cual amplifica un segmento de ADN más corto y que corresponde a un fragmento de 70 pb (Madden *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta lo anterior se

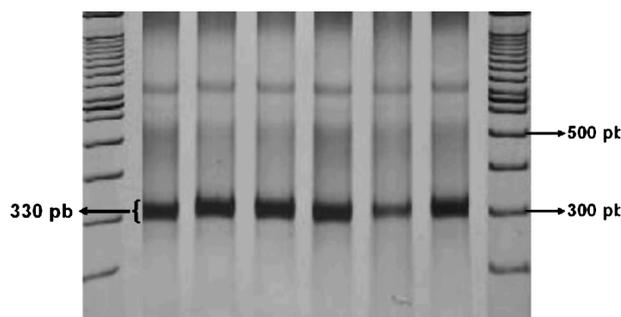


Figura 3. Productos de amplificación de *Trypanosoma cruzi* en gel de poliacrilamida al 5% utilizando los iniciadores S35 y S36.

estudiaron 283 cuerpos humanos momificados pertenecientes a 12 culturas prehispánicas que datan de 400 hasta 9 000 años de antigüedad, la tabla 1 muestra la secuencia de culturas de las poblaciones estudiadas, el periodo relativo, la distribución de las muestras y el porcentaje de positividad obtenido.

El 41% de los tejidos extraídos reaccionaron positivamente dando amplificación por RCP, los datos de prevalencia encontrados no demuestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados a nivel individual, ni tampoco entre los subgrupos comparados con base en el sexo, la edad o el peso del espécimen estudiado. Estos resultados sugieren que el ciclo selvático de la enfermedad de Chagas ya estaba bien establecido en el tiempo cuando los primeros humanos (miembros de la cultura Chinchorro) que habitaron por primera vez este segmento de la costa pacífica de los Andes, y que inadvertidamente entraron en contacto con mucho otras especies de mamíferos que actúan como reservorios del parásito.

Tabla 1. Secuencia de las culturas de las poblaciones estudiadas, período relativo, distribución de las muestras y porcentaje de positividad para *Trypanosoma cruzi*.

Cultura	Rango de tiempo	No. de muestras	Porcentaje positivos
Chinchorro temprano	7050 - 3000 BC	18	39
Chinchorro tardío	3000 - 1500 BC	53	43
Alto Ramírez temprano	1000 BC - 0	16	25
Alto Ramírez tardío	0 - 400 AD	20	35
Cabuza	400 - 1250 AD	27	41
Maitas	1000 - 1250 AD	25	40
Chiribaya	1050 - 1250 AD	70	47
M8 (Chiribaya alto)	1050 - 1250 AD	16	19
San Miguel	1250 - 1350 AD	9	33
Inca	1450 - 1550 AD	26	50
Colonial	1550 - 1850 AD	3	67
Todas las culturas	7050 BC - 1850 AD	283	40.6

Las edades fueron determinadas por dataje con carbono radioactivo.

## Referencias bibliográficas

- Aufderheide, A.** 2003 *The Scientific Study of Mummies*. Published by the University Press, Cambridge, UK. 608 pp.
- Avila, H. A., Sigman, D. S., Coohen, L. M., Milikan, R. C. & Simpson, L.** 1991. Polymerase Chain Reaction Amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* **48**: 211-222.
- Britto, C., Cardoso, M. A., Wincker, P., Morel, C. M.,** 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **88**: 171-172.
- DeSalle, R., Gatesy, J., Wheeler, W. & Grimaldi, D.** 1992. DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* **257**: 1933-1936.
- Goldenberg, E. M., Giannasi, D. E., Clegg, M. T., Smiley, C. J., Durbin, M., Henderson, D. & Zurawski, G.** 1990. Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. *Nature* **344**: 656-658.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Yockteng, R., Vallejo, G. A. & Cárdenas - Arroyo, F.** 1997. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *Lancet* **349**: 1370.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G. A., Yockteng, R., Cárdenas-Arroyo, F., Fornaciari, G., Arriaza, B. & Aufderheide, A.** 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Amer. Jour. Phys. Anthropol.* **108**: 401-407.
- Hanni, C., Laudet, V., Sakka, M., Begue, A. & Stehelin, D.** 1990. Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones. *C. R. Acad. Sci. (Paris) III.* **310**: 365-370.
- Hawdon, J. & Johnston, S.** 1995. Hookworm in the Americas: An alternative to transpacific contact. In : *Proceedings of the II World Congress on Mummy Studies*. Cárdenas-Arroyo F. & Rodriguez-Martín C. Ed. 207-211.
- Herrmann, B. & Hummel, S.** 1994. *Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical and forensic specimens*. Editors. Springer - Verlag New York Inc. 263pp.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. & Wilson, A. C.** 1984. DNA sequences from a quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312**: 282-284.
- Madden, M., Salo, W. L., Streitz, J., Aufderheide, A. C., Fornaciari, G., Jaramillo, C., Vallejo, G. A., Yockteng, R., Arriaza, B., Cárdenas-Arroyo, F. & Guhl, F.** 2001. Hybridization screening of a very short PCR products for paleoepidemiological studies of Chagas disease. *BioTechniques*. **30**: 102-109.
- Pääbo, S.** 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* **314**: 644-645.
- Pizza, J. A. & Shenmore, H.** 1954. Contribuciones a la arqueoparasitología en América. *Boletín Chileno de Parasitología* **9**: 73-75.
- Reinhard, K. J.** 1998. Mummy studies in archeoparasitology. In *A Cockburn, E Cockburn, TA Reyman, Editors. Mummies, Disease and Ancient Cultures*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 377-380.

Recibido el 7 de febrero de 2005

Aceptado para su publicación el 4 de abril de 2005