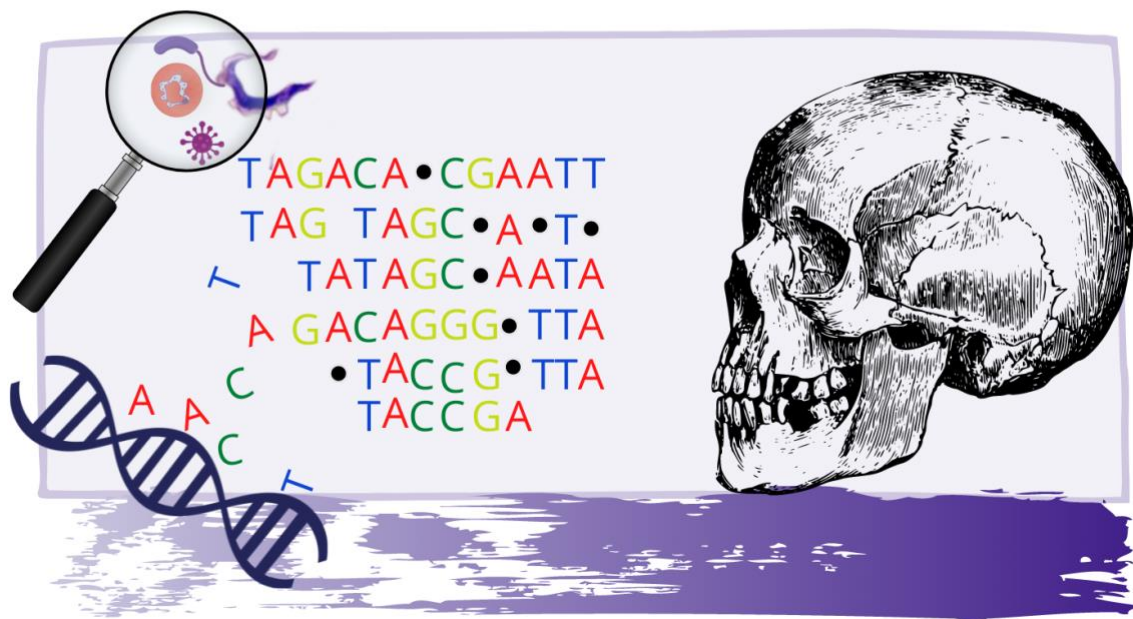


La paleogenómica en el estudio de las enfermedades: avances y limitaciones



Alumna:

Suleyma Pérez Pérez

Tutores:

Rosa Irene Fregel Lorenzo

Javier González Serrano

**Máster en Investigación y Diagnóstico
de Enfermedades Tropicales
Curso 2020-2021**

LA PALEOGENÓMICA EN EL ESTUDIO DE LAS ENFERMEDADES: AVANCES Y LIMITACIONES	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	7
LA PALEOGENÓMICA EN EL ESTUDIO DE PATÓGENOS Y SUS LIMITACIONES	7
<i>YERSINIA PESTIS</i>	10
<i>PLASMODIUM SP.</i>	13
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	17

Resumen

En la última década, la implementación de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha producido un avance notable en los estudios de ADN antiguo. Esta mejora metodológica ha permitido, por primera vez, obtener información fiable sobre los agentes infecciosos causantes de brotes epidémicos del pasado, además de ofrecer una oportunidad única para revelar linajes microbianos hasta ahora desconocidos. Poner en contexto el estudio de genomas de patógenos antiguos en una escala cronológica es importante para desentrañar la historia evolutiva de las enfermedades, y cómo éstas han influido en la historia de la Humanidad. En los últimos años se han publicado numerosos trabajos sobre el estudio a escala genómica de patógenos antiguos (bacterias, virus y patógenos protozoarios) que han aportado información valiosa al estudio de la transmisión de agentes infecciosos. Dada su relevancia en la actualidad, en este trabajo se hará una revisión bibliográfica de los análisis de patógenos recuperados de restos antiguos a través de técnicas paleogenómicas. Para ello, se examinarán los estudios paleogenómicos de dos de los agentes infecciosos con mayor relevancia de los últimos tiempos. Por una parte, se analizará el agente etiológico de la peste bubónica, *Yersinia pestis*, un patógeno que ha provocado varias pandemias a lo largo de la historia de la humanidad. Por último, se examinarán los últimos estudios de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, ambos patógenos causantes de la malaria, presentes en Europa hasta mediados del siglo XX, y aún problemáticos en gran parte de América, África y Asia en la actualidad.

Abstract

In the last decade, the implementation of next-generation sequencing technologies has produced a remarkable advance in ancient DNA studies. This methodological improvement has made it possible, for the first time, to obtain reliable information on the infectious agents that cause epidemic outbreaks in the past, as well as offering a unique opportunity to reveal unknown microbial lineages. Contextualizing the study of ancient

pathogen genomes on a time scale is important to unraveling the evolutionary history of diseases, and how they have influenced human history. In recent years, numerous studies have been published on the genomic-scale analysis of ancient pathogens (bacteria, viruses and protozoan pathogens) that have provided valuable information on the transmission of infectious agents. Given its relevance today, the this work will focus on performing a bibliographic review of the paleogenomic analyses of pathogens recovered from ancient remains. For that, we will examine the palaeogenomic characterization of two of the most relevant infectious agents in recent times. First, we will review the etiological agent of the bubonic plague, *Yersinia pestis*, a pathogen that has caused several pandemics throughout human history. Second, we will examine the latest studies of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*, both pathogens that cause malaria, present in Europe until the middle of the 20th century, and still problematic in much of America, Africa and Asia nowadays.

Introducción

Mirar al pasado en el estudio de las enfermedades infecciosas puede mejorar nuestra comprensión de los patógenos emergentes en la actualidad, así como entender los cambios ambientales que provocan la aparición de nuevas enfermedades emergentes^{1,2}. Inicialmente, el estudio de la paleopatología se abordaba exclusivamente con la revisión de textos antiguos o la observación de señales de la enfermedad en restos óseos o tejidos momificados³⁻⁵. En la actualidad, estos estudios se han visto complementados con el análisis del ADN conservado en restos antiguos mediante la utilización de técnicas paleogenómicas^{1,6,7}. Esta ciencia reconstruye y analiza el material genético de organismos que murieron hace cientos o miles de años, el denominado ADN antiguo (ADNa). En la última década, el campo del ADNa ha sufrido grandes avances metodológicos que han permitido la reconstrucción casi completa de genomas antiguos^{6,8}. Gracias a la implementación de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés *Next-Generation Sequencing*), actualmente se dispone de un marco de estudio para comprender la relación histórica entre la infección y el hombre^{1,6,9}. Además, permite reconstruir las relaciones evolutivas entre especies, así como deducir tiempos de divergencia a través del reloj molecular^{8,4}. Esto, junto con la obtención de información del contexto arqueológico o dataciones por radiocarbono de restos asociados, ayudan a obtener una aproximación precisa del acontecimiento histórico real^{6,10}. Entre los trabajos en patógenos antiguos más relevantes se destaca el descubrimiento de ADNa de una bacteria del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* hallada en una momia precolombina del sur de América. Este hallazgo apunta a un origen zoonótico independiente de la tuberculosis en el Nuevo Mundo, previo a la llegada de los colonos europeos¹¹. Aunque los estudios de ADNa bacteriano son más comunes, la extracción de ADNa vírico es igualmente posible, como demuestra el descubrimiento de restos de ADNa del virus de la Hepatitis B (HBV) en un individuo del siglo XVI^{6,12}.

Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa en los años 80s (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase chain reaction*) y, posteriormente, con la implementación de las tecnologías NSG se ha logrado un gran avance en los estudios de genomas antiguos^{1,7,8,13}. El desarrollo de la PCR permitió la obtención de varias copias de ADN a partir de muestras con escaso contenido en ADN, como ocurre con los restos arqueológicos^{7,8}. Más tarde, con la implementación de las NGS ha sido posible, no solo

la mejora de la calidad de lectura, sino la reducción de costo y tiempo de secuenciación, favoreciendo la obtención de genomas de mayor cobertura. Esto ha permitido que, junto al perfeccionamiento de las técnicas de extracción de ADN, se pueda recuperar y leer de forma fiable el material genético altamente degradado^{8,14,15}.

Sin embargo, debido a los procesos de degradación de la materia orgánica, el ADN conservado en restos antiguos sufre procesos de modificación causados por hidrólisis u oxidación, que se acumulan a lo largo del tiempo. Estas modificaciones se observan en el ADN como patrones de daño *post mortem* (PMD, por sus siglas en inglés *post-mortem damage*)^{16,17}. Destacamos dos características principales de PMD: la fragmentación de las cadenas de ADN y la desaminación de citosinas. La primera es consecuencia de la escisión hidrolítica del enlace β -N-glucosídico entre la base y la desoxirribosa. Esta depurinación genera un sitio abásico, dando lugar a la posterior rotura de la hebra de ADN, normalmente en fragmentos de menores de 100 pares de bases (pb)^{18,17}. Estas lesiones oxidativas constituyen un obstáculo para la PCR, generando secuencias quiméricas mediante el fenómeno de “salto de PCR”. A ello, se le añaden los enlaces cruzados que se generan entre moléculas, causantes del bloqueo de la amplificación^{9,16,18,19}. Por otro lado, la desaminación de citosinas constituye la pérdida del grupo amino predominantemente en los extremos de las hebras, provocando la lectura de estos como timinas por la ADN polimerasa e introduciendo mutaciones C>T en las secuencias de ADN^{9,17}. La alta fragmentación del ADN y la sobrerrepresentación de las transiciones de C>T y G>A que producen las desaminaciones, constituye una problemática en la utilización de la PCR que, sin embargo, se solventan en las plataformas NGS⁹.

Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es hacer una revisión bibliográfica acerca del estudio de patógenos antiguos a través de la paleogenómica. Esta fuente de información puede resultar de utilidad para comprender las grandes catástrofes epidémicas a lo largo de la historia de la humanidad, teniendo presente el actual contexto pandémico que estamos viviendo con el SARS-CoV-2. Además, se discutirán las limitaciones de esta técnica en el estudio de enfermedades infecciosas.

Como objetivos específicos, se examinará la información recabada relacionada con el análisis paleogenómico de enfermedades infecciosas como la peste, causada por el patógeno *Yersinia pestis*, y la malaria, originada por especies del género *Plasmodium*.

Material y métodos

La recopilación bibliográfica de este trabajo fue llevada a cabo usando tres bases de datos distintas: PubMed²⁰, el punto Q de la Universidad de La Laguna²¹, y el sitio web de ScienceDirect²². El compendio bibliográfico fue llevado a cabo entre el 22 de diciembre del 2020 y el 12 de mayo del 2021.

<u>Palabras clave 1</u>	<u>Palabras clave 2</u>	<u>Palabras clave 3</u>
<i>Paleogenomics</i>	<i>Next-generation sequencing</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Ancient DNA</i>	(NSG)	<i>Plasmodium spp.</i>
<i>Mummified remains</i>	<i>High throughput sequencing</i>	<i>Epidemic</i>
<i>Historical specimen</i>	(HTS)	<i>Infectious disease</i>
		<i>Pathogens</i>

Tabla 1. Combinación de palabras claves usadas en la revisión bibliográfica.

El método de búsqueda empleado fue el rastreo de palabras clave y sus combinaciones, recogidos en la **Tabla 1**. Basamos nuestro criterio de inclusión en la selección de estudios que hayan empleado tecnologías NSG para el análisis del ADN de enfermedades infecciosas.

Resultados

La Paleogenómica en el estudio de patógenos y sus limitaciones

Existen numerosas fuentes de las cuales extraer ADN microbiano dependiendo del tipo de infección que provoque (**Figura 1**)⁷. Por una parte, el ADN de un patógeno que provoca una infección local puede detectarse en la zona afectada. Este es el caso de *M. tuberculosis*, que ha podido recuperarse de restos de pleura calcificada o huesos afectados^{11,23}. Cuando la infección se descontrola y se produce una bacteriemia, el ADN

del microorganismo puede llegar a detectarse en zonas que en vida estuvieron altamente vascularizadas y que, por su naturaleza, conservan bien el ADN en su interior, como la pulpa dental²⁴. De la misma forma, es posible reconstruir toda una comunidad microbiana de aquellos tejidos que en vida tuvieron un microbioma propio y que se hayan conservado en el registro arqueológico. Este es el caso del sarro dental calcificado (cálculo dental) que permite estudiar el microbioma oral del individuo²⁵; o las heces fosilizadas (coprolitos), que permiten reconstruir el microbioma intestinal del individuo en el momento de su deposición²⁶.

La obtención del ADN del patógeno va a depender directamente de su conservación en el resto. Esto es, por un lado, de las condiciones ambientales en las que el resto se encuentra y, por otro, de la cantidad de ADN que, de forma azarosa, se conserva. Esto repercute indudablemente en la escasa representación del ADN endógeno del patógeno, que habitualmente no supera el 0.01% del total del ADN secuenciado. A pesar de todo esto, el ADN microbiano extraído es mayoritario puesto que, junto con el patógeno, existen otros microorganismos: aquellos propios del resto (microbioma), aquellos que lo han colonizado el resto *post mortem* (contaminación ambiental) o restos de ADN contaminante que pueda encontrarse en los reactivos del laboratorio^{9,27}. Esto, unido a las dificultades bioinformáticas de asignación de especies a partir de ese escaso ADN secuenciado, hace necesario que se requiera previamente de documentación histórica en la que se sospeche la presencia del patógeno de interés o evidencias paleopatológicas⁶.

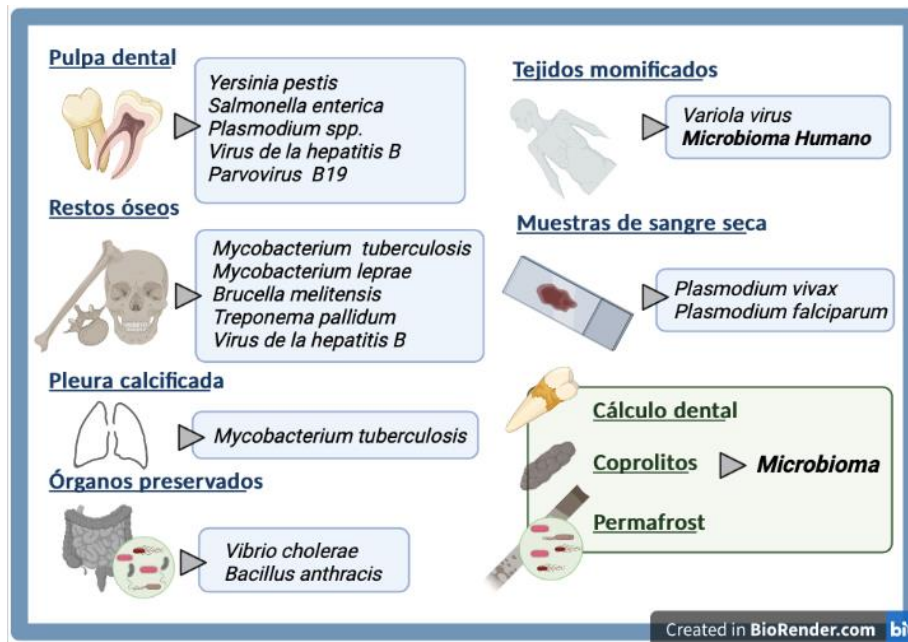


Figura 1. Localizaciones de los que se ha extraído ADN de microorganismos antiguos. En azul se muestran aquellos restos de los que se ha extraído ADN de patógenos concretos y en verde los restos de los que se ha recuperado ADN de la comunidad microbiana al completo.

Igualmente, hay que tener en cuenta el alto riesgo de contaminación con ADN ambiental o debido a la manipulación por el propio experto. Por ello, este es un factor que las técnicas paleogenómicas tienen en cuenta en sus criterios de validación (desaminación, depuración, longitud de lectura, cobertura y distancia de edición)^{9,15}.

Los estudios filogenéticos realizados con datos paleogenómicos se ven dificultados por la baja cobertura de los genomas antiguos y el patrón de daño en el ADN. Por ejemplo, en el análisis de variantes de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), el tipo de variación molecular más utilizado para este tipo de estudios, las transiciones C>T y G>A pueden deberse a una desaminación por PMD¹⁵. Este tipo de mutaciones pueden llegar a provocar la falsa identificación de especies cuando estas están muy relacionadas^{28,29}. Por otro lado, la baja cobertura normalmente obtenida para los genomas antiguos puede provocar la ausencia de información sobre genes clave para identificar la patogenicidad del patógeno^{1,6,7}.

Los análisis filogenéticos requieren de una serie de premisas o modelos que se asumen para la creación de un árbol filogenético^{30,31}. Debido a la propia naturaleza del ADN y a la baja cobertura de secuenciación se pueden dar diferentes topologías e incluso la incapacidad de resolver relaciones evolutivas entre el grupo. Se hace necesaria la

cautela para la interpretación de resultados, a pesar de la existencia de herramientas bioinformáticas que contribuyen a dar una confianza estadística a los estudios filogenéticos^{1,28,32}.

Las limitaciones antes mencionadas para el análisis filogenético, también constituye un desafío en la datación molecular. Esta nos proporciona información acerca del origen, la propagación de la enfermedad y su evolución en un amplio espacio de tiempo. Estos análisis pueden apoyarse en la información arqueológica proporcionada, así como la datación por radiocarbono^{6,33,34}.

Yersinia pestis

La peste es una enfermedad infecciosa cuyo agente causal es *Yersinia pestis*. Esta bacteria Gram negativa provoca una enfermedad zoonótica que ha causado numerosos brotes pandémicos a lo largo de la historia de la humanidad^{10,35}. Se han documentado tres grandes pandemias: la plaga de Justiniano (desde el siglo VI al VIII), la plaga medieval (desde XIV hasta XVIII) y la última desde el siglo XIX hasta la actualidad, donde su mayor impacto lo tiene en países en vías de desarrollo^{35,36}.

La infección se produce por la picadura del vector, la pulga de la rata (*Xenopsylla cheopis*), a un huésped. La picadura provoca la regurgitación del contenido intestinal de la pulga, donde se encuentra la bacteria. Las bacterias liberadas provocan una infección en el sitio de la picadura hasta alcanzar los ganglios linfáticos, que se inflaman dando lugar a los característicos bubones, con el posterior empeoramiento septicémico. Por otro lado, la transmisión de un huésped a otro puede ocurrir por inhalación del patógeno por contacto cercano con un individuo infectado, induciendo la llamada peste neumónica primaria³⁷.

Hay estudios que sugieren un origen para la peste desde la Edad del Bronce (3.300 - 1.200 a. C.)^{38,39}. Dentro de este trabajo, se han seleccionados los estudios más recientes de periodos y localizaciones geográficas distintas (**Tabla 2**). Se han recopilado los cinco estudios más recientes que aportan nuevos genomas de *Y. pestis*. Todos los genomas han sido extraídos de la pulpa dental y analizados filogenéticamente teniendo en cuenta genomas antiguos y modernos de *Y. pestis*. Además, en todos los casos, se ha utilizado a *Y. pseudotuberculosis* como grupo externo^{29,39-42}. Los resultados más notables se engloban en la **Tabla 3**.

<i>Estudio</i>	<i>Localización y nº genomas de Y. pestis</i>	<i>Época</i>
<i>Spyrou et al. 2018</i>	2 genomas de <i>Y. pestis</i> extraídos de dientes de nueve individuos excavados en Samara (Rusia).	Finales de la Edad de Bronce
<i>Rascovan et al. 2019</i>	1 genoma de <i>Y. pestis</i> extraído del diente de un individuo (Gok2) en Frälsegården (Suecia).	Finales del Neolítico
<i>Spyrou et al. 2019</i>	34 genomas detectados de <i>Y. pestis</i> : 206 dientes de 9 localidades de enterramientos colectivos, dobles o triples, o individuales de cementerio. <ul style="list-style-type: none"> - Inglaterra (5 genomas detectados) - Francia (1 genomas detectados) - Alemania (11 genomas detectados) - Rusia de entierros triples (2 genomas detectados) - Suiza (15 genoma detectado) 	s. XIV – XVII
<i>Keller et al. 2019</i>	8 genomas detectados de <i>Y. pestis</i> en 171 dientes de 122 individuos de 20 yacimientos: <ul style="list-style-type: none"> - Gran Bretaña: Cementerio anglosajón (1 genoma detectado) - Francia: Cementerio medieval temprano (2 genomas detectado) - Alemania: Cementerio medieval temprano (4 genomas detectado) - Austria: Cementerio medieval temprano (sin casos de <i>Y. pestis</i> detectados) - España: Cementerio extramuros visigodo (1 genoma detectado) 	s. VI – VIII
<i>Guellil et al. 2020</i>	9 genomas de <i>Y. pestis</i> : de dientes de 24 individuos <ul style="list-style-type: none"> - Italia: Cementerio medieval (1 individuo). - Italia: Entierro múltiple (6 individuos). - Suecia: Cementerio de peste (1 individuo). - Rusia: Colección antropológica de cráneos (1 individuo). 	s. XIV – XVIII

Tabla 2. Estudios paleogenómicos en los que se han reconstruido genomas de *Yersinia pestis*.

<i>Estudio</i>	<i>Resultados</i>
<i>Spyrou et al. 2018</i>	Reconstrucción de una cepa de <i>Y. pestis</i> encontrada en dos individuos de 3800 años que parece provenir de una cepa ancestral de ~4000 años de antigüedad. La cepa secuenciada RT5 se sitúa en la base de una politomía que probablemente pudo dar lugar a tres linajes, dos de los cuales persisten en la actualidad (linajes de la plaga Justiniana y de la peste negra). Ya en este periodo, las cepas de <i>Y. pestis</i> tenían capacidad zoonótica (presencia del gen <i>ymt</i>).
<i>Rascovan et al. 2019</i>	Presencia de <i>Y. pestis</i> en el individuo "Gökhem2" (Gok2) de finales del Neolítico (9000-6000 a.C.). El análisis filogenético sitúa a la cepa Gok2 en ramas basales con respecto a las demás <i>Y. pestis</i> incluidas en el análisis. Además, resultó tener 4 variantes simples de un nucleótido (SNV) localizados en genes relacionados con procesos de interacción huésped-patógeno. El linaje Gok2 no está representado en cepas modernas.
<i>Spyrou et al. 2019</i>	Reconstrucción de varios genomas de <i>Y. pestis</i> encontrada en individuos de 1346–1353 d.C. De ellos, la cepa encontrada en Laishevo parece ser la más ancestral de la segunda ola pandémica en época medieval. Las cepas de New Churchyard (BED) y Marseille (OBS) carecen de los genes transportadores de magnesio <i>mgtB</i> y <i>mgtC</i> , así como la cepa Cambridge (NMS002) que carece del gen <i>inv</i> .
<i>Keller et al. 2019</i>	Todos los genomas antiguos de <i>Y. pestis</i> de este trabajo pertenecen a la denominada plaga Justiniana. El genoma británico de Edix Hill contiene un SNP ancestral al resto de los genomas recuperados en este trabajo. Las cepas francesas mostraron una delección de una región que contenía dos genes asociados a factores de virulencia en ADN cromosómico (<i>mgtB</i> y <i>mgtC</i>).
<i>Guellil et al. 2020</i>	Los genomas antiguos de este trabajo posicionan a <i>Y. pestis</i> dentro del clado de la segunda plaga pandémica (desde XIV hasta XVIII). Los autores proponen múltiples olas de peste provenientes de un único reservorio principal situado fuera de Europa Occidental. Los genomas de las cepas de Italia (SPN) apuntan a un origen Euroasiático. Por otro lado, las cepas de Suecia (PEB10) y Rusia (CHE1), forman un grupo de tres brotes epidémicos diferentes junto con otra muestra de Francia (OBS). Las cepas rusas parecen las causantes del último brote final de la segunda plaga. Tanto las cepas francesas como las rusas carecen de los genes de virulencia <i>mgtB</i> y <i>mgtC</i> .

Tabla 3. Análisis planteados y resultados de los diferentes estudios de paleogenómica sobre *Y. pestis*.

Según los estudios anteriores se evidencian infecciones por *Y. pestis* desde finales del Neolítico⁴⁰. Los autores sugieren que formas más ancestrales del patógeno pudieron ser menos eficaces en cuanto a la transmisión. Sin embargo, ya a finales de la edad de Bronce este patógeno tenía capacidad de transmitirse por pulgas entre roedores y humanos³⁹. Estos dos trabajos parecen evidenciar una continuidad del patógeno *Y. pestis* desde el Neolítico hasta la actualidad. Por otro lado, Keller et al²⁹ sitúan ocho genomas de *Y. pestis* de su estudio en el periodo de la plaga Justiniana (desde el siglo VI al VIII), junto a otros genomas antiguos de dicho periodo de Alemania. No obstante, el genoma de la cepa británica de la plaga Justiniana parece indicar un brote diferente al del resto del genoma de este estudio²⁹. Se evidencia que las cepas francesas de dicho estudio muestran una delección que engloba una serie de genes implicados en la invasión celular y el crecimiento intracelular. Curiosamente esta variante está presente en cepas modernas, y ausentes en genomas secuenciados de la segunda ola pandémica^{29,42}. En cuanto a los estudios que abarcan los siglos XIV- XVIII, se han publicado 43 genomas de *Y. pestis* de varios individuos europeos pertenecientes a la segunda ola pandémica del periodo medieval^{41,42}. La cepa encontrada en Laishevo (Rusia) pertenece a un linaje ancestral del que parecen derivar las cepas de individuos europeos afectados por la peste negra entre los siglos XIV – XVIII⁴¹. Los últimos estudios realizados con genoma antiguo de *Y. pestis*, señalan a múltiples olas de la peste, posiblemente del mismo reservorio animal localizado fuera de Europa. Para las cepas del brote italiano se indica un posible origen euroasiático. También señala la posibilidad de que el último brote de la plaga medieval transcurriera en Rusia⁴².

Plasmodium sp.

Las especies del género *Plasmodium* han sido menos estudiadas haciendo uso del análisis de ADN que *Y. pestis*. *Plasmodium* es un género de protistas que incluye varios agentes causales de la malaria. De este género destacamos *Plasmodium falciparum*, transmitido a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*, que causa el 99% de las muertes de malaria a nivel mundial. Junto a él, *Plasmodium vivax*, que representa el agente causal de la malaria más importante fuera de África⁴³.

Actualmente se han publicado dos estudios de ADN de especies de *Plasmodium*. En concreto, estos trabajos han analizado los agentes causales de la malaria en el sur de Europa, donde fue una enfermedad endémica hasta mediados del siglo XX, tras lo cual

fue erradicada en toda la región. En el estudio de de-Dios et al. (2019) se consiguió reconstruir un genoma de *P. falciparum*, a partir de colecciones de muestras de sangre de España de los años 1940⁴⁴. Por otra parte, van Dorp et al.⁴⁵ obtuvieron genomas de *P. vivax* en las mismas preparaciones de sangre del trabajo anterior. La colección contiene muestras de pacientes confirmados con malaria en el Delta del Ebro (España) entre 1942 y 1944, muchos de ellos con confección de ambos *Plasmodium*^{44,45}. En la **Tabla 4** se muestran los análisis realizados y los resultados obtenidos en ambos estudios.

El estudio realizado sobre las cepas de *P. falciparum* del Delta del Ebro evidencia mayor cercanía con las muestras contemporáneas del centro y sur de Asia. Esto parece evidenciar de un posible origen de la malaria en Europa relacionados con eventos migratorios del continente asiático⁴⁴. El análisis de van Dorp et al. (2020) arroja luz sobre la introducción de *Plasmodium vivax* en las Américas y sobre la presencia o ausencia de genes de resistencia a fármacos o implicados en la capacidad patogénica del propio parásito⁴⁵. Además, coincide con estudios previos que apoyan la relación entre las cepas de *P. vivax* europeas extintas y las actuales en América Central y Sur⁴⁶. Ambos estudios evidencian el uso de colecciones antiguas como una herramienta útil para inferir en la demografía y la evolución de un patógeno que, aunque está extinto en Europa, en la actualidad, sigue siendo un grave problema sanitario en países en vías de desarrollo.

<i>Estudio</i>	<i>resultado</i>
<i>de-Dios et al</i> 2019	<p>La cepa Ebro-1944 de <i>P. falciparum</i> comparte más haplotipos con cepas del centro y sur de Asia en relación con África. Todas las muestras analizadas contienen la misma cepa de <i>P. falciparum</i>. El ADNmt muestra dos sustituciones específicas de cepas de la India, y una tercera que se comparte con muestras indias y africanas contemporáneas.</p> <p>Se encontraron dos variantes asociadas al gen <i>pfmrp1</i> de resistencia a la cloroquina, quininas, artemisininas, etc.</p>
<i>van Dorp et al</i> 2020	<p>La muestra Ebro-1944 de <i>P. vivax</i> comparte significativamente más alelos con cepas americanas (central y sur) que con cepas sudeste y este de Asia (agrupamiento con muestras de Perú y Brasil). La ascendencia de las muestras del Ebro-1944 está modelada principalmente por los tres componentes identificados en el grupo de América del Sur (56% de similitud con cepas de Colombia y 22% con cepas Perú), de América Central (12% con cepas de México) y, por último, con un 5% de ascendencia compartida con el Sudeste Asiático y 5% con Oceanía. Ebro-1944 se sitúa en una posición basal al clado de las cepas de México y Colombia, compartiendo un ancestro común. También se infirió que el genoma de las preparaciones Ebro-1944 comparte un ancestro común con cepas Sudamericanas que datan entre los siglos XVIII y XIX (media 1415; HPD 95%; 1201-1877 CE).</p> <p>Las cepas de <i>P. vivax</i> encontradas contienen mutaciones que confieren resistencia a determinados fármacos, así como variantes relacionadas con la evasión del sistema inmune y la infectividad al huésped Ebro-1944 porta alelos derivados de 3 SNPs ubicados en genes de resistencia a antimaláricos: dos de ellos en el gen <i>pvm-dr1</i>, relacionado con la resistencia a la cloroquina y la otra relacionada con el gen <i>pvdhps</i> de resistencia a la sulfadoxina. Además, se detectó una mutación en el gen <i>CLAG</i> relacionado con infectividad del huésped.</p>

Tabla 4. Análisis y resultados de los estudios paleogenómicos sobre *Plasmodium spp.*

Discusión

Las principales limitaciones de la paleogenómica en el estudio de enfermedades se relacionan principalmente con dos aspectos. El primero de ellos se debe a la dificultad para recuperar genomas de patógenos antiguos, lo que hace que la mayoría de estudios se basen en un bajo número de muestras. Por otro lado, la presencia de daño químico en los

genomas antiguos provoca que el análisis de los datos sea extremadamente complejo. Por lo tanto, los resultados de este tipo de estudios deben ser interpretados con cautela. Sin embargo, el incremento del número de trabajos publicados de patógenos antiguos, han promovido un aumento de la información disponible sobre epidemias del pasado, generando cada vez una imagen más clara de su origen y evolución.

Uno de los ejemplos clave de los avances de la paleogenómica ha sido el rastreo del origen de *Yersinia pestis* hasta el Neolítico, un periodo prehistórico del que no existe ninguna documentación. Además, se ha evidenciado la evolución de los genes que influyen en los procesos de transmisión de un patógeno a través de su vector o de su patogenicidad a lo largo del tiempo. Además, el análisis de cepas extintas de *Plasmodium* demuestra que la paleogenómica es una herramienta de utilidad para comprender cómo ciertos eventos migratorios han contribuido a la dispersión de un agente infeccioso: la presencia de *Plasmodium vivax* en América como resultado del colonialismo europeo o la relación entre cepas europeas de *P. falciparum* y las de Asia.

Se nos presenta ante nosotros una situación de incertidumbre relacionada con el cambio climático y la globalización, en la que las enfermedades pueden dispersarse por todo el mundo debido al aumento de las temperaturas o por procesos migratorios. La paleogenómica aporta una mejor comprensión del pasado de las enfermedades infecciosas que aún tienen impacto en la actualidad. Conocer el cambio en el bagaje genético de un patógeno, incluyendo aspectos de farmacorresistencia o virulencia, puede contribuir a diseñar una mejor gestión de enfermedades infecciosas en el presente. Con la mejora de las técnicas de laboratorio para obtener ADN altamente degradado y el desarrollo de herramientas bioinformáticas cada vez más precisas, anticipamos que las aportaciones de la paleogenómica sean cada vez más importantes al estudio de la transmisión de enfermedades.

Conclusiones

- Los estudios en paleogenómica revisados en este trabajo demuestran la dificultad de realizar los análisis genómicos debido a la presencia de daño *post mortem* y a la escasez de ADN patogénico en muestras antiguas.
- Los trabajos realizados en patógenos como en *Yersinia pestis* y el género de *Plasmodium* ejemplifican el potencial que tienen los estudios de enfermedades del pasado.
- Los resultados de los análisis paleogenómicos en *Y. pestis* evidencian la presencia de una cepa ya extinta a finales del Neolítico, mientras que a finales de la Edad del Bronce ya aparecen cepas con capacidad de transmisión zoonótica.
- Los datos genómicos de cepas de *Y. pestis* en épocas históricas (VI-XVIII) evidencian la ausencia de genes relacionados con la patogenicidad (*mgtB* y *mgtC*).
- Los resultados de los análisis paleogenómicos en *P. falciparum* del Delta del Ebro demuestran la similitud de cepas extintas en Europa con muestras contemporáneas del centro y sur de Asia, mientras que muestran mayor cercanía a cepas de América, señalando a un origen europeo para éstas.
- El estudio de ambos géneros de *Plasmodium* evidencian la presencia de genes relacionados con la resistencia a fármacos antipalúdicos como la cloroquinina, quininas, artemisininas (gen *pvmdr1*) y/o sulfadoxina (gen *pvdhps*).

Bibliografía

1. Bos, K. I. et al. Paleomicrobiology: Diagnosis and Evolution of Ancient Pathogens. *Annual Review of Microbiology* **73**, 639-666 (2019).
2. Sánchez-González, M.A. Historia y futuro de las pandemias. *Revista médica clínica Las Condes* **32**, 0716-8640 (2021)
3. Angel J. L. History and development of paleopathology. *American journal of physical anthropology* **56**, 509–515 (1981)
4. Ortner D. J. What skeletons tell us. The story of human paleopathology. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* **459**, 247–254 (2011).

5. Ortner, D. in *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. (ed Ortner, D) 179-224 (Academic Press, USA, 2003).
6. Spyrou, M., Bos, K., Herbig, A. & Krause, J. Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research. *Nature Reviews Genetics* **20**, 323-340 (2019).
7. Arning, N. & Wilson, D. The past, present and future of ancient bacterial DNA. *Microbial Genomics* **6**, (2020).
8. Shapiro, B. & Hofreiter, M. A Paleogenomic Perspective on Evolution and Gene Function: New Insights from Ancient DNA. *Science* **343**, 1236573-1236573 (2014).
9. Lan, T. & Lindqvist, C. in *Paleogenomics Genome-Scale Analysis of Ancient DNA*. (eds Charlotte Lindqvist & Om P. Rajora.) 3-29 (Springer Nature, Canada, 2019).
10. Marciniak, S. & Poinar, H. N. in *Paleogenomics, Genomic-Scale Analysis of Ancient DNA*. (eds Charlotte Lindqvist and Om P. Rajora) 115-132 (Springer Nature, Canada, 2019).
11. Bos, K. et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* **514**, 494-497 (2014).
12. Patterson Ross, Z. et al. Correction: The paradox of HBV evolution as revealed from a 16th century mummy. *PLOS Pathogens* **14**, e1006887 (2018).
13. Mullis, K. & Faloona, F. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 335-350 (1987). doi:10.1016/0076-6879(87)55023-6
14. Margulies, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380 (2005).
15. Briggs, A. et al. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 14616-14621 (2007).
16. Mouttham, N., Klunk, J., Kuch, M., Fourney, R. & Poinar, H. Surveying the repair of ancient DNA from bones via high-throughput sequencing. *BioTechniques* **59**, (2015).
17. Sawyer, S., Krause, J., Guschanski, K., Savolainen, V. & Pääbo, S. Temporal Patterns of Nucleotide Misincorporations and DNA Fragmentation in Ancient DNA. *PLoS ONE* **7**, e34131 (2012).
18. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715 (1993).

19. Gilbert, M. et al. Characterization of Genetic Miscoding Lesions Caused by Postmortem Damage. *The American Journal of Human Genetics* **72**, 48-61 (2003).
20. PubMed. *PubMed* (2021). at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.
21. PuntoQ. *Ull.es* (2021). at <https://www.ull.es/servicios/biblioteca/servicios/puntoq>.
22. ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books. *Sciencedirect.com* (2021). at <https://www.sciencedirect.com>.
23. Chan, J. et al. Metagenomic Analysis of Tuberculosis in a Mummy. *New England Journal of Medicine* **369**, 289-290 (2013).
24. Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O. & Raoult, D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 12637-12640 (1998).
25. Warinner, C. et al. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nature Genetics* **46**, 336-344 (2014).
26. Tito, R. et al. Phylotyping and Functional Analysis of Two Ancient Human Microbiomes. *PLoS ONE* **3**, e3703 (2008).
27. Thomas P. Gilbert, M. et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science* **32**, 785-793 (2005).
28. Bos, K. et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature* **478**, 506-510 (2011).
29. Keller, M. et al. Ancient *Yersinia pestis* genomes from across Western Europe reveal early diversification during the First Pandemic (541–750). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 12363-12372 (2019).
30. Lees, J. et al. Evaluation of phylogenetic reconstruction methods using bacterial whole genomes: a simulation based study. *Wellcome Open Research* **3**, **33** (2018).
31. Tang, P. & Gardy, J. Stopping outbreaks with real-time genomic epidemiology. *Genome Medicine* **6**, (2014).
32. Xi, Z., Liu, L. & Davis, C. The Impact of Missing Data on Species Tree Estimation. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 838-860 (2015).
33. Duchêne, S. et al. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microbial Genomics* **2**, (2016).
34. Drummond, A. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 1185-1192 (2005).

35. Sanchez, J. OPS/OMS | Información general: Peste. *Pan American Health Organization / World Health Organization* (2021). at https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8933:2013-informacion-general-peste&Itemid=39837&lang=es
36. Barbieri, R. et al. *Yersinia pestis*: the Natural History of Plague. *Clinical Microbiology Reviews* **34**, (2020).
37. Perry, R. & Fetherston, J. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 35-66 (1997).
38. Rasmussen, S. et al. Early Divergent Strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 Years Ago. *Cell* **163**, 571-582 (2015).
39. Spyrou, M. et al. Analysis of 3800-year-old *Yersinia pestis* genomes suggests Bronze Age origin for bubonic plague. *Nature Communications* **9**, 2234 (2018).
40. Rascovan, N. et al. Emergence and Spread of Basal Lineages of *Yersinia pestis* during the Neolithic Decline. *Cell* **176**, 295-305.e10 (2019).
41. Spyrou, M. et al. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nature Communications* **10**, 1-13 (2019).
42. Guellil, M. et al. A genomic and historical synthesis of plague in 18th century Eurasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 28328-28335 (2020).
43. Paludismo. *World Health Organization* (2021). at <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
44. de-Dios, T. et al. Genetic affinities of an eradicated European *Plasmodium falciparum* strain. *Microbial Genomics* **5**, (2019).
45. van Dorp, L. et al. *Plasmodium vivax* Malaria Viewed through the Lens of an Eradicated European Strain. *Molecular Biology and Evolution* **37**, 773-785 (2019).
46. Gelabert, P. et al. Mitochondrial DNA from the eradicated European *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from 70-year-old slides from the Ebro Delta in Spain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 11495-11500 (2016).