

TREPONEMATOSIS EN RESTOS OSEOS PRECERAMICOS DE COLOMBIA

por

Javier D. Burgos*, Gonzalo Correal-Urrego**, Carmelo Arregocés***

Resumen

Burgos, J. D. Correal-Urrego, G. & C. Arregocés, Treponematosi en restos óseos precerámicos de Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 19 (73): 237-241, 1994. ISSN 0370-3908.

En el sitio llamado Aguazuque, localizado en una hacienda del mismo nombre en el municipio de Soacha, Departamento de Cundinamarca, se encontraron una serie de restos óseos, uno de los cuales, -0614 A-ICNMHN- presenta lesiones claramente sugestivas de treponematosi, lo cual fué confirmado empleando técnicas inmunológicas de anticuerpos fluorescentes anti-Treponema con suero absorbido (FTA-ABS); comprobándose así la presencia de sífilis en América, y específicamente en Colombia, hace más de 5.000 años antes del presente. Siendo ésta la primera demostración clara de infección por *Treponema pallidum* realizada en restos óseos de tal antigüedad en el mundo.

Abstract

Human skeletal remain radiocarbon dated to 5.030 ± 40 years B.P from Aguazuque in Colombia with pathological alterations suggestive of treponemal infection: gummatous osteoperiostitis, hyperostosis and caries sicca among others, was analyzed using immunological methods (FTA-ABS) demonstrating the presence of antigens from *Treponema pallidum* in the affected bones. examined, indicating that syphilis have had a long residence time in Precolombian America.

Introducción

El origen de la sífilis es aún materia de gran controversia. La abundancia de material de esqueletos y restos óseos humanos que exhiben lesiones sugestivas de infección treponematósica, aunado al descubrimiento de antígenos de treponema en los restos óseos de un oso del Pleistoceno (*Arctodus simus*) en Indiana, Estados Unidos, indican la presencia de la infección con anterioridad a 1492.

Un esqueleto humano datado en 5.030 ± 40 años mediante técnicas de radiocarbono (Gromingers) encontrado

trado en la localidad de Aguazuque en el municipio de Soacha, presenta alteraciones patológicas claramente sugestivas de infección por treponemas: osteoperiostitis gomatosas, hiperostosis y caries sicca entre otras.

A estos restos se les hizo un análisis inmunológico, empleando la técnica de FTA-ABS, demostrándose la presencia de antígenos de *Treponema pallidum* en los huesos examinados, indicando esto que la sífilis ha tenido un largo período de residencia en América precolombina.

La naturaleza de las características patológicas, las evidencias geográficas y la detección de antígenos de *T. pallidum* en los restos, dan fuerza a la conclusión de que este es un caso de sífilis venérea avanzada.

Materiales y Métodos

Sitio: Aguazuque 1. El sitio está localizado en la hacienda del mismo nombre en el municipio de Soacha

* Laboratorio Biotecnológico. Instituto de Desarrollo y Aplicaciones Biotecnológicas (IDAB). Universidad INCA de Colombia. A.A 78001 de Bogotá.

** Unidad de Antropología. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia.

*** Unidad de Genética. Instituto Nacional de Salud.

(Departamento de Cundinamarca) a una altitud de 2.640 metros sobre el nivel del mar y a una latitud de 40° 37' norte y 74° 15' al este de Greenwich. Dicho sitio se encuentra en la margen sur oriental de la sabana de Bogotá sobre la formación geológica del mismo nombre (Van der Hammer y González, 1963).

Restos Oseos

Se analizó un esqueleto de un hombre adulto serie N° 0614 A-ICNMHN el cual presenta lesiones características de infección treponematósica.

Producción de antisueros

Se tomaron porciones de fémur afectado y se redujeron a 500 mg de polvo fino, el cual se diluyó en 2 ml de tampón fosfato salino (PBS) pH 7.6 con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2 %. Esta mezcla se dejó en agitación continua a temperatura ambiente durante toda la noche y posteriormente fué centrifugada a 3.000 revoluciones por minuto durante 20 minutos; el sobrenadante fué separado y dializado contra PBS durante 12 horas y luego filtrado y esterilizado empleando un filtro millipore de 0.22 mm de diámetro.

La concentración final de proteína obtenida fué de 0.18 mg/ml, medida de acuerdo al método establecido por Lowry et al. (1951). Como control negativo se tomó una porción de un fémur no afectado también de Aguazuque y se sometió al mismo procedimiento antes descrito.

Cada uno de los extractos proteicos, tanto del fémur afectado como del no afectado, se mezclaron independientemente con adyuvante completo de Freund (ACF); 100 µg de extracto con 250 µl de ACF, esta mezcla se inoculó en ratones suizos de 20 g de peso en promedio, 5 animales para el inóculo obtenido a partir del hueso afectado y 5 animales con extracto antigénico de hueso normal. La inoculación se hizo por vía intradérmica (i.d.). Las inmunizaciones subsecuentes, 3 en total, se hicieron preparando los extractos con adyuvante incompleto de Freund y también por vía intradérmica. Todos los ratones fueron sangrados antes de la primera inmunización y finalmente a los ocho días después de la última inoculación. Los sueros se colectaron y se almacenaron a - 70°C hasta su uso.

Prueba Inmunológica

El FTA-ABS se llevó a cabo de la siguiente manera: 20 microlitros de medio absorbente para FTA-ABS (Biomerieux, Francia) fueron colocados sobre un pozo de placa para microtitulación (ICN - Flow U.S.A.) y se le añadió 5 µl de antisuero. De esta dilución se tomaron 10 µl y se colocaron sobre placas para inmunofluorescencia previamente sensibilizadas con *Treponema pallidum* (Biomerieux, Francia) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en una cámara húmeda.

Las placas se lavaron con PBS y se les colocó 10 µl de conjugado, gama globulina (IgG) anti-ratón acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma F-

8264) la mezcla se incubó durante otros 30 minutos a 37 °C. Después de varias lavadas con PBS, las placas se secaron, se cubrieron con glicerol al 10% y se leyeron en un microscopio de fluorescencia.

Resultados

- Contexto Arqueológico

Los descubrimientos arqueológicos en Aguazuque reflejan una economía basada en la caza, recolección y pesca.

Predominan los huesos de venados de cola blanca - (*Odocoileus virginianus*), y se encontraron restos de otros animales incluyendo ratones - (*Sigmodon bogotensis*), zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), comadrejas (*Mustela frenata*), curíes (*Cavia porcellus*) y peces como capitán (*Eremophilus mutisii*) y guapucha (*Grundulus bogotensis*) así también como cangrejos de agua dulce (*Pseudothelphusidae*). Dentro de los restos de animales nativos de otras zonas climáticas se identificaron los siguientes: Pecarí (*Tayassu pecari*), caimán (*Crocodylus intermedius*) y ostras (*Unio pictorum*), además de algunas especies adicionales de peces que no han sido identificadas todavía.

Los elementos fabricados en piedra encontrados corresponden en términos generales a la tradición Abriense ya descrita por Hurt y colaboradores, (1976), para la sabana de Bogotá. El hecho de que sean relativamente raras herramientas como raspadores, indican un decline en la industria de piedra durante las parte o fase tardía del periodo precerámico. En contraste, la industria del hueso llega a ser más importante e incluye punzones, taladros, raspadores y cuchillas.

El complejo funerario en Aguazuque incluye entierros primarios simples, entierros dobles o colectivos y también de tipo secundario.

- Hallazgos patológicos en restos óseos

Una gran cantidad de huesos humanos fueron encontrados en la hacienda Aguazuque, algunos de ellos mostrando alteraciones sugestivas de infección por treponemas, particularmente sífilis.

Las principales características diagnósticas presentes son : Hiperostosis, osteoperiostitis gomatosas, caries sicca y obliteración esclerótica en la cavidad medular; características que se han asociado específicamente a infecciones por treponemas (Hackett, (1976). Steinbock, 1976.)

Un ejemplo representativo es un esqueleto de un hombre adulto, identificado con la serie 0614 A-ICNMHN, el cual muestra en el cráneo (Fig. 1) una caries sicca muy visible en el hueso frontal y los parietales izquierdo y derecho en la región bregmática.

Hay también lesiones avanzadas por treponematosis en los huesos largos. El húmero izquierdo presenta defectos cavitarios redondeados y periostitis tanto en la diáfisis como en la epífisis proximal, donde el epicóndilo está en estado de alteración avanzada debido a la forma-



Figura 1. Cráneo de 0614 A-ICNMHN con caries Sicca muy visible.

ción de una exostosis. En los restos del húmero derecho se presentan también las cavidades redondeadas y erosiones.

La ulna derecha tiene cavidades redondeadas y hiperostosis fusiforme, amplia erosión en la diáfisis y marcas conocidas como patrones en "senda de caracol"; sobre la ulna izquierda hay una periostitis aguda en la parte central de la diáfisis y múltiples erosiones lineales y cavidades.

Sobre el radio derecho encontramos periostitis aguda y cavidades que afectan, principalmente, los tercios inferiores y superiores de la diáfisis, sobre toda la superficie anterior y sobre el borde de la superficie posterior, donde se presentan además placas escleróticas. Un alto grado de periostitis y defectos rugosos redondeados se encuentran sobre la superficie anterior del fémur izquierdo, así también como lesiones gomatosas curadas.

Estos procesos patológicos, típicos de infección treponematósica avanzada, particularmente sífilis, se observan también en el fémur derecho, tibias, fíbulas, los calcáneos izquierdo y derecho, el primer metatarso y las costillas. Periostitis y defectos periostales redondeados pueden observarse también sobre las clavículas.

La distribución general de las lesiones sobre el esqueleto se muestran en la figura 2.

- Datación

Una muestra de hueso de este esqueleto, serie 06154 A-ICNMHN, fué datado un 5.030 ± 40 años antes del presente, empleando C14. Esto se hizo en el Gromingers C14 Laboratorium en Holanda.

- Pruebas Inmunológicas

Tradicionalmente, la identificación de infección por treponemas en restos de esqueletos humanos siempre se llevan a cabo por medio de detalladas descripciones a nivel paleopatológico y morfológico como las que hemos ya descrito para el esqueleto 0614 A-ICNMHN, y la discriminación entre enfermedades como Osteomielitis, enfermedad de Paget, osteoartropatía pulmonar, tuberculosis y sífilis endémica -Píán- las cuales también producen lesiones óseas, se basan en la intensidad y localización de las lesiones, haciendo que la diferenciación entre estas patologías sea difícil de llevar a cabo (Hackett, 1976).

La confirmación de sífilis en el esqueleto 0614 A-ICNMHN se efectuó a empleando la prueba conocida como prueba de anticuerpos fluorescentes anti-treponema

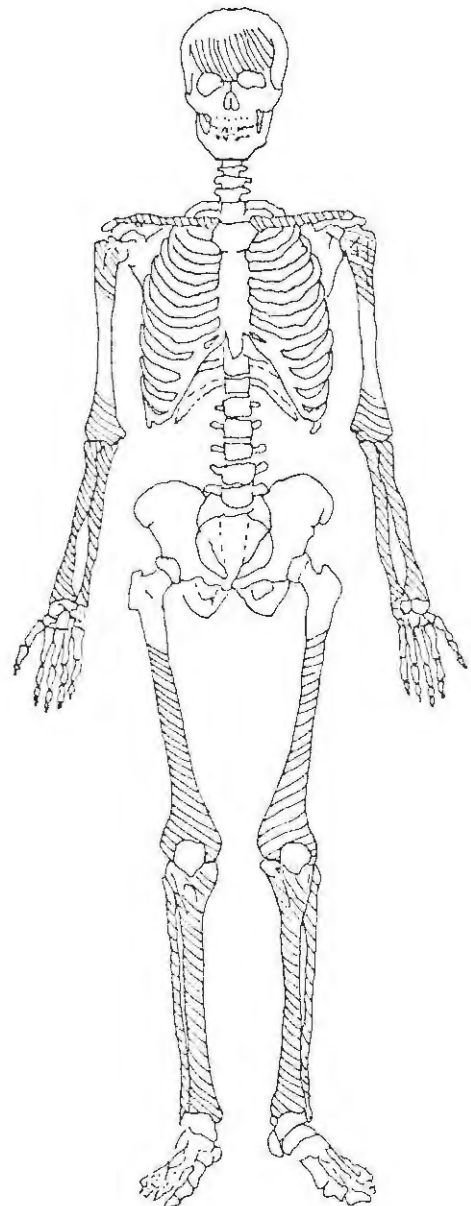


Figura 2. Distribución de lesiones óseas sobre esqueleto 0614- A-ICNMHN. Las líneas indican dónde se presentan lesiones sobre los huesos.

con suero (FTA-ABS) absorbido, la cual se realizó con antisueros policlonales hechos en ratones contra extractos antigénicos obtenidos a partir de un segmento de la parte medial del fémur derecho, el cual muestra las características patológicas típicas de treponematosi. Como control negativo, una prueba de FTA-ABS se llevó a cabo también con antisueros elaborados contra extractos antigénicos de un fragmento de la porción media de un fémur no afectado también de Aguazuque.

La tabla 1 muestra que el extracto antigénico elaborado a partir del hueso afectado es capaz de inducir un antisuero que posee anticuerpos que reaccionan con los treponemas, *Treponema pallidum* cepa Nichols, fijados a la placa de Inmunofluorescencia. Se generan entonces anticuerpos anti- *T. pallidum*, indicando la presencia de antígenos preservados de *T. pallidum* en estos huesos afectados.

De otra parte, no se observó ningún tipo de reacción de inmunofluorescencia cuando la prueba de FTA-ABS se llevó a cabo con el antisuero policlonal obtenido a partir del extracto antigénico de hueso normal no afectado (Ver tabla 1).

Tabla 1. Reactividad diferencial de antisueros elaborados empleando extractos antigénicos de huesos afectados y no afectados de Aguazuque. Convenciones, R: Reactivos, NR: No reactivos, ND: No hecho.

GRUPO A		GRUPO B	
animal No	FTA-ABS	animal No	FTA-ABS
1	R	1	NR
2	R	2	NR
3	ND	3	NR
4	R	4	NR
5	ND	5	ND

Discusión

Nuestro conocimiento acerca de las enfermedades asociadas con las poblaciones prehistóricas y de historia más reciente en el nuevo mundo, se derivan sustancialmente a partir de observaciones de características patológicas y demográficas en muestras de esqueletos (Steinbock, 1976 Ortner y Pustschar, 1981). Pero cabe anotar que hay muchas limitaciones asociadas con los diagnósticos basados en esqueletos, incluyendo i) la no afección de tejidos calcificados en la mayoría de las enfermedades y ii) la naturaleza convergente de los cambios patológicos en los esqueletos. Es por eso que se hace necesaria la aplicación de nuevos métodos de análisis a nivel molecular, consistentes en la detección de antígenos, anticuerpos y material genético en los restos óseos, pertenecientes o generados por los microorganismos o procesos patogénicos involucrados en la enfermedad.

El método que hemos desarrollado para la detección de antígenos, en este caso de *T. pallidum*, preservados en un esqueleto antiguo, es en esencia diferente a los otros aplicados para confirmación de treponematosi Tuross y Owsly, (1992) encuentran en un esqueleto (TO 2189) datado de 1240 años antes del presente, el cual presentaba periostitis particularmente en la tibia, un anticuerpo anti-Treponema fuertemente reactivo. Rothschild y Turnbull, (1987), emplean un antisuero policlonal estándar anti-sifilis, denominado 0099 obtenido del CDC de Atlanta (U.S.A), en un ensayo de inmunofluorescencia directo, con el fin de detectar antígeno preservados de *Treponema pallidum* en un oso del pleistoceno. Nuestro método consiste en la generación de anticuerpos tipo IgG anti-Treponema empleando los extractos óseos como antígenos; si hay en la muestra antígenos de *T. pallidum* preservados, estos inducirán la producción de anticuerpos específicos contra el treponema, los cuales podrán ser detectados mediante el uso de conjugados de antiinmunoglobulinas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en el FTA-ABS.

Este método permite la detección de una menor cantidad de antígenos presentes, pues aún con una concentración relativamente baja de antígeno (100 ug) se puede generar una respuesta de anticuerpos claramente evidenciable, cosa que es limitada con los métodos empleados por Tuross, (1991) y Rothschild, y Turnbull, (1987), los cuales requieren, el primero, de inmunoglobulinas preservadas y el segundo de grupos o agregados de restos bacterianos en los huesos.

Dada la naturaleza específica del FTA-ABS (Todd, Sanford Davidshon) y las características patológicas en los restos óseos 0614 A-ICNMHN de Aguazuque, podemos concluir que esto fué el resultado de una enfermedad sifilítica avanzada, específicamente sífilis venérea terciaria. Este diagnóstico se ve apoyado además por dos hechos que son los siguientes; primero, la Sabana de Bogotá no era una zona desértica ni árida hace 5000 años, las cuales son las condiciones usualmente asociadas con el desarrollo de sífilis endémica (bejel), la cual es también causada por *T. pallidum*, y que también resulta positiva por FTA-ABS. En segundo lugar, los registros de historia médica en Colombia no han reportado casos de sífilis endémica en la Sabana de Bogotá. Así, la sífilis venérea es el tipo más probable de treponematosi aplicable a los restos óseos humanos de la hacienda de Aguazuque.

Correal-Urrego (1990) ha puntualizado que la sabana de Bogotá fué habitada para la época precerámica por grupos de cazadores - recolectores, de aproximadamente 100 personas por banda, por lo cual la sífilis venérea pudo haberse desarrollado como el resultado de contactos sexuales frecuentes intra e intergrupales, los cuales mantendrían la infección entre la población.

Nuestros resultados corroboran los trabajos y conclusiones de Ortner y Pustschar, (1981), y Tuross y Owsley, 1992, sobre la presencia de la infección treponematósica dentro de las poblaciones precolombinas en América, e incluso amplían la visión del problema, al demostrarse un largo tiempo de residencia del *T. pallidum* en el nuevo continente.

Los nuevos métodos de antropología molecular, como el desarrollado en este trabajo, proveen útiles herramientas para la Paleopatología, debido a que permiten una confirmación de infección por treponema en restos óseos que presenten patrones patognomónicos e incluso típicos de treponematosi.

Además, individuos afectados en los cuales no se presenten manifestaciones óseas de la enfermedad, pueden ser determinados por medio de la reactividad inmunológica.

Bibliografía

- Correal - Urrego, G. 1990. Aguazuque Evidencias de cazadores recolectores y plantadores en la altiplanicie de la Cordillera Oriental. Fundación de Investigaciones Arqueológicas Nacionales. Banco de la República. Bogotá.
- Hackett, C.J. 1976. En Diagnostic Criteria of Syphilis, Yaws and Treponematosi and some other diseases in dry bones. Springer Verlag. Berlin.
- Hurt, W, Van der Hammen, T. & G. Correal, 1976. The El Abra Rockshelters. Sabana de Bogotá. Colombia. S.A. Occasional Papers and Monographs N° 2. Indiana University Museum. Bloomington. Indiana.
- Lowry O.H, Rosebrough, N.J., Farr A. L., & R.J. Randall 1951. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Ortner, D.J. & W.G.J. Putschar. 1981. Identification of pathological Conditions in Human Skeletal Remains. Washington, D.C: Smithsonian Institution Press.
- Rothschild, B. & W. Turnbull. 1987. Treponematosi in a Pleistocene Bear. Nature 329:61-62.
- Steinbock, R.T. 1976. Paleopathological Diagnosis and Interpretation. Springfield. IL: Charles Thomas.
- Todd - Sanford - Davidsohn. 1984. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el Laboratorio. Ed. John Bernard Henry. 7a edición. tomo II. Salvat editores. Barcelona.
- Tuross, N. 1991. Recovery of bone and serum proteins from human skeletal tissue: IgG, osteonectin, and Albumin. In Human Paleopathology: Current Syntheses and future options, D.J. Ortner and A.C. Aufderheide, eds. Washington D.C: Smithsonian Institution Press, 51-54.
- Tuross, N., & D.W. Owsley. 1992. Molecular presentation in ancient North American human bone (abs) AM.J. Phys. Anthropol. (in Press).
- Van der Hammen, T. & E. Gonzalez. 1963. Historia del clima y vegetación del pleistoceno superior y el holoceno de la Sabana de Bogotá. Bol. Geol. XI:1-3.