



Departamento de Antropología  
Facultad de Ciencias Sociales  
Universidad de Chile

**Memoria para obtener el Título de Antropóloga Física**

**Análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de  
*Mycobacterium tuberculosis* para el diagnóstico de tuberculosis  
en muestras óseas de individuos de períodos arqueológicos y de  
individuos subactuales de Chile.**

**Estudiante:** Katya Teplizky

**Profesor Guía:** Dr. Mauricio Moraga

**Tutores:** Dr. Javier Echeverría y (c) Dr. Aryel Pacheco

Santiago, Chile  
2020

## RESUMEN

Se aborda el uso de una técnica química de análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de *Mycobacterium tuberculosis* (ácidos micólicos, ácidos micoserósicos y ácidos micolipénicos) como medio diagnóstico de tuberculosis (TB) en restos óseos humanos.

Para ello se analizó la presencia de estos biomarcadores lipídicos por medio de UHPLC/MS en muestras óseas chilenas subactuales (Cementerio General, CG) y arqueológicas de distinta procedencia geográfica y de diferente cronología, mediante detección de  $m/z$  diagnósticas y análisis de coincidencias con dos referencias (estándares de ácidos micólicos y extractos de cultivos celulares de *Mycobacterium tuberculosis*).

Si bien se obtuvieron resultados positivos, estos no se alinearon en un 100% con las expectativas, indicando que deben considerarse diferentes factores que pudieron incidir en ellos. Los resultados indicaron, además que funcionaría mejor el análisis de coincidencias que el de detección de  $m/z$  diagnósticas, y que es mejor usar un programa cromatográfico de 35 minutos frente a uno de 13.5 minutos, tanto para el análisis de identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas como en el análisis de coincidencias.

Se concluye que la técnica es útil, rápida, compleja y dependiente de la disponibilidad de instrumental y de los equipos de análisis y se discuten ajustes para mejorarla.

**Palabras clave:** Tuberculosis; paleopatología; biomarcadores lipídicos; Chile.

## AGRADECIMIENTOS

**A las instituciones curatoriales que hicieron posible el trabajo de las muestras de esta investigación:** Al *Museo Nacional de Historia Natural* (MNHN), especialmente a Cristian Becker, Nieves Acevedo, Verónica Siva-Pinto, y Ruben Stehberg. Al *Museo Arqueológico de La Serena* (MALS), especialmente a su director Ángel Durán y a Oscar Silva. Finalmente, al *Área de Antropología Física de la Facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Chile* (FACSO). Mención especial a Nicole Barreaux.

**A mi profesor guía Dr Mauricio Moraga** (*Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile*) y a mis tutores **Dr Javier Echeverría** (*Universidad de Santiago, Chile*) y **Dr Aryel Pacheco** (*OSTeam Ltda*) quienes me apoyaron académicamente en todo momento. **Al Dr David Minnikin** (*Institute of Microbiology and Infection, School of Biosciences, University of Birmingham, UK*) por amablemente proveerme de los protocolos para las extracciones de los biomarcadores lipídicos. **También a los profesores que revisaron y aportaron a mi proyecto: Dr Julio Alcayaga** (*Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile*) y **Profesor Eugenio Aspillaga** (*Facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Chile*).

A **Alejandra Huerta**, profesora de Química del Liceo Experimental Manuel de Salas, quien me inició en el camino de la Química y la convirtió en mi pasión eterna sin importar el rumbo que tomase mi carrera universitaria.

A las familias Teplizky-Martínez y sus seres queridos, sobre todo a mi hermana Sofía. A mis amigos cercanos que tuvieron que soportar mis quejas, sobre todo a Paulina Vilches con quien emprendí el viaje de la ciencia desde un inicio, y a mi mejor amiga Ruth Espinoza. Finalmente a Fall Out Boy y BigHit Ent por la compañía musical.

## Índice

<b>1. Capítulo 1: Introducción</b>	10
<b>1.1. Planteamiento del problema</b>	10
<b>1.2 Propósito</b>	15
<b>1.3 Pregunta de investigación:</b>	15
<b>1.4 Hipótesis</b>	15
<b>1.5 Objetivos</b>	15
1.5.a. <i>Objetivo General</i>	15
1.5. b. <i>Objetivos Específicos</i>	15
<b>2. Capítulo 2: Antecedentes</b>	16
<b>2.1 Avance de marcadores diagnósticos</b>	17
<b>2.2 Avance de protocolos analíticos</b>	19
<b>3. Capítulo 3: Marco Teórico y Conceptual</b>	21
<b>3.1 Paleopatología de la tuberculosis (TB)</b>	21
<b>3.2 El problema de diagnosticar TB en restos humanos</b>	23
<b>3.3 Marco Conceptual</b>	25
3.3.1.a <i>Características generales de la bacteria</i>	25
3.1.b <i>Características de la envoltura de la bacteria</i>	26
3.3.1.c <i>Características estructurales de los ácidos micólicos</i>	29
3.3.1.d <i>Características de los ácidos micocerósicos y micolipénicos</i>	30
3.3.2 <i>Técnicas analíticas empleadas en la presente investigación</i>	30
<b>4. Capítulo 4: Material y Métodos</b>	34
<b>4.1 Materiales</b>	34
4.1.a <i>Estándar de metil esteres de ácidos micólicos (MAME)</i>	34
4.1.b <i>Extracto de cultivo celular de Mycobacterium tuberculosis</i>	34
4.1.c <i>Muestras óseas de la colección Cementerio General</i>	34
4.1.d <i>Colección Pisagua</i>	36
4.1.e <i>Colección Pica 8</i>	38
4.1.f <i>Colección de El Olivar-Brillamar</i>	40
<b>4.2 Metodología</b>	43
4.2.a <i>Hidrólisis del estándar de metil esteres de ácidos micólicos (MAME)</i>	43
4.2.b <i>Triturado y molido de las muestras de hueso</i>	44

4.2.c Extracción de ácidos micólicos desde las muestras del extracto de células de <i>M. tuberculosis</i> y de las muestras de hueso analizadas .....	44
4.2.c.1 Fraccionamiento del extracto de células de TB .....	46
4.2.d Análisis en HPLC Orbitrap .....	47
4.2.d.1 Análisis comparativo entre extracto de células de TB fraccionado y sin fraccionar.....	47
4.2.e Análisis de resultados obtenidos en HPLC Orbitrap.....	48
4.2.e.1 Análisis de identificación de la presencia de compuestos con masas diagnósticas de tuberculosis.....	50
4.2.e.2 Análisis de coincidencias y similitud de peaks cromatográficos .....	52
<b>Capítulo 5: 5. Resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Análisis de identificación de la presencia de compuestos con <i>m/z</i> diagnósticos de tuberculosis.....</b>	<b>53</b>
5.1.a Conjunto 1 .....	53
5.1.a.1 Análisis de ácidos micólicos.....	54
5.1.b Conjunto 2. ....	57
5.1.b.1 Análisis de ácidos micólicos.....	57
5.1.b.2 Análisis de ácidos micocerósicos.....	59
<b>5.2 Análisis de coincidencias y similitud de <i>peaks</i> cromatográficos .....</b>	<b>61</b>
5.2.a Conjunto 1 .....	61
5.2.b Conjunto 2 .....	63
<b>5.3 Síntesis de los resultados obtenidos.....</b>	<b>68</b>
<b>6. Capítulo 6: Discusión.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Capítulo 7. Conclusiones.....</b>	<b>88</b>
<b>8. Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>92</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>106</b>
<b>Anexo 1: Figuras de las cadenas de las moléculas generadas a partir de las formulas en chemdraw .....</b>	<b>106</b>
<b>Anexo 2: Detecciones generadas por peak detection para referencias BL-EACMYC y BL-ECTB y en los programas cromatográficos de 35 y 13.5 minutos.....</b>	<b>109</b>
<b>Anexo 3: Gráficos de cromatogramas de peak base para cada muestra con su respectiva referencia asociada.....</b>	<b>124</b>

## Lista de Figuras

- Figura 2.1. Estructura de micolatos, micocerosatos, micolipenatos y tiocerolos.
- Figura 3.1. *M. tuberculosis*.
- Figura 3.2. Sección longitudinal de un *M. tuberculosis*.
- Figura 3.3. Diagrama y esquema de las distintas capas de la envoltura de la bacteria.
- Figura 3.4. Representaciones químicas, modelos y micrografías de los constituyentes y ultraestructura de la envoltura celular de la bacteria.
- Figura 3.5. Esquema de un HPLC acoplado a MS y sus respuestas analíticas.
- Figura 3.6. Esquema de un espectrómetro de Masas y su respuesta analítica.
- Figura 3.7. Ejemplo de un espectro de masas: Tolueno.
- Figura 4.1. Estándar de metil esteres de ácidos micólicos (MAME).
- Figura 4.2. Extracto de células de TB.
- Figura 4.3. Muestra de T10 del individuo B0219 de CG: segmento T10-L2, vista lateral y vista inferior de T10 antes y después de la extracción.
- Figura 4.4. Muestra de T11 del individuo B0063 de CG: segmento T7-T11, vista lateral y vista inferior de T11 antes y después de la extracción.
- Figura 4.5. Muestra de T10 del individuo B0068 de CG: segmento T8-T12, vista lateral y vista inferior de T10 antes y después de la extracción.
- Figura 4.6. Muestra del individuo 3089 de Pisagua: fragmento proximal de la fíbula derecha.
- Figura 4.7. Muestra del individuo 3097 de Pisagua: fragmento distal del fémur derecho.
- Figura 4.8. Muestra del individuo 3120 de Pisagua: fragmento de costilla izquierda.
- Figura 4.9. Muestra del individuo B0418 de Pica 8: fragmento de L1.
- Figura 4.10. Muestra del individuo B0438 de Pica 8: fragmento de séptima costilla izquierda.
- Figura 4.11. Muestra del individuo B0439 de Pica 8: fragmento de octava costilla izquierda.
- Figura 4.12. Muestra del individuo B0469 de Pica 8: fragmento de L1.
- Figura 4.13. Muestra del individuo B0644 de Pica 8: fragmento de L4.
- Figura 4.14. Muestra del individuo 22 del sitio "El Olivar-Brillamar": fragmento de costilla derecha.
- Figura 4.15. Muestra del individuo 23 del sitio "El Olivar-Brillamar": fragmento de costilla derecha.
- Figura 4.16. Mapa mostrando los sitios de procedencia de las muestras arqueológicas analizadas.
- Figura 4.17. Diagrama de flujo de los procedimientos incluidos en la metodología.
- Figura 4.18. Fases generadas después del centrifugado.
- Figura 4.19. Secado de las muestras por flujo de nitrógeno.
- Figura 4.20. Cromatografía de capa fina del extracto de células de TB.
- Figura 4.21. Placas cromatográficas de capa fina de las fracciones de los extractos de células de TB.
- Figura 4.22. Cromatograma total que incorpora curvas cromatográficas del extracto sin fraccionar y de las fracciones.
- Figura 4.23. Ejemplo del proceso de búsqueda del ion molecular del compuesto C<sub>80</sub>.
- Figura 4.24. Ejemplo de la búsqueda de las *m/z* de los fragmentos del compuesto C<sub>80</sub>.

Figura 6.1. Comparación de muestras y referencia del conjunto 2 (programa cromatográfico de 35 minutos)

Figura 6.2. Comparación de muestras y referencia del conjunto 1 (programa cromatográfico de 13.5 minutos).

Figura 6.3. Lesiones identificadas en el individuo B0469 de Pica 8.

## Lista de Tablas

Tabla 1.1. Casos de TB precolombina y Colonial identificados hasta ahora en Chile.

Tabla 2.1: Información publicada sobre análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras prehistóricas e históricas.

Tabla 4.1. Muestras de individuos de Cementerio General (CG).

Tabla 4.2. Muestras de individuos de la colección Pisagua.

Tabla 4.3. Muestras de individuos de la colección Pica 8.

Tabla 4.4. Muestras de individuos del sitio "El Olivar-Brillamar".

Tabla 4.5. Descripción de las muestras y su codificación en la presente memoria.

Tabla 4.6. Sistema de elución usado para el fraccionamiento de los extractos de células de TB.

Tabla 4.7. Programas cromatográficos de los preparados.

Tabla 4.8: Valores de  $m/z$ , peso molecular y masa exacta de las moléculas en estudio.

Tabla 4.9: Compuestos diagnósticos de TB y valores del ion negativo de los fragmentos más importantes en los espectros de masas de cada compuesto, listados por criterio ascendente de  $m/z$ .

Tabla 4.10:  $m/z$  de los iones moleculares buscadas.

Tabla 5.1: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{78}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1.

Tabla 5.2: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{80}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1.

Tabla 5.3: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{85}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras analizadas del conjunto 1.

Tabla 5.4: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{87}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras analizadas del conjunto 1.

Tabla 5.5: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{29}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1.

Tabla 5.6: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{30}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1.

Tabla 5.7: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{32}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1.

Tabla 5.8: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{78}$  en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.9: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{80}$  en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.10: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{85}$  en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.11: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de  $C_{87}$  en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.12: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de C<sub>29</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.13: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de C<sub>30</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.14: Resultados de la presencia del ion molecular y de los fragmentos de C<sub>32</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.15: Coincidencias de *m/z* entre el extracto de células de TB y las siete muestras analizadas.

Tabla 5.16: *m/z* coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Cementerio General (CG).

Tabla 5.17: *m/z* coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Pica 8.

Tabla 5.18: *m/z* coincidentes en cualquiera de los dos tuberculosos de CG y en cualquiera de los dos tuberculosos de Pica 8.

Tabla 5.19: *m/z* coincidentes en ambos tuberculosos de CG y en ambos tuberculosos de Pica 8.

Tabla 5.20: Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras del conjunto 1.

Tabla 5.21: Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras del conjunto 1.

Tabla 5.22: Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras del conjunto 2.

Tabla 5.23: Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras del conjunto 2.

Tabla 6.1: Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras analizadas con programa cromatográfico de 35 minutos.

Tabla 6.2: Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras analizadas con programa cromatográfico de 35 minutos.

Tabla 6.3: *m/z* coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Cementerio General (BL-TBCG-01 y BL-TBCG-02) y el control negativo (BL-CG-03).

Tabla 6.4: Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras arqueológicas.

Tabla 6.5: Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras arqueológicas.

Tabla 6.6: Resumen del análisis de coincidencias.

Tabla 6.7: Comparación entre los resultados de análisis genéticos de TB y los resultados obtenidos en la presente investigación.

## 1. Capítulo 1: Introducción

### 1.1. Planteamiento del problema

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad generada por un grupo de micobacterias cercanamente relacionadas denominadas *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) (Donoghue, 2009). Si bien su origen y relaciones coevolutivas con el *Homo Sapiens* sigue siendo materia de discusión (Donoghue et al., 2017). Datos genéticos modernos y evidencia arqueológica indican que el MTBC podría haber coexistido con los humanos desde hace al menos 15.000 años (Hershkovitz, 2015) Así, la tuberculosis y los humanos comparten una larga historia. (Aufderheide y Rodríguez-Martin, 1998; Daniel, 1997; Dormandy, 1999; Feldberg, 1995; Ryan, 1992). La coevolución con los agentes infecciosos data de los orígenes de nuestras especies (Gagneux, 2012), pero el punto crítico de esta relación ocurrió con el cambio de la tuberculosis desde una infección latente a una enfermedad durante el Neolítico (Comas et al. 2013). Este cambio se ha asociado principalmente a un aumento en la densidad poblacional, la aparición de asentamientos sedentarios, la domesticación de los animales, la estratificación social y otros 'cambios neolíticos' asociados al surgimiento de las sociedades. En las Américas, estas transiciones y los periodos posteriores a ellas son los escenarios ideales para explorar la tuberculosis con una orientación biocultural, integrando datos biológicos sobre la enfermedad en un contexto cultural.

En teoría, la infección por tuberculosis podría haber llegado a Norteamérica con los primeros inmigrantes desde Asia (Daniel, 2000). Sin embargo, la evidencia más temprana de la enfermedad en restos humanos fue identificada en Sudamérica. (Allison et al., 1981). El debate de la presencia de tuberculosis en las Américas antes de la llegada de los Europeos se cerró con la identificación histológica del bacilo en un individuo en Perú datado en el 700 DC (Allison et al, 1973) y su confirmación posterior mediante análisis genético en muestras de Perú y Chile (Salo et al, 1994; Arriaza et al, 1995). La evidencia más temprana de tuberculosis precolombina en Sudamérica a la fecha fue reportada por Allison et al (1981) en un grupo cazador-recolector en Arica (Costa norte de Chile, 800 AC). La segunda fue de una comunidad agro-pescadora de un valle sud-central en la costa de Perú (Chongos, 13 km tierra adentro, 160 AC). La tercera evidencia fueron tres individuos de comunidades agropastorales que habitaron el valle de Tarapacá en el norte de Chile (Caserones, 290 DC). Roberts y Buikstra (2003) señalaron que estos individuos de Caserones son las "muestras convincentes" más tempranas debido a la presencia de tests positivos alcohol-ácido resistencia para el bacilo en dos de ellas. Las otras evidencias reportadas para Sudamérica se han datado después del 500 DC, con la mayoría después del 1000 DC ya dentro del periodo Formativo o posteriores.

Hay un desbalance en el número de estudios de tuberculosis precolombina para cada país de Sudamérica. La preservación diferencial de los restos humanos y las diferentes historias investigativas han influenciado la evidencia que se ha encontrado hasta ahora. Por ejemplo, la preservación de restos humanos es pobre en suelos húmedos y ácidos, buena en suelos

no ácidos y secos, y óptima en el desierto. (Gomez y Mendonça, 2003). Hay más proyectos bioarqueológicos basados en sitios con ambientes secos en Sudamérica, y los restos humanos de Perú y Chile han sido estudiados de forma sistemática (Verano 1997,2003,2019; Verano y Lombardi, 1999; Castro y Aspillaga 2004; Guillén, 2012; Retamal, Pacheco y Uribe, 2018; Suby y Luna, 2019; Toyne , Murphy y Klaus, 2020). Hasta el 2013, el número total de individuos posiblemente afectados por Tuberculosis reportados por país correspondía a uno en Venezuela, 19 en Colombia, 100 aproximadamente en Perú, 7 en Argentina y 16 en Chile. Adicionalmente, hay dos individuos de “Los Andes” sin información respecto a su país de origen (Konomi et al, 2002). La mayoría de la evidencia se obtuvo de individuos recuperados de sitios costeros y de valles rodeados por ambientes desérticos (Perú, Chile y Argentina). Algunos de los individuos se recuperaron del Altiplano andino (Colombia, Perú), unos pocos de bosques (Amazonas, Perú) y algunos del extremo sur de Sudamérica.

Del 2013 al 2020, se han reportado o re analizado 51 individuos posiblemente afectados por tuberculosis. La nueva evidencia no cambia el panorama general de la tuberculosis en Sudamérica debido a que la mayoría de los individuos fueron recuperados de los mismos países (Perú y Chile) y las locaciones previamente identificadas, en concordancia con las explicaciones anteriormente señaladas. La mejoría en la calidad de la data generada para tuberculosis precolombina entre 2013 y 2020 es evidente. Por ejemplo, todos los estudios identificaron con precisión los individuos analizados, así como la mayoría de los indicadores incluidos en análisis previos. Sin embargo, los estudios que se enfocaron en análisis moleculares ( Bos et al, 2014 y Harkins et al, 2015) no incluyen descripciones completas de los individuos analizados (sexo, edad, lesiones). En este sentido, el artículo de Toyne et al (2020) podría ser considerado como central para estudios descriptivos enfocados en evaluar la presencia de tuberculosis en colecciones esqueléticas. La aplicación del marco teórico otorgado por la “Bioarqueología del cuidado” a los individuos afectados por tuberculosis en la Sudamérica precolombina (Tilley y Nystrom, 2019) también puede ser tomado como ejemplo para estudios futuros.

La recepción y reproducción de las distintas contribuciones en la comunidad científica dedicada al estudio de la TB Sudamericana precolombina siguió caminos dispares. El uso de técnicas histológicas de diagnóstico tuvo con una vida breve, únicamente desarrollada por Allison y colaboradores quienes entre 1973 y principios de la década de 1980 aplicaron este tipo de análisis en individuos momificados de Perú y Chile (Allison, Gerszten, Munizaga, Santoro y Mendoza, 1981). Distinta fue la situación de los análisis de ADN de TB, pues posterior al estudio publicado en 1994 siguieron varios en las décadas de los 1990 y del 2000, hechos por distintos grupos de investigadores y en individuos de distintos países: Colombia (Sotomayor, Burgos y Arango, 2004; Bello, Martínez, Gómez y Guerrero, 2008); Perú (Lombardi y García, 2000; Klaus et al., 2010); Chile (Arriaza, Salo, Aufderheide y Holcomb, 1995; Arriaza et al, 2008). De esta manera, durante la década del 2000 el análisis de ADN de TB se consideró como la única prueba diagnóstica definitiva y final, accesible a nivel local. Posteriormente surgieron diversas críticas a este enfoque, debido principalmente a la constatación de sucesivas fallas en los análisis y porque se fue haciendo

claro que dependía de infraestructura y equipamiento dedicado, así como de protocolos de bioseguridad especiales. Esto generó que desde la década de los 2010 surgieran nuevas interrogantes respecto del análisis de ADN de TB en muestras Sudamericanas precolombinas, las cuales han significado un aumento de complejidad en estos estudios, pues actualmente no solo basta con la constatación de la presencia de ciertas secuencias específicas, sino que es necesario comprobar la calidad de las muestras y del material genético del patógeno obtenido de ellas (Bos et al., 2014; Guichón et al., 2015; Harkins et al., 2015; Nelson, Buikstra, Herbig, Tung y Bos ,2020).

A la fecha, las investigaciones paleopatológicas en el territorio actualmente chileno han dado cuenta de veinticinco posibles casos de TB precolombina. El desglose geográfico de dichos casos es el siguiente: veintidós corresponden a individuos del Norte Grande de Chile: uno de la costa de Arica, cinco del valle de Azapa, uno de la costa de Iquique, tres del valle de Tarapacá y doce de la Pampa del Tamarugal. Otros dos casos han sido reportados en individuos de la costa del Norte Semiárido (La Serena) y uno fue identificado en la costa del extremo sur de Chile (Tierra del Fuego). A los posibles casos precolombinos se suman los reportes de dos casos coloniales: uno de la Pampa del Tamarugal, y al menos uno en una isla adyacente a la Gran Isla de Chiloé. El diagnóstico de TB en estos 27 posibles casos se ha basado en análisis osteológicos, radiológicos, histológicos y genéticos (ADN) (**Tabla 1.1**).

Casos (n)	Procedencia: Sitio Cronología	Diagnosticado(s) mediante	Referencias
Casos Precolombinos			
1	Arica; ¿? 800 AC	Osteología y Radiología	Allison et al., 1981
5	Valle de Azapa; ¿? 500-1000 DC	Osteología y ADN*	Allison et al., 1981, Arriaza et al., 1995 *caso informado primero por Allison et al 1981 (como caso 10: Azapa) y después reanalizado por Arriaza et al. 1995
1	Iquique; Sin Referencia 935 ± 75 AP	Osteología y ADN	Arriaza et al., 2008
3	Valle de Tarapacá; Caserones (Tarapacá 40) 290 DC	Histología	Allison et al., 1981
12	Pampa del Tamarugal; Pica 8 900-1300 DC	Osteología	Pacheco, 2015
2	La Serena; Olivar-Brillamar 1000-1450 DC	Osteología	Pacheco, 2015
1	Tierra del Fuego; Myren 1 640 ± 20 AP	Osteología, Radiología, ADN	Guichón et al., 2015
Casos Coloniales			
1	Pampa del Tamarugal; Pica 1600 DC	Histología	Allison et al., 1981
1	Isla Lemuy; Puqueldón 1 210 AP	Osteología	Sáez, 2008

**Tabla 1.1.** Casos de TB precolombina y colonial identificados hasta ahora en Chile

Los análisis osteológicos y radiológicos realizados desde la década de 1980 hasta hoy en casos chilenos precolombinos y coloniales han diagnosticado TB en base a la identificación de lesiones patognomónicas en tejido óseo (mal de Pott) y/o en base a la presencia de lesiones óseas consistentes (lesiones líticas axiales y apendiculares) o sugerentes de diagnóstico de TB (periostitis en cara pleural de costillas) (Allison et al., 1981, Arriaza et al., 1995, Arriaza et al., 2008, Sáez, 2008, Pacheco, 2015, Guichón et al., 2015). Las radiografías y “autopsias” posteriores de algunos de estos individuos también han permitido identificar la presencia de lesiones patognomónicas en tejido blando (nódulos calcificados pulmonares) (Allison et al., 1981, Arriaza et al., 1995).

El diagnóstico de TB en individuos chilenos precolombinos mediante análisis histológicos fue implementado por Allison y colaboradores durante un breve período de tiempo a principios de la década de 1980. Dichos análisis buscaron identificar la presencia del bacilo en muestras rehidratadas en solución de Ruffer, fijadas en parafina y teñidas según el protocolo señalado por los mismos autores (Allison y Gerszten, 1977, citados por Allison et al., 1981). Las tinciones utilizadas fueron Ziehl-Neelsen, Tricrómico de Masson, Azul de toluidino, Movat y Giemsa. Las muestras con tinción se estudiaron mediante microscopía de luz normal y aquellas sin tinción se estudiaron bajo luz polarizada y con microscopía de fase.

Por último, existen un individuo momificado de Azapa y uno recuperado cerca de Iquique cuyos análisis moleculares han permitido diagnosticarlos con TB. En ambos casos se buscó establecer la presencia del ADN del bacilo mediante la amplificación de la secuencia IS6110 (parte integral del ADN del MTBC). Esto se confirmó además al cortar con la enzima de restricción Hae-III la cual tiene un solo sitio de corte en el ADN de esta micobacteria (Arriaza et al., 1995, Arriaza et al., 2008).

Diagnosticar TB en restos humanos presenta una alta complejidad debido a varios factores. El análisis osteológico/radiológico-esquelético siempre será de carácter probabilístico a no ser que las lesiones sean patognomónicas (o diagnósticas). Para realizar análisis histológicos es necesario contar con tejido blando momificado, el cual en la mayoría de los casos no está presente. Los análisis de ADN, por su parte, fallan muchas veces por la falta de preservación del ADN del bacilo y/o por contaminación de las muestras. Una alternativa diagnóstica de TB es la identificación de biomarcadores lipídicos de membrana micobacteriana, los cuales ofrecen ventajas respecto de confiabilidad y especificidad. La resistente membrana celular de las micobacterias, caracterizada por un alto contenido lipídico, facilita la persistencia y supervivencia del bacilo a lo largo de la vida del huésped, descomposición del huésped, así como durante los procesos tafonómicos (Donoghue, 1998). Los lípidos, por su parte, tienen una mejor preservación que las proteínas y el ADN debido a que son hidrofóbicos (Gernaey y Minnikin, 2000; Gernaey et al., 2001; Redman, Stewart y Gernaey, 2002), tienen la capacidad de ser detectados en muestras pequeñas y, a diferencia del ADN, no necesitan ser amplificados lo cual reduce los potenciales problemas de contaminación (Donoghue, 2008; 2009; Donoghue et al., 2010). En cuanto a especificidad, los componentes lipídicos característicos de *M. tuberculosis* son particularmente adecuados para ser utilizados como biomarcadores debido a la gran

diferencia que presentan respecto a todos los tipos de lípidos habituales en mamíferos (Donoghue et al., 2017). La envoltura celular de *M. tuberculosis* está basada en macromoléculas complejas unidas que producen el peptidoglicano denominado micoloil arabinogalactano, que es la base de la característica membrana externa conformada por ácidos micólicos unidos covalentemente en interacción con un rango de lípidos libres inusuales (Minnikin, Lee, Wu, Besra y Donoghue, 2012). Estos constituyentes de la capsula y pared celular son específicos de *M. tuberculosis* y por lo tanto presentan un carácter diagnóstico de la patología de tuberculosis (Minnikin, Lee, Wu y Besra, 2017).

## 1.2 Propósito

Realizar análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras de individuos del territorio actualmente chileno. Este trabajo, por tanto, se centra en aplicar y poner a prueba una metodología química de identificación de individuos con TB no utilizada con anterioridad en Chile.

## 1.3 Pregunta de investigación:

¿Es posible detectar biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras esqueléticas del territorio actualmente chileno con lesiones óseas patognomónicas y/o consistentes con un diagnóstico de TB?

## 1.4 Hipótesis

Las muestras bioarqueológicas de individuos con lesiones óseas patognomónicas y/o consistentes con un diagnóstico de TB arrojarán resultados positivos para biomarcadores lipídicos de membrana de TB.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.a. Objetivo General

Utilizar una técnica química no aplicada con anterioridad en Chile para la identificación de biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras esqueléticas que permitan identificar individuos afectados por TB.

### 1.5. b. Objetivos Específicos

1.- Desarrollar un protocolo propio y local para el análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB a partir de modificaciones del protocolo descrito por Minnikin et al. (2012). Testear la técnica analítica utilizando estándares de ácidos micólicos de TB y preparados de células de *Mycobacterium tuberculosis* para analizar muestras óseas de individuos subactuales con lesiones óseas compatibles con TB (casos positivos) y en individuos subactuales sin lesiones óseas (casos de control).

2.- Analizar la presencia de biomarcadores lipídicos de membrana de *Mycobacterium tuberculosis* (ácidos micólicos y micocerósicos) en muestras humanas de distintos periodos cronoculturales chilenos. Analizar muestras de huesos de individuos recuperados en contextos arqueológicos del norte de Chile diagnosticados anteriormente en la literatura con TB y de individuos controles (sin TB ósea) con antigüedades de entre 500 y 2500 años, recuperados en distintos ambientes, y con distintas historias tafonómicas.

3.- Describir la utilidad de la técnica química en el análisis de TB en muestras humanas de distintos periodos cronoculturales chilenos, procedentes de distintos ambientes y con distintas historias tafonómicas, y generar información útil y pertinente para su publicación en términos metodológicos (aporte técnico-metodológico).

4.- Comparar los resultados de los análisis químicos con información obtenida mediante análisis genéticos realizados a las muestras analizadas.

## 2. Capítulo 2: Antecedentes

Prácticamente la mayoría de la investigación y aplicación del análisis químico de biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras arqueológicas ha sido desarrollada por o con la participación del Profesor David Minnikin (Institute of Microbiology and Infection, School of Biosciences, University of Birmingham, Inglaterra). Sus aportes se inician con el desarrollo del modelo teórico definitivo de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Minnikin y Polgar, 1967a, 1967b) y culminan con el establecimiento de un especializado protocolo de análisis químico, el cual ha sido la base para el desarrollo de esta línea de investigación. Desde 1998, el laboratorio del Dr. Minnikin ha analizado muestras de diversas partes del mundo (**Tabla 2.1**).

Sitio, País, Fechado	Referencias
<b>Análisis de ácidos micólicos</b>	
Karkur, Israel, 600 DC	Donoghue, Spigelman, Zias, Gernaey y Minnikin. 1998
Newcastle Infirmary, Inglaterra, 1753-1906	Gernaey et al., 1998; 1999
Addingham, Inglaterra, 1000 DC	Gernaey et al., 2001
Atlit-Yam, Israel, 9250-8160 AP	Hershkovitz et al., 2008
Thebes, Egipto, 600 AC	Donoghue et al., 2010
Brześć Kujawski, Polonia, 3500-3000 AC	Borowska-Strugińska, Druszczynska, Lorkiewicz Szewczyk y Zadzinska, 2014
KK2/1a Byzantine, Turquía, siglos VIII-IX	Minnikin, Besra, Lee, Spigelman y Donoghue, 2011 (desde Erdal 2004)
6 Szombathely, Hungría, siglo XV	Minnikin et al., 2011 (desde Donoghue et al. 2005)
UK 9 Crossbones, Southwark, Londres, Inglaterra, siglo XIX	Minnikin et al., 2011 (desde Brickley et al. 1999)
<b>Análisis de ácidos micocerósicos</b>	
Coimbra, Portugal, 1910-1936	Redman et al., 2009
<b>Análisis de ácidos micólicos y micocerósicos</b>	
Kiskundorozsma, Hungría, siglo VII	Lee et al., 2012a
Hodmezovasarhely-Gorzsa, Szeged, Hungría, 7000 BP	Masson et al., 2015; HGO-53 previamente descrito en Masson et al., 2013
Saujil, Catamarca, Argentina, 1091±22 AP	Luna et al., 2017
<b>Análisis de ácidos micólicos, micocerósicos y micolipénicos</b>	
Hodmezovasarhely-Gorzsa, Szeged, Hungría, 7000 AP	Masson et al., 2013
Bélmegyer-Csömöki, Hungría, 670-800 DC	Molnar et al., 2015
Dja'de el Mughara, Siria, 8800-8300 AC Tell Aswad, Siria, 8200-7600 AC	Baker et al., 2015
Atlit-Yam, Israel, 9250-8160 AP	Lee et al., 2015 (mismas muestras de Hershkovitz et al. 2008)

**Tabla 2.1.** Información publicada sobre análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras prehistóricas e históricas.

Desde sus primeras aplicaciones, la técnica de análisis químico ha tenido dos principales conjuntos de cambios, los cuales se explican a continuación.

## 2.1 Avance de marcadores diagnósticos

El primer método y por lo mismo el más utilizado, consiste en el análisis químico de los **ácidos micólicos** (Minnikin, Lee, Pitts, Baird y Besra, 2010). Estas moléculas constituyen del 40-60% del peso sólido celular, están involucradas en la primera línea de reconocimiento de la micobacteria durante la interacción huésped-patógeno, contribuyen a la supervivencia de la bacteria dentro de los fagocitos, y juegan un rol crucial en la estructura y funcionamiento de la envoltura celular (Takayama, Wang y Besra, 2005). La mayor parte de las especies de micobacterias producen una combinación de diferentes tipos de ácidos micólicos, los cuales difieren en la longitud del grupo terminal alquilo, así como en el número de grupos metilo entre los anillos de ciclopropano y el grupo carboxilo. Las micobacterias se caracterizan por la presencia de ácidos micólicos con 70-90 átomos de carbono, los cuales se componen de una cadena más larga con grupos funcionales  $\beta$ -hidroxi y una más corta con grupos funcionales  $\alpha$ -alquilo (Borowska-Strugińska et al., 2014). Debido a la ocurrencia de varios grupos funcionales dentro de la cadena principal de estos ácidos grasos, se han distinguido tres subclases presentes en *M. tuberculosis*, denominados alfa-, ceto-, y metoxi- micolatos (Figura 2.1). Desde el primer caso reportado (Donoghue et al., 1998), al menos otros 12 casos de tuberculosis en restos humanos antiguos han sido confirmados mediante el análisis de ácidos micólicos (Gearney et al., 1998; 1999; 2001; Hershkovitz et al., 2008, Minnikin, Besra, Lee, Spigelman y Donoghue, 2011; Donoghue et al., 2010; Borowska-Strugińska et al., 2014).

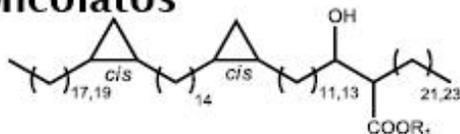
Posteriormente, el avance y perfeccionamiento de los protocolos permitieron incorporar el análisis de los lípidos 'libres' asociados a los ácidos micólicos. Los más estudiados y utilizados han sido los **ácidos micocerósicos** (componentes de ceras dimicoserosato de phthiocerol) y los **ácidos micolipénicos** (componentes de glicolípidos penta-acil-trehalosa) (Minnikin et al., 2012) los cuales son fácilmente reconocibles por sus cadenas de 27-34 carbonos con múltiples ramificaciones (Donoghue et al., 2017) (**Figura 2.1**). Además, cabe mencionar que: i) MTBC posee un patrón característico con largos de cadena de carbonos de  $C_{29}$ ,  $C_{30}$  y  $C_{32}$  para micoserosato, y ii) micolipenatos con largo de cadena de  $C_{27}$  son exclusivos de *M. tuberculosis*. Estas cualidades y diferencias estructurales han permitido una mayor precisión en los diagnósticos, sobre todo en casos donde los perfiles de ácidos micólicos no sean suficientemente claros por sí solos. El primer trabajo que demostró la utilidad de los micocerosatos como biomarcadores de membrana de TB antigua confirmó 33 casos en la colección esquelética de Coimbra (Portugal) (Redman et al., 2009). Luego, Lee et al (2012) demostraron el valor y utilidad de un enfoque integrado de perfiles de micolatos y micocerosatos para distinguir y confirmar una infección mezclada de TB-lepra en un individuo de Hungría. Posteriormente, se reportaron los resultados del uso combinado de ácidos micólicos, micocerósicos y micolipénicos para confirmar 18 casos en Hungría (Molnar et al., 2015). Finalmente, Luna et al. (2017) reportan un caso humano prehispánico del Noroeste Argentino datado en  $1091 \pm 22$  años AP<sup>1</sup>, en cuyas costillas se obtuvieron un

---

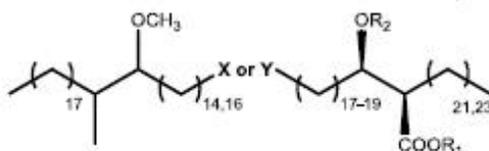
<sup>1</sup> Si bien hay reportes de los resultados obtenidos en análisis de animales de Norteamérica (Lee et al. 2012b), este caso sería el único ejemplo del uso de la técnica de análisis de biomarcadores lipídicos de TB en restos humanos a nivel americano.

perfil de ácidos micólicos correlacionado con el estándar para *M. tuberculosis* y un perfil de largos de cadena C<sub>27</sub>-C<sub>32</sub> positivo para ácidos micocerósicos.

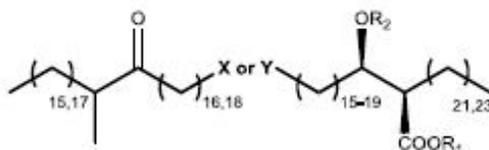
### A. Micolatos



**α-Micolato**  
*M. tb*: C76-82 (C78,80)



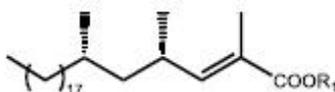
**Metoximicolato**  
*M. tb*: C83-90 (C85)



**Ketomicolato**  
*M. tb*: C84-89 (C87)

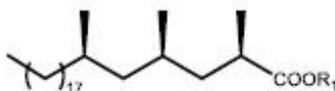
### B. Micolipenatos

C27 Micolipenato  
*m/z* 407

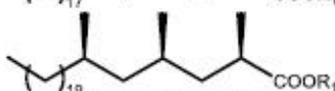


### C. Micocerosatos

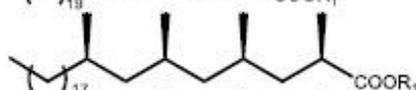
C27 micocerosato  
*m/z* 409



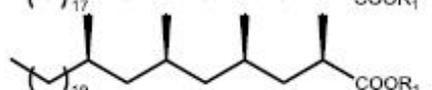
C29 micocerosato  
*m/z* 437



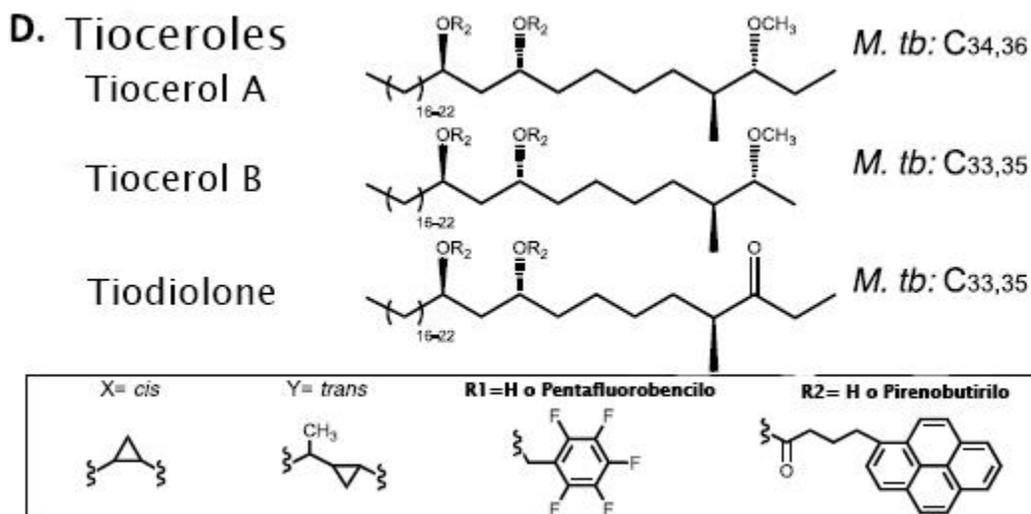
C30 micocerosato  
*m/z* 451



C32 micocerosato  
*m/z* 479



*M. tb*



**Figura 2.1.** Estructura de micolatos, micocerosatos, micolipenatos y tioceroles. Los paréntesis resumen el número de carbonos de la cadena principal. X o Y corresponden a la variación producida por la forma cis (X) o trans (Y) del ciclo para aquella molécula. R1 o R2 son los posibles radicales: Corresponden a H en la forma no derivatizada y a Pentafluorobencilo o Pirenobutirilo en su forma derivatizada. Modificado de Donoghue et al (2017)

## 2.2 Avance de protocolos analíticos

Las primeras detecciones de TB en material arqueológico se hicieron en ésteres antrilmétilo de ácidos micólicos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC<sup>2</sup>) acoplado a detector de fluorescencia utilizando un análisis secuencial. El análisis secuencial de HPLC usando columna de fase reversa/normal/reversa produce perfiles diagnósticos que, si los micolatos están en buen estado de conservación, correlacionan con el material estándar y permiten reconocer los  $C_{80(78)}$  alfa-micolatos,  $C_{85}$  cis-metoxi-micolatos y  $C_{87}$  trans-cetomicolatos característicos de *M. tuberculosis*. Además de producir estos perfiles diagnósticos, la técnica de HPLC permite generar información cuantitativa a través de las proporciones relativas de alfa-, cet- y metoxi- micolatos (Minnikin et al., 2012). Bajo la lógica secuencial, los ácidos micólicos derivatizados se separan por HPLC en columna de fase reversa, y luego se analiza la fracción de micolatos por HPLC en fase normal para separar las clases metoxi- y cet- micolatos. Luego cada cromatograma se alinea con los picos cromatográficos diagnósticos para MTBC nuevamente usando HPLC con columna de fase reversa (Minnikin et al., 2012).

Si bien las primeras detecciones obtuvieron buenos resultados, la inestabilidad relativa de estos derivados (ésteres de antrilmétilo de ácidos micólicos) llevó al desarrollo de un protocolo integrado de extracción de biomarcadores lipídicos de membrana de TB. En este, los ácidos grasos extraídos se derivatizan en ésteres de pentafluorobencilo (PFB), los cuales se separan en una fracción de micolatos (cadena larga) y una no hidroxilada (cadena

<sup>2</sup> En esta revisión y en toda la presente Memoria los nombres de las máquinas serán indicados en inglés porque así se llaman los equipos, así son congruentes las siglas que resumen sus nombres, porque así se mencionan en la literatura, y para facilitar su búsqueda en sistemas de información y de manejo de datos que estas proporcionan.

media). Luego de la separación, la cadena media de los ácidos micocerósicos y micolipénicos se analiza mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS), y Ionización química de iones negativos altamente sensibles (Highly Sensitive Negative Ion Chemical Ionization, NI-CI) mientras que los ésteres de PFB generados desde los ácidos micólicos son derivatizados por medio de una segunda derivatización hacia derivados estables de ácido pirenobutírico (PBA), los cuales son analizados mediante HPLC acoplado a detector de fluorescencia en columnas de fases normal y reversa (Donoghue et al., 2017).

El único trabajo exitoso utilizando un protocolo de preparación y detección diferente<sup>3</sup> fue realizado en la Universidad de Łódź (Borowska-Strugińska et al., 2014). En este, los ácidos grasos extraídos no fueron derivatizados sino que las muestras se cargaron disueltas directamente en la solución de fase móvil y fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a detector de espectrometría de masas en tandem (Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS). Además, los investigadores de Łódź realizaron análisis de espectrometría de masas inyectando las muestras mediante análisis de inyección de flujo (Flow Injection Analysis, FIA) para luego realizar la espectrometría con ionización negativa por electrospray (Negative Electrospray Ionization, ESI), monitoreo de reacción múltiple (Multiple Reaction Monitoring, MRM), y una aplicación del monitoreo selectivo de iones (Selected Ion Monitoring, SIM). Con ello lograron seleccionar múltiples iones generados desde iones precursores y observar la abundancia de éstos individualmente, en vez del espectro de masas completo de la muestra. La comparación de estos resultados con los obtenidos con un estándar de células muertas de *M. tuberculosis* fueron positivos.

---

<sup>3</sup> Para un ejemplo no exitoso, ver Mark, Patonai, Lorand y Marcsik, 2010 y las discusiones posteriores (Minnikin et al., 2010; Mark, Gulyas-Fekete, Marcsik, Molnar y Palfi., 2011).

### 3. Capítulo 3: Marco Teórico y Conceptual

#### 3.1 Paleopatología de la tuberculosis (TB) y el aporte de diagnosticar TB antigua para entender procesos socioculturales en bioarqueología.

Las enfermedades infecciosas son causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos. Si se conoce el organismo causante, como en la TB (*Mycobacterium tuberculosis*), esta se clasifica como enfermedad específica.

A la fecha, la tuberculosis es la patología infecciosa específica más estudiada en paleopatología (Steinbock, 1976; Aufderheide and Rodríguez-Martin, 1998; Pálfi et al, 1999; Roberts y Buikstra, 2003; Roberts y Manchester 2010; Roberts, 2011; Roberts, 2012; Roberts y Buikstra, 2019). Los estudios de la tuberculosis en el pasado tradicionalmente comienzan con la identificación de lesiones en el hueso, posiblemente causadas por la enfermedad en restos humanos esqueletizados o momificados a través de análisis macroscópico por (Naked eye examination) o por imagenología (Radiografías y Tomografía computarizada), especialmente si los restos están momificados. (Fletcher et al, 2003; Friedrich et al., 2010; Martínez, Meléndez y Manrique, 2010; Piombino-Mascalì et al., 2015, Kim et al., 2016; Sabin et al., 2019). Para mejorar el diagnóstico también se ha sugerido analizar microscópicamente las lesiones óseas. (Schultz y Schmidt-Schultz, 2015; Assis y Keenleyside 2019). Después de describir las lesiones, la mayor parte de estos estudios ofrece un diagnóstico diferencial, considerando literatura paleopatológica (Steinbock, 1976; Aufderheide y Rodríguez-Martin, 1998; Ortner, 2003; Roberts y Manchester, 2010) y clínica. Algunos trabajos están enfocados en estudios de caso, y otros analizan la evidencia de Tuberculosis en colecciones. Uno de los mayores problemas en los estudios poblacionales de tuberculosis en grupos arqueológicos hace relación a sus características fisiopatológicas, las cuales afectan su representación. De acuerdo a la WHO, cerca de un 5-15% de los infectados (que han sido expuestos a alguien enfermo de tuberculosis) ([https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1)), contraen activamente la enfermedad, y un escaso porcentaje de estos individuos (3-5%) desarrolla lesiones esqueléticas. Con esto es claro que la presencia de tuberculosis en las poblaciones del pasado (considerando sólo individuos que presenten lesiones esqueléticas probablemente causadas por ella) debe ser considerada sólo la punta del iceberg. En palabras sencillas, la evidencia de los individuos afectados sólo permite establecer que hubo tuberculosis presente en el grupo arqueológico en estudio, pero se requieren otras líneas de evidencia para poder tener un mejor entendimiento de su impacto poblacional. Esto ha llevado a la apertura de nuevas aproximaciones teóricas y metodológicas, tal como el refinamiento de las técnicas de detección y métodos de confirmación del diagnóstico, un énfasis en el aumento de la caracterización de los afectados por TB en el pasado, y en una contextualización más amplia de los individuos afectados en el contexto de su comunidad.

El diagnóstico de Tuberculosis en individuos precolombinos de Sudamérica hasta el 2013 es diverso:

- a) El sello de calidad para la identificación de tuberculosis en restos esqueléticos fue el mal de Pott. Pocos casos sin lesiones vertebrales han sido discutidos.
- b) Mientras que algunos reportes proveen descripciones de las lesiones e imágenes (fotografías, radiografías, Scans de TC), otros no. Incluso en algunos reportes 'clínicos' la información disponible está incompleta. Por ello, no hay forma de reanalizar la evidencia, hacer diagnóstico diferencial, o hacer análisis para explorar patrones de lesiones en los individuos previamente diagnosticados.
- c) Allison et al (1973; 1981) utilizaron técnicas histológicas para confirmar la presencia de tuberculosis (acid-fast bacilli tests) en individuos de Perú y Chile.

- d) De 1994 al 2010, se generaron ocho confirmaciones biomoleculares a través de IS6110 para muestras de Colombia (Sotomayor et al., 2004, Bello et al., 2008), Perú (Salo et al., 1994; Lombardi y Garcia 2000; Klaus et al., 2010), y Chile (Arriaza et al. 1995, Arriaza et al. 2008, Guichón et al. 2009).
- e) Hasta el 2013, no se habían realizado análisis de biomarcadores lipídicos para muestras sudamericanas. (Gernaey et al., 1998; 2001, Minnikin et al., 2012)

Desde el 2013 al 2020, las comunicaciones de Pacheco (2015) y el estudio de Toyne et al (2020) basan sus análisis en lesiones óseas. Todas las otras investigaciones incorporan confirmaciones moleculares.

Nelson et al (2020) demostró la utilidad del análisis molecular aplicado a colecciones mezcladas, donde no es posible proponer diagnósticos basados en lesiones y patrones identificados para esqueletos completos y momias. Los avances del diagnóstico molecular expandieron la confirmación basada en el secuenciamiento de IS6110 a la cuantificación por PCR de diferentes ensayos (rpoB2, IS6110, IS1081; Harkins et al., 2015), Secuenciación Metagenómica de Escopeta (Nelson et al., 2020) y la secuenciación de genoma completo (Bos et al., 2014). Debe ser mencionado que los problemas relacionados a preservación y contaminación en las muestras siguen presentes. Luna et al (2017) y Guichón et al (2015) reportaron 'casos', mientras que Toyne et al (2020) retomó la aproximación epidemiológica para colecciones. Luna et al (2020) utilizó por primera vez biomarcadores lipídicos para TB en una muestra sudamericana.

La investigación de tuberculosis Antigua orientada bioculturalmente es antropológica en su más amplio sentido, puesto que incorpora entender las interacciones entre biología humana, los procesos de adaptación, cambios de estilo de vida, migraciones, el ambiente, la domesticación de animales, la economía, estratificación social, dieta, trabajo y asentamientos. (Roberts y Buikstra , 2003). Hay cuatro focos para el estudio de tuberculosis antigua: 1) Un foco biológico, el cual explora la coexistencia/interacción temporal y geográfica de los humanos con el bacilo (Brosch et al., 2002); 2) Un foco biomédico, el cual explora la identificación de posible evidencia a través de análisis bioarqueológicos y a veces de su confirmación por análisis biomoleculares (Anastasiou y Mitchell, 2013); 3) un foco biocultural, el cual coloca la enfermedad en contexto (Roberts, 2011); 4) un foco en la gente que sufrió de tuberculosis en el pasado y los posibles cuidados que recibieron de sus comunidades (Tilley y Nystrom, 2019). De este modo, la aproximación debe ser multidisciplinaria e incluir genética, bioquímica, medicina, fisiología, patología, histología, antropología física, paleopatología, bioarqueología, arqueología, historia, ecología humana y epidemiología. (Pálfi et al., 1999).

Hasta el 2013, pocos reportes incluían la discusión sobre los orígenes causales o la expansión de la tuberculosis precolombina en Sudamérica. Debido a que la mayoría de la evidencia para tuberculosis ha sido reportada en grupos sedentarios con evidencia de agricultura y domesticación de animales (camélidos, roedores y caninos), varios autores han relacionado la emergencia de tuberculosis en Sudamérica con los 'cambios del neolítico' y/o que la persistencia/prevalencia de la tuberculosis en aquellas comunidades fue facilitada por la adopción de aquellos cambios. Sin embargo, los cambios del Formativo o la 'Transición Neolítica' no ocurrió como un proceso uniforme en todo Sudamérica (Lumbreras, 2006). La idea de la existencia de un núcleo Formativo desde el cual se difundieron los cambios llevó a especulaciones acerca del origen de la tuberculosis en un centro Formativo en Bolivia (Tiwanaku: Arriaza et al 1995) desde el cual la enfermedad se expandió con las colonias Tiwanaku que ubicaron sus asentamientos en áreas periféricas.

(Berenguer y Dauelsber, 1989; Rivera ,1991). Estas ideas prevalecieron hasta los inicios de los 90s, pero recientes re-evaluaciones contradicen esta teoría, identificando procesos Formativos complejos a escala microregional en el norte de Chile (Nuñez, 2006). El descubrimiento de las 'muestras convincentes' más tempranas en uno de estos sitios Formativos (La villa de Caserones, Valle de Tarapacá, Allison et al, 1981), contradujo la idea del origen Boliviano y abrió nuevas preguntas sobre los puntos de origen de la enfermedad. Para el Periodo Intermedio Tardío (900-1400 AD) se ha sugerido una pandemia de tuberculosis en las áreas sur de Perú y norte de Chile. (Lombardi y García, 2000). Para este periodo tardío, se ha sugerido que la expansión de la tuberculosis fue facilitada por redes comerciales, problemas políticos (guerra, alianzas) o contactos religiosos entre los grupos (Arriaza et al., 1995; Arriaza et al., 2008; Backo y Verano, 2001; Retamal y Pacheco, 2010).

Un factor frecuentemente mencionado en inicios de los 90s en relación a tuberculosis precolombina en Sudamérica es el cercano contacto de humanos con mamíferos terrestres (transmisión zoonótica), asumiendo que la tuberculosis humana se debió posiblemente a *M. Bovis* (Burgess, 1999; Roberts y Buikstra, 2003).

Esto fue descartado en 2002, cuando Brosch et al.(2002) Demostraron que *Mycobacterium tuberculosis* no evolucionó desde *Mycobacterium bovis* (ver el review de Stone et al., 2009). Pero en 2009 la evidencia de tuberculosis encontrada en grupos cazadores recolectores de Tierra del Fuego datada en 1300 AD (Guichón et al, 2009; Bastida , Guichón y Quse 2010; Bastida , Guichón y Quse , 2011) relacionó esta con el contacto con mamíferos marinos (pinnípedos otáridos) que pueden desarrollar tuberculosis (*Mycobacterium pinnipedii*, miembro del MBTC), el cual es transmisible a humanos y otras especies. Así, la caza de mamíferos marinos y la movilidad de los grupos cazadores-recolectores se convirtieron en áreas promisorias de investigación para las causas y consecuencias de la tuberculosis en Sudamérica.

Los resultados obtenidos por Bos et al (2014) en restos humanos datados entre 1000-1300 AD del sur de Perú probaron la hipótesis de Bastida , Guichón y Quse (2010, 2011) y llamaron a la re-evaluación de esta zoonosis como un factor de emergencia/dispersión de tuberculosis precolombina en los territorios del sur de Sudamérica, cambiando así el paradigma que se manejaba hasta ese entonces para entender la tuberculosis precolombina en Sudamérica. (ver Buikstra et al. , 2017) Así , para Sudamérica, estos avances no solo han significado confirmar diagnósticos, sino que han demostrado un amplio potencial en aspectos más finos respecto de la historia evolutiva de la TB antigua en la región.

### **3.2 El problema de diagnosticar TB en restos humanos**

Para investigar paleopatológicamente la TB se requiere confiabilidad de los diagnósticos, lo cual, como se verá a continuación, no siempre resulta una tarea simple. La base del diagnóstico en restos humanos consiste en comprender cómo la enfermedad afectó al cuerpo en un sentido clínico. Para ello, en primer lugar, se identifican cambios anormales macroscópicos y se establece su localización en los tejidos afectados y su distribución en el cuerpo (Ortner y Putschar, 1981; Lovell, 2000), luego estos se comparan con datos clínicos (o de la literatura paleopatológica), a fin de proponer un diagnóstico diferencial (Steinbock, 1976; Aufderheide y Rodríguez-Martin, 1998). Este procedimiento busca hacer un diagnóstico más acertado eliminando gradualmente otras posibles causas (otras condiciones patológicas) en base a patrones conocidos en circunstancias clínicas

modernas (Roberts y Manchester, 2010). Las manifestaciones óseas típicamente producidas por TB incluyen cifosis de la columna (Mal de Pott) como patognomónica; lesiones líticas (cavidades o destrucción sin formación de hueso nuevo), procesos de resorción de hueso (pérdida de hueso cortical), y periostitis (reacción proliferativa periosteal) (Aufderheide y Rodríguez-Martin, 1998; Ortner, 2003). También deben evaluarse las lesiones en los cuerpos vertebrales que no afectan los arcos neurales y las lesiones líticas extra espinales (Waldron, 2009), y poner atención a las lesiones en costillas como posibles indicadores de TB pulmonar, aunque no como patognomónicas (Roberts, Lucy y Manchester, 1994). Existen diferencias en como las lesiones por TB afectan distintos elementos óseos dependiendo de su ubicación anatómica y de la edad del individuo. Los focos tuberculosos en lactantes y niños pequeños a menudo ocurren en los huesos tubulares de manos y pies (metacarpianos, metatarsianos y falanges), en los centros de osificación de los huesos del tarso y del carpo, y ocasionalmente en la diáfisis de los huesos largos. En adultos, por su parte, afectan más las metáfisis y epífisis de los huesos largos. Las vértebras, costillas y esternón, finalmente, pueden verse afectados en todas las edades (Buikstra, 2019).

Los pasos descritos arriba permiten proponer probables casos de TB que –idealmente– deben ser confirmados por otros medios. Hasta ahora las confirmaciones de casos sudamericanos de TB han sido logradas mediante pruebas histológicas, moleculares y bioquímicas. Las primeras han identificado microscópicamente la presencia del bacilo de la TB en muestras de tejido blando rehidratado (Allison et al., 1973; 1981), pero se hayan condicionadas a la existencia de dicho tejido, es decir, que solo podrían aplicarse a restos humanos momificados que presenten órganos internos y estructuras asociadas estos (p.e. pleura). Las pruebas moleculares, por su parte, han permitido señalar la presencia del bacilo de la TB al identificar secuencias genéticas específicas del ADN de este tanto en tejido blando como en tejido óseo (Salo et al., 1994, Arriaza et al., 1995;2008, Lombardi y García, 2000, Sotomayor, Burgos y Arango, 2004; Bello, Martínez, Gómez y Guerrero, 2008, Guichón et al., 2009; 2015, Klaus et al., 2010, Bos et al., 2014, Harkins et al., 2015, Luna et al., 2017). La aplicación de técnicas moleculares, no obstante, depende de la preservación del ADN del bacilo, que las muestras no estén contaminadas (p.e. con ADN moderno o con ADN de otros agentes similares), de la implementación de infraestructura dedicada (p.e. de laboratorios que exclusivamente trabajen con ADN antiguo), y de protocolos de análisis especiales (Bos et al., 2014; Guichón et al., 2015; Harkins et al., 2015).

Las pruebas químicas, finalmente, buscan la identificación de biomarcadores lipídicos de la capsula y pared celular del bacilo de la TB (Minnikin et al., 2017). Su aplicación presenta ventajas de confiabilidad, pues la resistente membrana celular del bacilo facilita su persistencia y supervivencia incluso después de la descomposición del huésped y de la acción de procesos tafonómicos (Donoghue, 1998). Los lípidos, además, se preservan mejor que las proteínas y el ADN debido a que son insolubles en agua (Gearney et al., 2000; 2001; Redman et al., 2002). Los componentes lipídicos característicos de *M. tuberculosis* sirven como biomarcadores pues se diferencian de otros lípidos habituales en mamíferos (Donoghue, 2017), tienen la capacidad de ser detectados en muestras pequeñas y, a diferencia del ADN, no necesitan ser amplificados lo cual reduce los potenciales

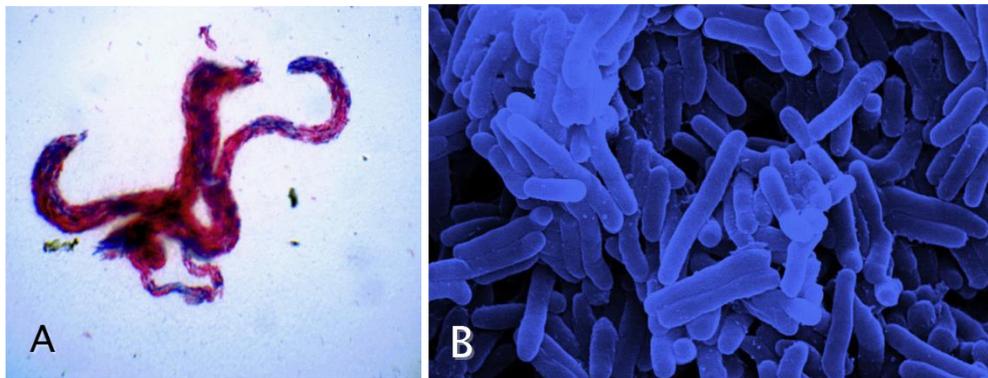
problemas de contaminación (Donohue, 2008, 2009; Donohue et al., 2010). No obstante, estas ventajas, hasta ahora esta alternativa sólo ha sido aplicada a un caso de Sudamérica, en el cual fue posible obtener los perfiles típicos de los ácidos micólicos y un perfil positivo para ácidos micocerósicos ( $C_{27}$ - $C_{32}$ ) en una costilla de un individuo del Noroeste de Argentina (Luna et al., 2017).

### 3.3 Marco Conceptual

#### 3.3.1.a Características generales de la bacteria

*Mycobacterium tuberculosis* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, que actualmente comprende 188 especies (Gupta, Lo y Son, 2018), repartidas entre patógenos estrictos, oportunistas y saprófitos (Leguizamón, 2012). Es parte del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* Complex), el cual está conformado además por *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. pinnipedi*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. dassie*, y *M. oryx* (Velayati y Farnia, 2016). Estos organismos están altamente relacionados pues comparten más del 99% de identidad a nivel de nucleótidos para algunos locus, pero difieren en su morfología, bioquímica, hospederos y patrones de enfermedad en animales (Brosch, 2002).

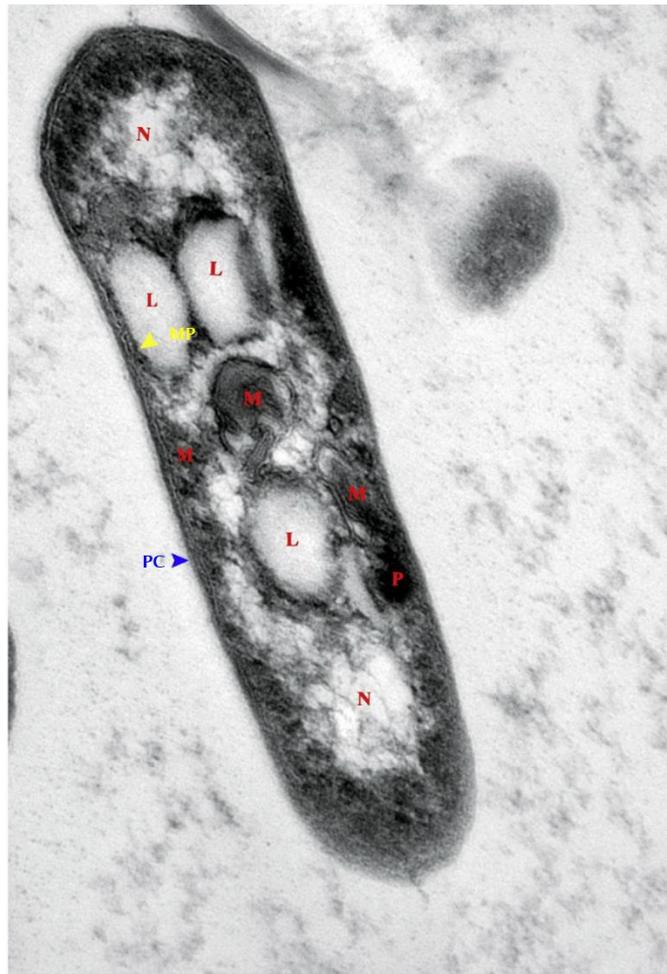
Morfológicamente, *M. tuberculosis* es una micobacteria con forma de bacilo (redondeada, alargada), de tamaño pequeño (3  $\mu$ m de largo y 0.5  $\mu$ m de ancho), que no posee glucocalix, pili o flagelo en su pared celular para adhesión (**Figura 3.1**). Su tamaño no cambia si está en ambientes ricos o bajos en nutrientes, y su crecimiento es lento (12 horas) sin importar las condiciones del medio. Es aerobia estricta (dependiente de oxígeno) que puede volverse anaerobia facultativa (independiente de oxígeno a voluntad) si las condiciones lo exigen. Es alcohol-ácido resistente (**Figura 3.1a**) y Gram-positivo, y metabólicamente es positiva a las pruebas de catalasa y fenilasa (Moon, Kim, Moon, Kim, 2017).



**Figura 3.1.** *M. tuberculosis* a) con tinción Ziehl-Neelsen. Su alcohol-ácido resistencia (resistencia a la decoloración) se debe a la presencia de los ácidos micólicos. b) vista al microscopio electrónico de transmisión. (Imágenes extraídas de Velayati y Farnia 2016).

### 3.3.1.b Características de la envoltura de la bacteria

La envoltura micobacteriana es un conjunto muy complejo de moléculas que además de constituir la interface entre la bacteria y la célula huésped, protege a la bacteria, le da forma y le proporciona los mecanismos necesarios para el tráfico de sustancias entre el interior y exterior celular. El 40% del peso celular de la bacteria corresponde a lípidos, en su mayoría constituyentes de la densa pared celular (**Figura 3.2**). Se cree que la alta composición en lípidos de la envoltura es lo que hace muy lento el crecimiento de la bacteria, debido principalmente al alto consumo energético en su biosíntesis y al estricto control en el intercambio de sustancias con el exterior celular (Leguizamón, 2012).

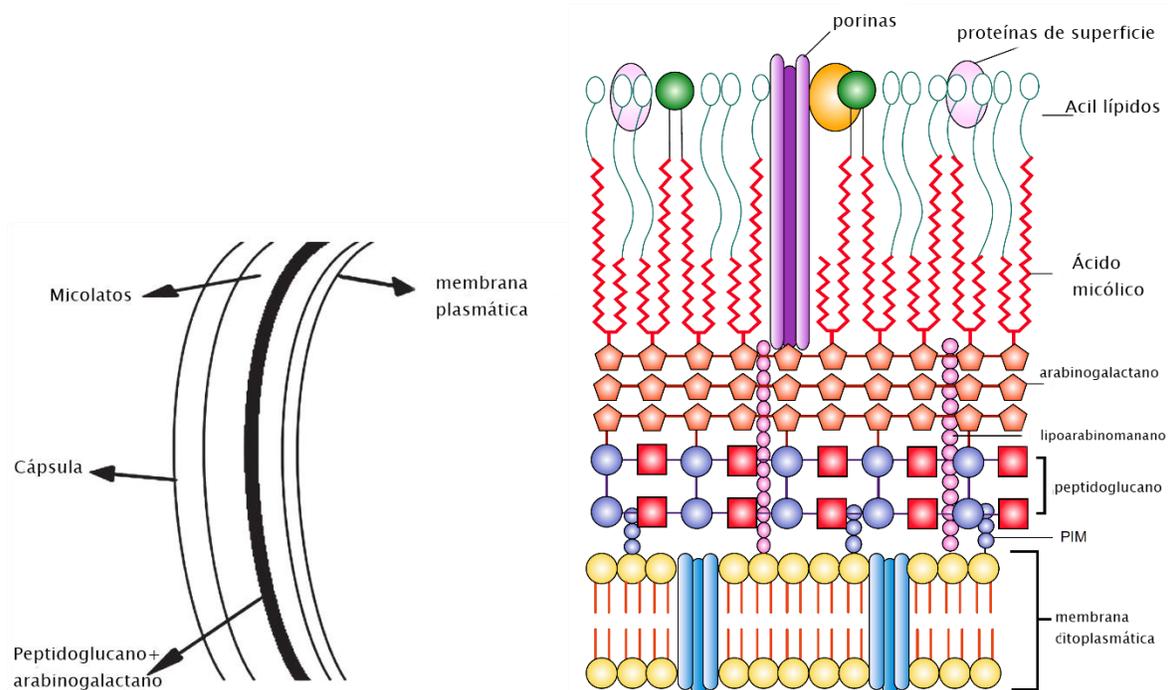


**Figura 3.2.** Sección longitudinal de un *M. tuberculosis*. Se observa la pared celular (PC), la membrana plasmática (MP), vacuolas lipídicas (L), y material nuclear(N). (Imagen extraída de Velayati y Farnia, 2016).

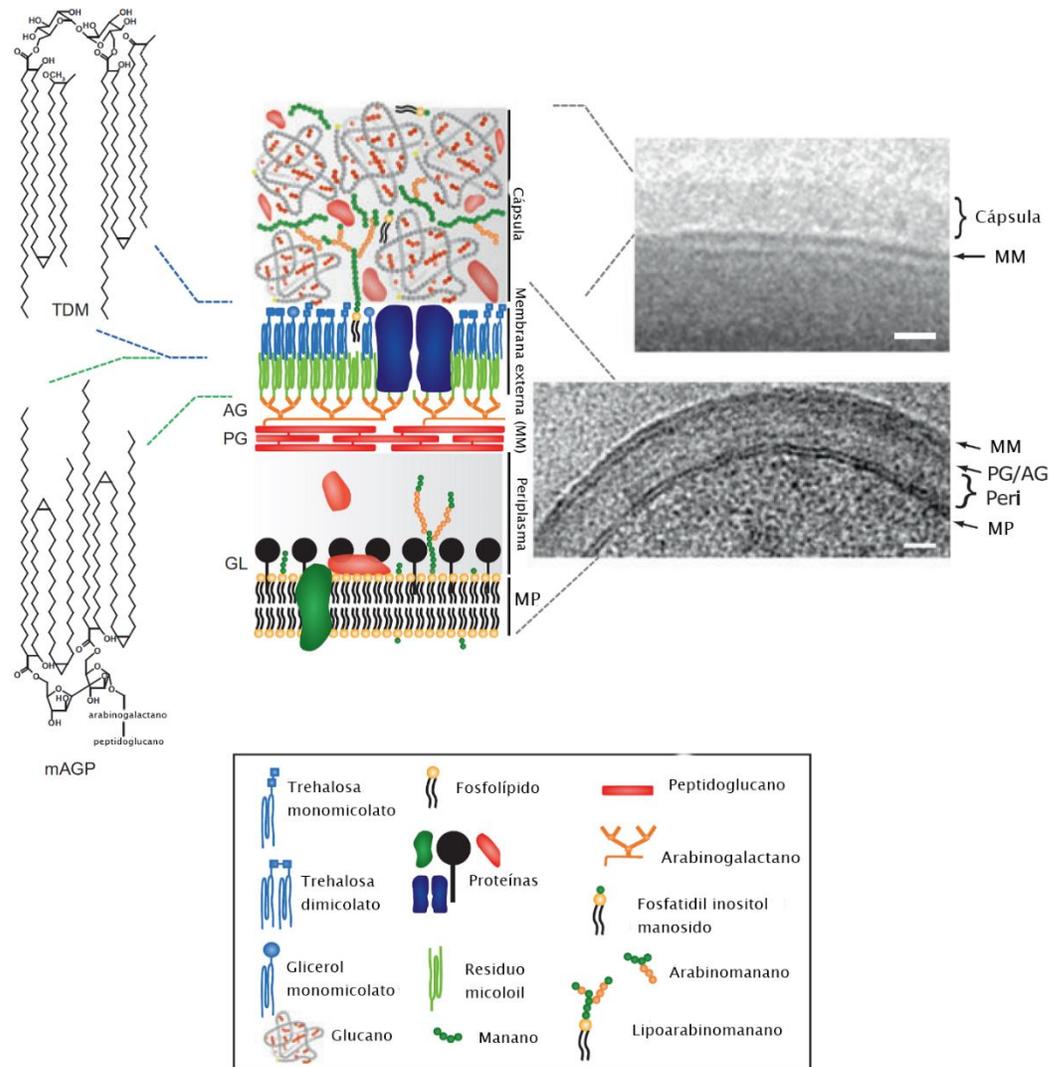
De afuera hacia adentro (**Figura 3.3**), lo primero es la capa más externa de la envoltura celular, habitualmente llamada **cápsula** (Daffé y Draper, 1998). Esta se compone principalmente de polisacáridos (glucano, arabinomanano, y manano), proteínas y escasos lípidos especie-específicos. Múltiples funciones biológicas han sido asociadas a los

polisacáridos de la cápsula en relación a la inmunopatogénesis y supervivencia de la bacteria en el huésped (Para una extensa revisión referirse a Kaur, Guerin, Skovierová, Brennan y Jackson, 2009).

Bajo la cápsula se encuentra la membrana externa también llamada **micomembrana**. Su capa más externa posee moléculas libres entre las cuales destacan el alto contenido de glicolípidos basados en manosil-fosfatidil-mio-inositol, lipoglicanos fosfatidil-mio-inositol-manosidos (PIMs) y lipomananos (LM). Esta capa externa también se compone de acil-trehalosas en forma de sulfatidos (SL), diaciltrehalosas (DAT), trehalosa mono y dimicolato (TMM y TDM; **Figura 3.4**), y otras; así como de derivados de ácidos *p*-hidroxibenzoicos, otros glicolípidos fenólicos y algunas proteínas (p.e. las que conforman los poros que atraviesan la micomembrana). La capa más interna de la micomembrana, en cambio, posee cadenas de tipo micolil (ácido micólico) unidas por esterificación a arabinogalactano (AG), las cuales a su vez se unen a peptidoglucano (PG) formando el complejo micolil-arabinogalactan-peptidoglucano (mAGP, **Figura 3.3**). Este esqueleto insoluble unido covalentemente es el principal componente estructural de la envoltura celular. Cerca del 60% de dicho complejo lo constituyen los ácidos micólicos.



**Figura 3.3.** Diagrama y esquema de las distintas capas de la envoltura de la bacteria. (Imágenes extraídas de Velayati y Farnia, 2016).



**Figura 3.4.** Representaciones químicas, modelos y micrografías de los constituyentes y ultraestructura de la envoltura celular de la bacteria. (escala en micrografías= 20 nm). (Imagen extraída de Daffé, Quémard y Marrakchi, 2017)

El arabinogalactano (AG) fue reconocido a inicios de 1950 como el mayor polisacárido de la envoltura celular de las micobacterias cuya función aparente es unir la capa de ácidos micólicos al PG. Recientemente, además se ha propuesto que produce una región viscosa hidrofílica entre las capas de ácidos micólicos y PG. El AG está compuesto exclusivamente de D-galactofuranosas (cadenas de galactosa) y D-arabinofuranosas (polímeros de arabinosa) unidos en una organización altamente específica (Moon et al., 2017).

El peptidoglucano (PG, Figura 3.4) es un polímero complejo que forma una capa rígida fuera de la membrana plasmática, otorgándole forma y la fuerza para soportar la presión osmótica a la célula. En el caso de *M. tuberculosis* se compone de unidades repetitivas lineales de *n*-acetilglucosamina unidas a ácido murámico modificado sustituido con cadenas lineales tetrapeptídicas altamente relacionadas entre sí.

Bajo la capa interna de la micomembrana se encuentra el espacio periplásmico (Peri), con una capa granular proteica, y finalmente bajo dicho espacio se halla la membrana plasmática (PM) con su bicapa de fosfolípidos y proteínas asociadas (Figura 3.4).

### **3.3.1.c Características estructurales de los ácidos micólicos**

La estructura de los ácidos micólicos ha sido abordada a través de la aplicación de varias técnicas analíticas: cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), espectrometría de masas (MS), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), entre otras. Con ello se ha aprendido que son los ácidos grasos más largos encontrados en la naturaleza. Los ácidos micólicos fueron originalmente definidos como ácidos grasos 2-alkil 3-hidroxi pertenecientes a la envoltura celular de las micobacterias, con cadenas de entre 60-90 carbonos. Sin embargo, el hallazgo reciente de estructuras similares de cadena variable en el género *Corynebacterium* ha significado cambiar su definición en función de la ampliación del rango del número de carbonos de sus cadenas. Esto pues poseen de C<sub>22</sub> a C<sub>38</sub> en *Corynebacterium*, de C<sub>30</sub> a C<sub>36</sub> en *Hoyosella* y *Amycolicoccus*, de C<sub>34</sub> a C<sub>38</sub> en *Dietzia*, de C<sub>34</sub> a C<sub>52</sub> en *Rhodococcus*, de C<sub>46</sub> a C<sub>60</sub> en *Nocardia*, de C<sub>46</sub> a C<sub>66</sub> en *Gordonia*, de C<sub>64</sub> a C<sub>78</sub> en *Tsukamurella*, de C<sub>60</sub> a C<sub>90</sub> en *Mycobacterium* y de hasta C<sub>100</sub> en *Segniliparus* (Marrakchi, Lanéelle y Daffé, 2014). Estructuralmente hablando, los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados  $\beta$ -hidroxilados cuyas colas hidrocarbonadas pueden comprender de C<sub>22</sub> a C<sub>90</sub> (**Ver Anexo 1**). Se distinguen dos tipos específicos de ácidos micólicos: los  $\alpha$ -micolatos que no contienen funciones oxigenadas, y los micolatos oxigenados. La  $\alpha$ -ramificación de los ácidos micólicos se conserva en todas las familias variando su longitud. Está compuesta por una cadena insaturada cuyo tamaño puede variar entre C<sub>20</sub> y C<sub>26</sub>. La  $\beta$ -ramificación puede variar de C<sub>40</sub> a C<sub>60</sub>, presentar más de un tipo de insaturación (p.e. dobles enlaces o anillos de ciclopropano), y presentar diferentes grupos funcionales como cetona, epoxido, metoxilo o carboxilo, los cuales a su vez definen la principal clasificación de los micolatos.

Los ácidos micólicos están presentes en todos los miembros del orden *Corynebacteria* con muy pocas excepciones (Daffé et al., 2017), son elementos claves en la estructura celular de las micobacterias, y cada especie micobacteriana posee una determinada composición de ácidos micólicos, razón por la cual han sido considerados marcadores taxonómicos (Secanella, 2011). Su presencia en la micomembrana confiere la arquitectura y resistencia características de las envolturas celulares que los poseen, así como un carácter altamente hidrofóbico (cabe notar que mientras más largos los ácidos micólicos de la micobacteria mayor es su impermeabilidad y que esta es muy alta en *M. tuberculosis*). La baja permeabilidad a compuestos hidrofílicos y resistencia a la deshidratación han demostrado ser críticos la supervivencia micobacteriana en el interior de las células del huésped (Legizamón, 2012). Los ácidos micólicos han sido asociados también a propiedades fisiológicas de las micobacterias. Los porcentajes de uno u otro tipo de ácido micólico y su distribución en la micomembrana han demostrado ser relevantes para entender cómo se disponen/agrupan las bacterias (Kalsum et al., 2017), en el entendimiento de la formación de macrófagos espumosos en los granulomas de TB, o en conocer mejor la patogenicidad

en general (para una revisión en detalle de los experimentos sobre la patogenicidad de *M. tuberculosis* referirse a Daffe et al., 2017).

### **3.3.1.d Características de los ácidos micocerósicos y micolipénicos**

Los ácidos **micocerósicos** son ácidos grasos de cadena larga multi-metilada presentes en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gastri*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum* y *M. Ulcerans* (Redman et al., 2009). Se encuentran principalmente como ceras dimicocerosato de tiocerol (PDIM) o glicosil fenol tiocerol, también llamados glicolípidos fenólicos (PGLs), siendo ambos factores de virulencia importante para *M. tuberculosis*. La familia de tiocerolos del complejo *M. tuberculosis* tiene principalmente componentes del tiocerol A C<sub>34</sub>-C<sub>36</sub>, tiocerol B C<sub>33</sub>-C<sub>35</sub> y tiodiolones C<sub>33</sub>-C<sub>35</sub> (Minnikin et al., 2015). La composición de los ácidos micocerósicos puede ser determinada por simple cromatografía de gases, pero para evitar confusión por tiempos de retención similares en muestras clínicas, hasta ahora en los estudios bioarqueológicos de TB se ha preferido el uso de SIM en NI-CI-GC-MS (Redman et al., 2009, Lee et al., 2015, Molnar et al., 2015). En el caso de *M. tuberculosis*, el patrón característico de micocerosatos corresponde a una cadena C<sub>29</sub> trimetilada y a cadenas C<sub>30</sub> y C<sub>32</sub> tetrametiladas. Si bien existe la posibilidad de que las muestras arqueológicas estén contaminadas con micobacterias del ambiente, como por ejemplo *M. kansasii* y *M. marinum*, se ha indicado que el perfil de micocerosato de *M. kansasii* posee una proporción menor de C<sub>32</sub> que *M. tuberculosis* y que *M. marinum* presenta un perfil principal de C<sub>27</sub> a diferencia del C<sub>29</sub> de *M. tuberculosis* (Redman et al., 2009).

Los ácidos **micolipénicos** parte corresponden a glicolípidos penta-acil trehalosas (PATs). El principal es el ácido micolipénico C<sub>27</sub>, ácido 2,4,6-trimetiltetracos-2-enoico. La estereoquímica del centro quiral del ácido micolipénico es (S), a diferencia de la de los ácidos micocerósicos que es (R). La identificación de ácidos micolipénicos en estudios bioarqueológicos de TB también ha sido mediante el uso de SIM en NI-CI GC-MS (Lee et al., 2015, Molnar et al., 2015). Los ácidos micolipénicos han sido caracterizados en varias cepas modernas de *M. tuberculosis* y en *M. canettii*, pero no en *M. kansasii* (Minnikin et al., 2015).

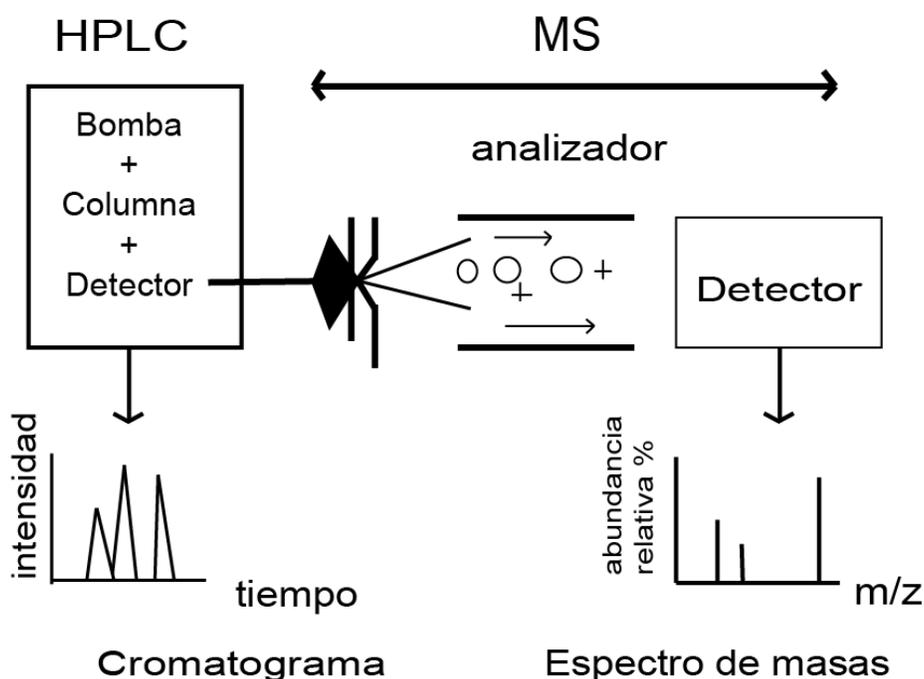
En síntesis, los ácidos micocerósicos de *M. tuberculosis* se presentan como específicos y por tanto como identificadores apropiados mientras que los ácidos micolipénicos pueden corresponder tanto a *M. tuberculosis* como a *M. canettii* y por tanto sirven como indicadores mas no identificadores. Por lo anterior y a fin de confirmar la presencia de *M. tuberculosis*/descartar la presencia de otras especies se requiere que ambos tipos de ácidos sean analizados en conjunto, considerando además los resultados de los análisis de ácidos micólicos.

### **3.3.2 Técnicas analíticas empleadas en la presente investigación**

Para el gran desafío analítico que presenta la detección de compuestos en bajas concentraciones en matrices complejas es necesario el uso de técnicas y equipos

confiables, con alto poder de resolución, sensibilidad y reproducibilidad (Martín y Ballesteros, 2008). A fin de familiarizar al lector y con el propósito de ofrecer una base explicativa que permita abordar luego la metodología, los resultados y las discusiones, a continuación, se describen brevemente las técnicas empleadas y las características del equipo utilizado en la presente investigación.

Las técnicas cromatográficas permiten la separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. El fundamento base de la cromatografía es la existencia de una fase estacionaria y una fase móvil. La muestra introducida en la fase móvil es transportada a lo largo de la fase estacionaria. Las distintas interacciones entre los componentes de la muestra introducida con la fase estacionaria generan diferencias en la velocidad en que son retenidas. Así, los solutos fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven más lento generando distintos tiempos de retención (Gomis-Yagües, 2008). Según la naturaleza de la fase móvil, las técnicas se clasifican en cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos (LC). Debido a que las técnicas cromatográficas por sí solas no permiten identificar los diferentes compuestos de una mezcla una vez separados, se vuelve relevante el acoplamiento entre un equipo cromatográfico y una técnica de carácter cualitativo capaz de realizar tal identificación. La técnica combinada más utilizada es la cromatografía acoplada a espectrometría de masas, la cual genera ambos procesos en simultáneo. Por ello en la presente investigación se utilizó un equipo de Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un espectrómetro de Masas (HPLC-MS) (**Figura 3.5**).



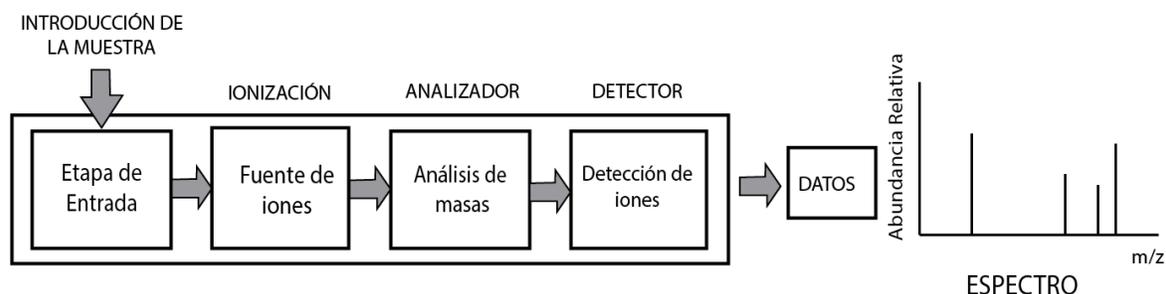
**Figura 3.5.** Esquema de un HPLC acoplado a MS y sus respuestas analíticas.  
(Modificado de Martín y Ballesteros, 2008)

Los espectrómetros de masas, por su parte, convierten la muestra en productos medibles que indican la molécula original. La información producida se denomina espectro de masas,

y corresponde a iones generados desde moléculas en fase gaseosa, los que se separan de acuerdo a la relación masa/carga ( $m/z$ ), y de los cuales se contabiliza según su intensidad (Martín y Ballesteros, 2008). Básicamente un espectrómetro de masas se compone de cuatro partes: un sistema de introducción de la muestra, una fuente de ionización, un analizador y un detector (**Figura 3.6**).

Los sistemas de introducción de muestras pueden ser directos (entrada directa de líquidos y sólidos no volatilizados), indirectos (la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la región de ionización) o especiales (en espectrómetros acoplados a técnicas de separación como electroforesis capilar o cromatografía de líquidos). En la presente investigación se usó un sistema especial acoplado a HPLC.

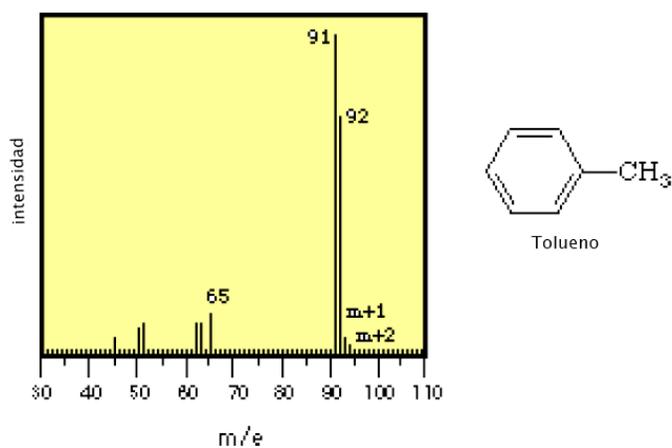
La adquisición de datos se realiza a través de sistemas de ionización, ya sea de fase gaseosa (la muestra se volatiliza y luego ioniza) o por desorción (la muestra se transforma directamente en iones gaseosos). Para biomarcadores lo común es utilizar ionización por desorción. En estos hay varios tipos: Ionización por electrospray (ESI), ionización por desorción láser (LDI), ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI), ionización por láser inducida en superficie (SELDI), bombardeo con átomos acelerados (FAB), e ionización por análisis directo en tiempo real. (DART). Ponderando sus buenos resultados al acoplarse a matrices de cromatografía líquida y debido a que es principalmente aplicada para caracterizar biomoléculas (Martín y Ballesteros, 2008), en la presente investigación se usó ionización por electrospray (ESI). El análisis por ESI se puede realizar provocando una ionización positiva o negativa: en esta investigación se utilizó la negativa.



**Figura 3.6.** Esquema de un espectrómetro de Masas y su respuesta analítica (Modificado de Calle, Chasiluisa, Carvajal y Herrera, 2015)

El analizador es la parte principal del espectrómetro de masas. Este conduce los iones desde la fuente de ionización hasta el detector, separa los iones según su relación masa/carga ( $m/z$ ) y selecciona iones actuando como un filtro. Existen distintos analizadores (sector magnético, cuadrupolar, trampa de iones, tiempo de vuelo, transformada de Fourier/ión ciclotrónico, Orbitrap, sistemas híbridos). En la presente investigación se usó un Orbitrap, el cual es un tipo de analizador por trampa de iones que utiliza atrapamiento orbital de los iones en un campo puramente electroestático contrarrestado por fuerza centrífuga (Abiá, Carrascal y Gay, 2008). Su alto poder de resolución ( $>150,000$ ) y excelente precisión de masa (2-5 ppm, o incluso 0.2 ppm bajo condiciones favorables), lo hacen recomendable para el análisis de biomoléculas en matrices complejas (Richard, Perry, Graham y Robert, 2008).

Finalmente, el detector registra la carga inducida o corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie. Existen distintos tipos de ellos (fotomultiplicadores, copa de Faraday y otros). El detector realiza el recuento de los iones separados por el analizador, generando un espectro de masas (**Figura 3.6**). Los espectros de masas (**Figura 3.7**) muestran la relación masa/carga ( $m/z$ ) de la molécula y sus fragmentos. Las abscisas (eje horizontal) indican las  $m/z$  y las ordenadas (eje vertical) indican la abundancia relativa, expresada como porcentaje. Debido a la cantidad de información que se genera, se necesita un sistema informático para el control del equipo, así como para la adquisición, almacenamiento y presentación de espectros.



**Figura 3.7.** Ejemplo de un espectro de masas: Tolueno.  
(Extraído de Ayala, 2004)

Al interpretar un espectro de masas el pico más intenso en el espectro se llama “pico base” y todos los demás se reportan en relación a la intensidad de este. Los picos son extremadamente delgados y comúnmente aparecen como líneas verticales (Ayala, 2004). El proceso de fragmentación ocurre siguiendo principios químicos simples y predecibles. Los iones que se forman representan los cationes y cationes radicales más estables que la molécula puede formar (Ayala, 2004). El ion molecular ( $M^+$ ) brinda la información más valiosa en el espectro. Su masa y composición elemental indican las fronteras dentro de las cuales se tienen que encontrar los fragmentos estructurales que se detecten. Presenta la misma masa que la molécula neutra y se refleja en el espectro como el pico molecular ( $M^+$ ). Es importante que siempre las diferencias de masa entre la señal del ion molecular y las señales correspondientes a iones de los fragmentos generados deben ser químicamente lógicas y reflejar partes de la molécula original.

## 4. Capítulo 4: Material y Métodos

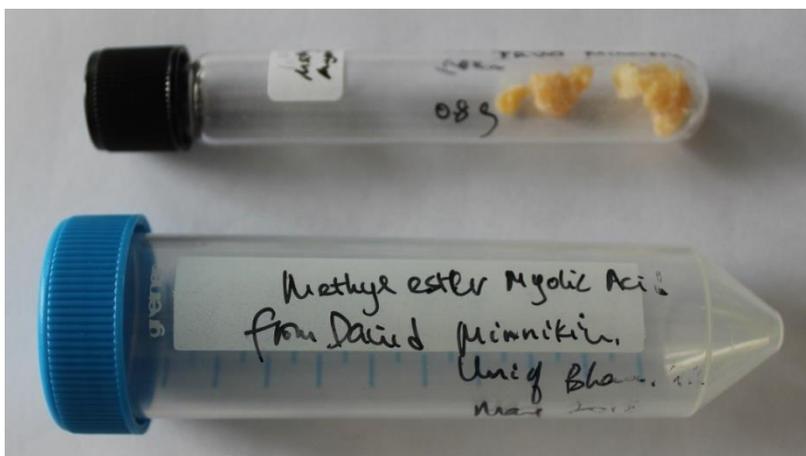
### 4.1 Materiales

#### 4.1.a Estándar de metil ester de ácidos micólicos (MAME)

Corresponde a un extracto de metil ester de ácidos micólicos que desde aquí y en adelante será catalogado como “estándar de metil ester de ácidos micólicos”. Este extracto (sólido café claro, 0.8 g) fue suministrado por el Dr. Minnikin (**Figura 4.1**).

#### 4.1.b Extracto de cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis*

Corresponde a un extracto de cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis* cepa C que desde aquí y en adelante será catalogado como “extracto de células de TB”. Este extracto (pellets de color café claro, 0.6 g) fue suministrado por el Dr. Minnikin (**Figura 4.2**).



**Figura 4.1.** Estándar de metil ester de ácidos micólicos (MAME)



**Figura 4.2.** Extracto de células de TB

#### 4.1.c Muestras óseas de la colección Cementerio General

Corresponde a muestras óseas de tres individuos de la colección Cementerio General (CG) de la Facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Chile (**Tabla 4.1**). La colección CG está conformada por los restos humanos de individuos que murieron y fueron enterrados en el Cementerio General (Santiago de Chile) entre las décadas de 1950 y 1970 (Lemp, Rodríguez, Retamal y Aspillaga, 2008). Dos de los individuos fueron seleccionados porque su causa de muerte (consignada en su certificado de defunción) fue debida a TB y

porque además presentan lesiones esqueléticas acordes y consistentes con esta patología (lesiones líticas sin recuperación/remodelación; mal de Pott). El otro individuo fue seleccionado porque su causa de muerte no fue debida a TB y porque no presenta ningún tipo de lesión en sus vértebras (control negativo). Se tomó una muestra de una vértebra torácica de cada uno. Las vértebras se cortaron con un mini taladro equipado con un disco de corte (marca Dremel, modelo 3000) utilizando guantes, mascarilla y antiparras como medida de seguridad. Las vértebras fueron fotografiadas antes de ser cortadas, en relación a su segmento, y por todas sus caras; y se volvieron a fotografiar luego de los cortes (vértebra cortada y fragmento de muestra) (**Figuras 4.3, 4.4 y 4.5**).

Nº Inv	Depósito; Módulo; Estante	Patio; Sepultura	Sexo	Edad	Causa de muerte	Lesiones TB	Material muestreado	Peso (g) muestra
B0219	3; III; 3.4	36; 1494	F	32	Meningitis /TBC	Mal de Pott	T10	0.49
B0063	3; I; 4.2	10; 1475	I	71	TBC pulmonar	Acuñaamiento de T10 y T11, con reacción activa	T11	1.07
B0068	3; I ; 4.2	36; 6	M	20-26	Herida bala en cráneo	-	T10	0.47

**Tabla 4.1.** Muestras de individuos de la colección Cementerio General (CG). Sexo: F, femenino; M, masculino; I, indeterminado.



**Figura 4.3.** Muestra de T10 del individuo B0219 de la colección CG: segmento T10-L2, vista lateral y vista inferior de T10 antes y después de la extracción



**Figura 4.4.** Muestra de T11 del individuo B0063 de la colección CG: segmento T7-T11, vista lateral y vista inferior de T11 antes y después de la extracción.



**Figura 4.5.** Muestra de T10 del individuo B0068 de la colección CG: segmento T8-T12, vista lateral y vista inferior de T10 antes y después de la extracción.

#### 4.1.d Colección Pisagua

Corresponde a muestras óseas de tres individuos momificados de cronología Formativa (900 AC-1000 DC) de la colección “Max Uhle de Pisagua” del Museo Nacional de Historia Natural de Chile (MNHN) (**Tabla 4.2**). Dicha colección se configuró a partir de los trabajos que Max Uhle realizó en Pisagua y Punta Pichalo (19°35´S y 70°13´W) entre 1912 y 1913 (Figura 4.20). Dos de los individuos fueron seleccionados por considerarse como posibles casos de TB (Silva, Pacheco, Bahamondez, Cabello y Olguín, 2016), el otro individuo sin lesiones fue seleccionado como control negativo. El control negativo (Individuo 3120) fue seleccionado por no presentar lesiones asociadas a TB. Se encontraba envuelto en totora y asociado a huesos de mamífero marino. Las muestras óseas de cada individuo se tomaron cortándola con un mini taladro equipado con un disco de corte (marca Dremel, modelo 3000) utilizando guantes, mascarilla y antiparras como medida de seguridad. Antes de ser cortados, se tomaron radiografías y fotografías de los huesos, así como también fueron fotografiadas las muestras en relación a su segmento o estructura de origen (**Figuras 4.6, 4.7 y 4.8**).

Nº Inv	Sector	Sexo	Edad	Lesiones TB	Material Muestreado	Peso (g) muestra
3089*	D	M	AM	lesión lítica en L3 y fusión de L4-L5	fíbula derecha	0.94
3097*	D	F	AJ	posibles nódulos calcificados en tórax, acuñaamiento de vertebras torácicas y lesiones mixtas (líticas y proliferativas) en costillas	fémur derecho	0.96
3120**	A	M	AM	-	tercio medio costilla izquierda	0.99

**Tabla 4.2.** Muestras de individuos de la colección Pisagua. \*posibles casos de TB; control negativo\*\*. Sexo: F, femenino; M, masculino. Edad: Adulto Joven; AM, Adulto Medio.



**Figura 4.6.** Muestra del individuo 3089 de Pisagua: fragmento proximal de la fíbula derecha.



**Figura 4.7.** Muestra del individuo 3097 de Pisagua: fragmento distal del fémur derecho.



**Figura 4.8.** Muestra del individuo 3120 de la colección Pisagua: fragmento de costilla izquierda.

#### 4.1.e Colección Pica 8

Corresponde a muestras óseas de cinco individuos de la colección Pica 8 con cronología del Intermedio Tardío del área (900-1450 DC), y actualmente conservada en la Facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Chile (**Tabla 4.3**). La colección Pica 8 se configuró a partir de los trabajos de Lautaro Núñez entre 1959 y 1965 en Pica (20°30'S and 69°20'W) (**Figura 4.20**). Los cinco individuos fueron seleccionados por presentar lesiones esqueléticas posiblemente causadas por TB (lesiones líticas sin recuperación/remodelación; mal de Pott) (Pacheco, 2015). Se tomó una muestra ósea de cada individuo. Los huesos se cortaron con un mini taladro equipado de disco de corte (marca Dremel, modelo 3000), utilizando guantes, mascarilla y antiparras como medida de seguridad. Antes de ser cortados, los huesos fueron fotografiados por todas sus caras. Los huesos de donde se extrajeron las muestras fueron documentados también mediante modelos tridimensionales (Tabla 4.3). Luego de los cortes los huesos se volvieron a fotografiar (hueso cortado y fragmento de muestra) (Figuras 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13).

N° Inv	Sexo	Edad	Lesiones TB	Material muestreado y modelos 3D	Peso (g) Muestra
B0418	F	Adol	Mal de Pott (T7-T9), fusión de los extremos vertebrales de las 8va y 9a costillas izquierdas, lesiones líticas en cabeza del humero derecho y en porción superior de la escapula derecha, lesión lítica en tercio proximal de ulna izquierda, periostitis en tercio distal de ulna izquierda, periostitis en costillas derechas (8-10)	<a href="#">L1/modelo</a>	0.7
B0438	F	AM	lesiones líticas en cuerpos de T8 a T12, en escotadura izquierda del manubrio, en 6ta escotadura costal izquierda del manubrio, en el borde esternal de la clavícula izquierda, en los extremos esternales de dos costillas, periostitis en cuatro costillas y en los tercios distales de ambas tibias	<a href="#">7a costilla izquierda/modelo</a>	0.6
B0439	F	AJ	Mal de Pott (T8 a T12), periostitis en superficies lateral y medial cercanas a la espina iliaca anterosuperior derecha, periostitis en costillas (5-10 izquierdas, y 6-8 derechas)	<a href="#">8a costilla izquierda/modelo</a>	0.9
B0469	M	AM	lesiones líticas en cuerpos de T12 y L1, en el borde inferior del acetábulo derecho, resorción y porosidad y periostitis en codo derecho (húmero distal, ulna y radio proximales)	<a href="#">L1/modelo</a>	1.3
B0644	pF	AJ	lesiones líticas en cuerpos de T9 y L4, y periostitis en costillas izquierdas (6-11)	<a href="#">L4/modelo</a>	0.9

**Tabla 4.3.** Muestras de individuos de la colección Pica 8. Sexo: F, femenino; pF, probable femenino; M, masculino. Edad: Adol, AJ, Adulto Joven; AM, Adulto Medio.



Figura 4.9. Muestra del individuo B0418 de Pica 8: fragmento de L1.



Figura 4.10. Muestra del individuo B0438 de la colección Pica 8: fragmento de séptima costilla izquierda



Figura 4.11. Muestra del individuo B0439 de la colección Pica 8: fragmento de octava costilla izquierda



Figura 4.12. Muestra del individuo B0469 de la colección Pica 8: fragmento de L1



Figura 4.13. Muestra del individuo B0644 de la colección Pica 8: fragmento de L4

#### 4.1.f Colección de El Olivar-Brillamar

Corresponde a muestras óseas de dos individuos recuperados del sitio “El Olivar-Brillamar” actualmente depositados en el Museo Arqueológico de La Serena (MALS) (**Tabla 4.4**). El sitio “El Olivar-Brillamar” fue excavado el 2010 en la desembocadura del río Elqui (29°54’ S y 71°15’ W) (**Figura 4.20**), y presenta una cronología del Periodo Medio (ca. 800-1000 DC) e Intermedio Tardío (ca. 1000-1450 DC). Los dos individuos fueron seleccionados por presentar lesiones esqueléticas posiblemente causadas por TB (lesiones líticas sin recuperación/remodelación; mal de Pott) (Pacheco, 2015). Se tomó una muestra ósea de cada individuo. Para ambos casos no fue necesario cortar los huesos, sino que usando guantes se tomó un fragmento recuperado en la excavación. Las muestras fueron fotografiadas (**Figuras 4.14 y 4.15**).

ID Institución	Sexo	Edad	Lesiones TB	Material	Peso (g) Muestra
Individuo 22, Sector D	F	AM	Mal de Pott (T1-T2), lesiones líticas en T9, y periostitis en costillas izquierdas (4-10) y costillas derechas bajas	tercio vertebral costilla derecha	1.9
Individuo 23, Sector D	M	AJ	lesiones líticas en T12 y L1	tercio vertebral costilla derecha	1.7

**Tabla 4.4.** Muestras de individuos del sitio “El Olivar-Brillamar”. Sexo: F, femenino; M, masculino. Edad: AJ, Adulto Joven; AM, Adulto Medio.



Figura 4.14. Muestra del individuo 22 del sitio “El Olivar-Brillamar”: fragmento de costilla derecha

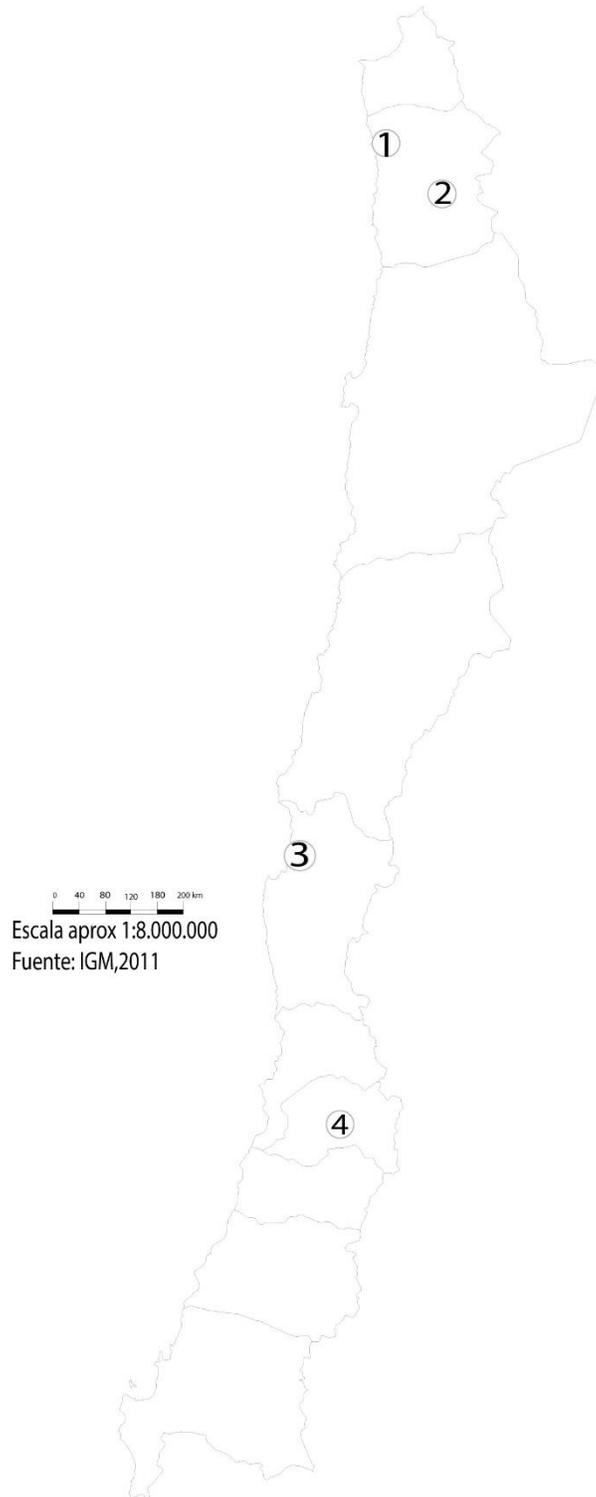


Figura 4.15. Muestra del individuo 23 de la colección del sitio “El Olivar-Brillamar”: fragmento de costilla derecha

La **Tabla 4.5** resume el conjunto de muestras analizadas con sus respectivos códigos asignados y con los cuales serán identificadas de aquí en adelante.

Colección/Sitio	ID Institución	Código Muestra
Cementerio General	B0219	BL-TBCG-01
Cementerio General	B0063	BL-TBCG-02
Cementerio General	B0068	BL-CG-03
Pisagua	3089	BL-TBPISA-02
Pisagua	3097	BL-TBPISA-03
Pisagua	3120	BL-PISA-04
Pica 8	B0418	BL-TBPI8-07
Pica 8	B0438	BL-TBPI8-08
Pica 8	B0439	BL-TBPI8-09
Pica 8	B0469	BL-TBPI8-10
Pica 8	B0644	BL-TBPI8-11
El Olivar-Brillamar	Ind 22, Sector D	BL-TBEOB-03
El Olivar-Brillamar	Ind 23, Sector D	BL-TBEOB-05

**Tabla 4.5.** Descripción de las muestras y su codificación en la presente memoria



**Figura 4.16.** Mapa mostrando la distribución geográfica de los sitios de procedencia de las muestras arqueológicas analizadas. 1. Pisagua; 2. Pica 8; 3. El Olivar; 4. Cementerio General.

## 4.2 Metodología

El trabajo comprendió las fases indicadas en el siguiente diagrama (Figura 4.17):

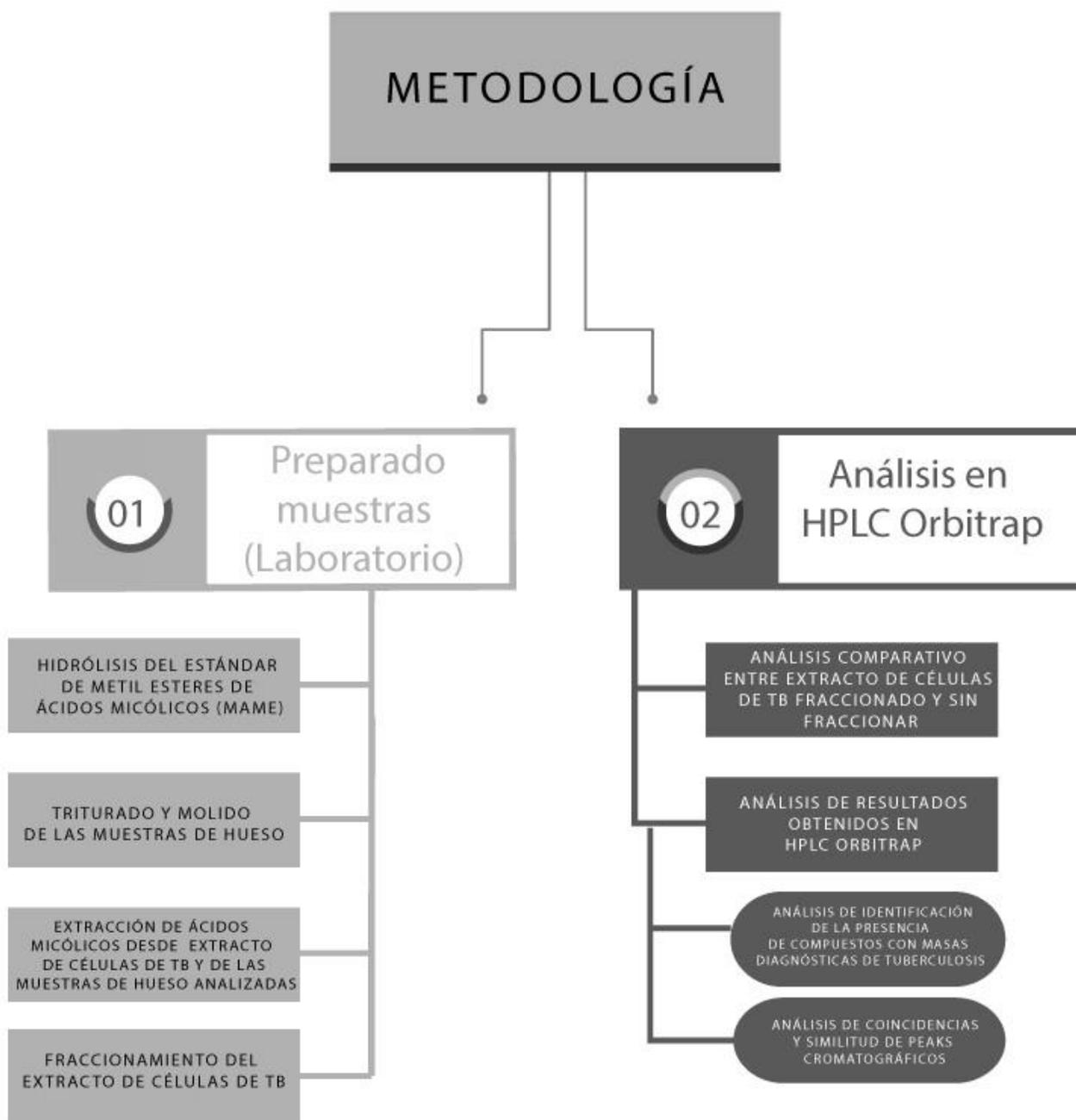


Figura 4.17. Diagrama de flujo de los procedimientos incluidos en la metodología.

### 4.2.a Hidrólisis del estándar de metil esteres de ácidos micólicos (MAME)

En un matraz Erlenmeyer se diluyó el estándar de metil esteres de ácidos micólicos (ca. 10 mg) en 1 mL de tolueno. Luego se agregó 2 mL de una solución acuosa de hidróxido de

potasio (KOH) al 60% y se agitó durante una hora. Luego la mezcla se vertió en un embudo de decantación y se separó en dos fases: una acuosa básica y una fase orgánica con los ácidos micólicos disueltos en tolueno. La fase acuosa básica se descartó, mientras que de la fase orgánica se eliminó el solvente mediante flujo de nitrógeno a 37°C y se almacenó en un vial de vidrio ámbar a 5°C.

#### **4.2.b Triturado y molido de las muestras de hueso**

Las muestras de hueso fueron trituradas con un alicate metálico lavado previamente con detergente y luego con agua destilada, e higienizado con cloroformo entre cada procedimiento. Luego fueron molidas y homogeneizadas utilizando morteros de porcelana.

#### **4.2.c Extracción de ácidos micólicos desde las muestras del extracto de células de *M. tuberculosis* y de las muestras de hueso analizadas**

Para realizar las extracciones de ácidos micólicos desde el extracto de células de TB se utilizó un procedimiento inédito indicado por el Dr. Minnikin. El procedimiento consistió en la incubación de las muestras de cultivos celulares de *M. tuberculosis* (ca. 20 mg) en 1 mL de tolueno en medio alcalino. Para ello la muestra de cultivo celular de *M. tuberculosis* fue traspasada a tubos de cultivo de 8.5 mL con tapa rosca de PTFE, y se adicionaron 2 mL de una solución de KOH en metanol al 10% y 1 mL de tolueno y fueron incubadas durante la noche a 100°C. Luego las muestras se enfriaron y a cada una se agregó 1 mL de una solución acuosa de HCl al 10%, y posteriormente se adicionó gota a gota HCl concentrado (27%) hasta llegar a un pH 1. Debido al carácter exotérmico de esta reacción, se utilizó un baño de hielo para enfriar los tubos durante este proceso. Posteriormente a cada muestra se le agregó 1 mL de tolueno, y fueron centrifugadas por 2 minutos a 2000 rpm generándose 2 fases (**Figura 4.18**). La fase orgánica superior se colectó en un nuevo tubo de cultivo, mientras que la fase acuosa se volvió a extraer dos veces con 1 mL de tolueno. Todos los extractos orgánicos se combinaron y se extrajeron con 1 mL de agua destilada en un embudo de decantación y luego el tolueno se evaporó usando corriente de nitrógeno en una placa calentadora a 37°C (**Figura 4.19**).

Las extracciones de las muestras de hueso siguieron el mismo procedimiento realizado para el extracto de células de TB, pero utilizando aprox. 60 mg de polvo de hueso seco (para cada muestra). Los extractos generados fueron analizados mediante cromatografía de capa fina en gel de sílice usando como sistema de solventes una mezcla de éter de petróleo/acetato de etilo (80:20) como fase móvil. Las placas cromatográficas se revelaron con ácido molibdofosfórico etanólico (MPA) al 5% calentado con una pistola de calor (**Figura 4.20**).



**Figura 4.18.** Fases generadas después del centrifugado.



**Figura 4.19.** Secado de las muestras por flujo de nitrógeno.



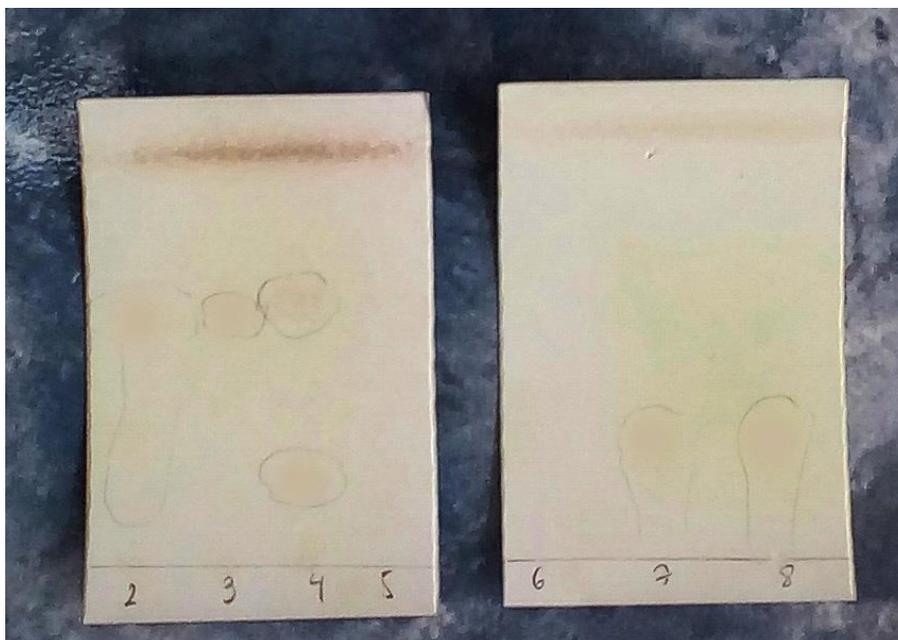
**Figura 4.20.** Cromatografía de capa fina del extracto de células de TB (A y B son duplicados de la misma muestra).

#### 4.2.c.1 Fraccionamiento del extracto de células de TB

Para evaluar la posible existencia de diferencias de resolución entre extracciones fraccionadas y no fraccionadas, los extractos de células de TB fueron fraccionados utilizando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) marca Supelco modelo 57062 Supelclean ENVI-18 SPE 100 mg de fase reversa. Para ello, los extractos de cultivo celular de *M. tuberculosis* fueron disueltos en 0.2 mL de éter dietílico y cargados en los cartuchos gota a gota. Durante este procedimiento se evitó en todo momento que el solvente penetrase bajo la superficie. Una vez que los cartuchos cargados con las muestras estaban secos se realizó el fraccionamiento usando el sistema de solventes puntual para cada fracción (**Tabla 4.6**). Cada fracción se analizó por cromatografía de capa fina del gel de sílice usando como fase móvil el sistema de elución compuesto por una mezcla éter de petróleo/acetato de etilo (80:20) y posteriormente la placa fue revelada con ácido molibdofosfórico etanólico (MPA) al 5% calentado con una pistola de calor (**Figura 4.21**).

Fracción	Agua destilada (mL)	Metanol (mL)	Tolueno (mL)	Tipo de compuestos presentes
1	0.4	1.1	0	-
2	0.2	1.3	0	Lípidos libres
3	0.2	1.3	0	Lípidos libres
4	0	1.5	0	Ácidos micocerósicos y micolipénicos libres + tioceroles
5	0	1.4	0.1	Ácidos micocerósicos y micolipénicos libres + tioceroles
6	0	1.3	0.2	-
7	0	0.7	0.7	Ácidos micólicos libres
8	0	0	1.5	Ácidos micólicos libres

**Tabla 4.6.** Sistema de elución usado para el fraccionamiento de los extractos de células de TB.



**Figura 4.21.** Placas cromatográficas de capa fina de las fracciones de los extractos de células de TB. Los números corresponden a las fracciones descritas en la Tabla 4.6.

#### 4.2.d Análisis en HPLC Orbitrap

Los análisis fueron realizados en un espectrómetro de masas *Thermo Q exactive focus* acoplado a un UHPLC *Thermo ultimate 3000*. Las muestras fueron solubilizadas en tolueno y luego 10 µL de cada una fueron inyectados. Las condiciones fueron 31.42 °C (temperatura del analizador), 0 eV como energía de ionización (baja velocidad), polaridad negativa, y columna en fase reversa. Con lo anterior se obtuvieron las espectrometrías en tándem (FTMS – p ESI) con un rango espectral de  $m/z$  100-1500.

El diseño experimental incluía el análisis del conjunto de preparados con un programa cromatográfico de 13.5 minutos y uno de 35 minutos para todas las muestras analizadas. Sin embargo por dificultades a nivel de laboratorio presentadas durante el transcurso de la investigación, así como problemas externos contextuales, esto no fue posible durante la duración de la misma. Finalmente, un conjunto de las muestras reportadas fue analizada con un programa de 13.5 minutos, mientras que otro conjunto fue analizado por 35 minutos. (Tabla 4.7).

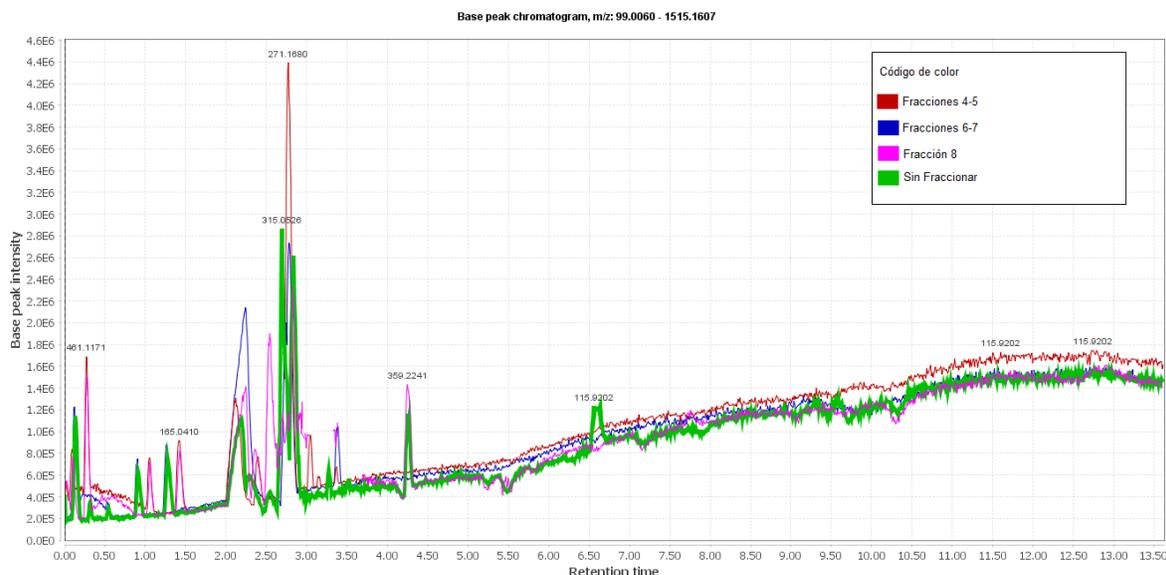
Colección/Sitio	ID Institución	Código Muestra	Programa cromatográfico (min)
Cementerio General	B0219	BL-TBCG-01	35
Cementerio General	B0063	BL-TBCG-02	35
Cementerio General	B0068	BL-CG-03	35
Pisagua	3089	BL-TBPISA-02	13.5
Pisagua	3097	BL-TBPISA-03	13.5
Pisagua	3120	BL-PISA-04	35
Pica 8	B0418	BL-TBPI8-07	13.5
Pica 8	B0438	BL-TBPI8-08	35
Pica 8	B0439	BL-TBPI8-09	13.5
Pica 8	B0469	BL-TBPI8-10	13.5
Pica 8	B0644	BL-TBPI8-11	35
El Olivar-Brillamar	Ind 22, Sector D	BL-TBEOB-03	13.5
El Olivar-Brillamar	Ind 23, Sector D	BL-TBEOB-05	13.5
Estándar de metal esteres de ácidos micólicos (MAME)	-	BL-EACMYC	35
Extracto de células de TB	-	BL-ECTB	13.5

**Tabla 4.7.** Programas cromatográficos de los preparados.

##### 4.2.d.1 Análisis comparativo entre extracto de células de TB fraccionado y sin fraccionar

Antes de comenzar a realizar los análisis, se puso a prueba la necesidad de fraccionar las muestras para el análisis de masas. Para ello se comparó la corrida cromatográfica del extracto directo (BL-ECTB) sin pasar por el proceso de fraccionamiento con las corridas cromatográficas de las fracciones generadas desde el extracto de células de TB. Para esto los cromatogramas generados se superpusieron en un mismo gráfico a fin de constatar la presencia de *peaks* significativos en diferentes tiempos de retención (Figura 4.22).

Al superponer los cromatogramas en diferentes tiempos de retención no se observó la presencia de *peaks* significativos en las fracciones que no estuviesen presentes en el extracto total. Los *peaks* se concentraron principalmente entre el minuto 1 y el minuto 3, y si bien su intensidad fue un poco superior en algunas ocasiones en las fracciones, estos estuvieron presentes de forma distinguishable en el extracto sin fraccionar. El comportamiento de las curvas fue en general muy similar, por lo que la separación cromatográfica generada por el proceso de fraccionamiento no se considera una mejora para la metodología utilizada en esta investigación.



**Figura 4.22.** Cromatograma total que incorpora curvas cromatográficas del extracto sin fraccionar y de las fracciones.

#### 4.2.e Análisis de resultados obtenidos en HPLC Orbitrap

Para obtener las masas exactas de los ácidos carboxílicos a buscar en el espectro de masas se dibujaron todas las moléculas de interés desde su fórmula molecular en el programa computacional ChemBioDraw versión 14 (Anexo 1), obteniéndose la masa exacta, el peso molecular y la  $m/z$ . Las fórmulas moleculares fueron obtenidas de Minnikin et al. (2012). De ellos se obtuvo finalmente el valor a utilizar el cual correspondió al valor de masa para el ion negativo, debido a que las muestras fueron corridas en modo de ionización negativo. Los datos obtenidos fueron tabulados para facilitar su visualización y comparación (**Tabla 4.8**). En la Tabla 4.8 se resaltan en color amarillo los ocho compuestos que se han considerado como biomarcadores diagnósticos de TB (Minnikin et al. 2012, Donoghue et al. 2017). De estos ocho compuestos, no pudo encontrarse soporte bibliográfico del espectro de masas del Micolipenato C<sub>27</sub>, y por lo tanto fue excluido de los análisis. Los otros siete compuestos seleccionados corresponden a los más utilizados y considerados más determinantes en investigaciones previas:  $\alpha$ -Micolato C<sub>78</sub>,  $\alpha$ -Micolato C<sub>80</sub>, Metoximicolato C<sub>85</sub>, Cetomicolato C<sub>87</sub>, Micocerosato C<sub>29</sub>, Micocerosato C<sub>30</sub>, Micocerosato C<sub>32</sub> (Minnikin et al., 2012).

Tipo de compuestos	Numero de carbonos	Compuesto	<i>m/z</i>	Peso molecular (g/mol)	Masa exacta (g/mol)
<b>Micolatos (ésteres metílicos de ácidos micólicos)</b>					
<b>α-micolatos (C76-82)</b>	C <sub>76</sub>	α-Micolato C <sub>76</sub>	1109	1110,017	1109,14285
	C <sub>77</sub>	α-Micolato C <sub>77</sub>			
	C <sub>78</sub>	α-Micolato C <sub>78</sub>	1137	1138,071	1137,17415
	C <sub>79</sub>	α-Micolato C <sub>79</sub>			
	C <sub>80</sub>	α-Micolato C <sub>80</sub>	1165	1166,125	1165,20545
	C <sub>81</sub>	α-Micolato C <sub>81</sub>			
	C <sub>82</sub>	α-Micolato C <sub>82</sub>	1275	1276,06702	1275,12704
<b>Metoximicolatos (C83-90)</b>	C <sub>83</sub>	Metoximicolato C <sub>83</sub>	1225	1226,221	1225,26296
	C <sub>84</sub>	Metoximicolato C <sub>84</sub>	1239	1240,248	1239,27861
	C <sub>85</sub>	Metoximicolato C <sub>85</sub>	1253	1254,275	1253,29426
	C <sub>86</sub>	Metoximicolato C <sub>86</sub>	1267	1268,302	1267,30991
	C <sub>87</sub>	Metoximicolato C <sub>87</sub>	1281	1282,329	1281,32556
	C <sub>88</sub>	Metoximicolato C <sub>88</sub>	1295	1296,356	1295,34121
	C <sub>89</sub>	Metoximicolato C <sub>89</sub>	1309	1310,383	1309,35686
	C <sub>90</sub>	Metoximicolato C <sub>90</sub>			
<b>Cetomicolatos (C84-89)</b>	C <sub>84</sub>	Cetomicolato C <sub>84</sub>	1237	1238,232	1237,26296
	C <sub>85</sub>	Cetomicolato C <sub>85</sub>	1251	1252,259	1251,27861
	C <sub>86</sub>	Cetomicolato C <sub>86</sub>	1265	1266,286	1265,29426
	C <sub>87</sub>	Cetomicolato C <sub>87</sub>	1279	1280,313	1279,30991
	C <sub>88</sub>	Cetomicolato C <sub>88</sub>	1293	1294,34	1293,32556
	C <sub>89</sub>	Cetomicolato C <sub>89</sub>	1307	1308,367	1307,34121
<b>Micolipenatos y micocerosatos</b>					
<b>Micolipenato (ésteres metílicos de ácidos micolipénicos)</b>	C <sub>27</sub>	Micolipenato C <sub>27</sub>	407	408,71100	408,39673
<b>Micocerosatos (ésteres metílicos de ácidos micocerósicos)</b>	C <sub>27</sub>	Micocerosato C <sub>27</sub>	409	410,72700	410,41238
	C <sub>29</sub>	Micocerosato C <sub>29</sub>	437	438,78100	438,44368
	C <sub>30</sub>	Micocerosato C <sub>30</sub>	451	452,80800	452,45933
	C <sub>32</sub>	Micocerosato C <sub>32</sub>	479	480,86200	480,49063

**Tabla 4.8.** Valores de *m/z*, peso molecular y masa exacta de las moléculas en estudio. En amarillo se destacan aquellos que se han considerado como biomarcadores diagnósticos de TB (Minnikin et al., 2012, Donoghue et al., 2017).

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa computacional MZmine versión 2.41.2 (Pluskal, Castillo, Villar-Briones y, Orešič, 2010), que se utiliza para procesar datos espectrométricos. Este programa permite gestionar los proyectos de análisis, importar datos generados por los equipos y procesarlos, la detección de *peaks*, su identificación y visualización. El conjunto de datos obtenidos fue abordado con MZmine mediante el proceso de *peak detection*. Este proceso se inició al generar los cromatogramas mediante el *ADAP chromatogram builder module* (Myers, Sumner, Li, Barnes y Du 2017) utilizando una intensidad mínima de 1.5E5 y una tolerancia de *m/z* 0.001 para abarcar la mayor cantidad posible de señales. Posteriormente se procedió al *chromatogram deconvolution* por ser el procedimiento recomendado para los cromatogramas generados por *ADAP*, el cual mediante el algoritmo Wavelets separa los *peaks* que pudieran estar agrupados. Finalmente se alinearon los cromatogramas generados con el *ADAP Aligner* manteniendo los parámetros elegidos anteriormente. Una vez que el programa arrojó los *peaks* detectados alineados, se procedió a extraerlas como una matriz de datos en CSV para ser procesada en planillas Excel. Debido a la condición exploratoria de este trabajo, los datos

de ambos conjuntos de muestras (con distintos tiempos de corrida cromatográfica) se analizaron mediante dos metodologías diferentes descritas a continuación.

#### 4.2.e.1 Análisis de identificación de la presencia de compuestos con masas diagnósticas de tuberculosis

En primer lugar, las muestras se evaluaron considerando los espectros de masas teóricos de los siete compuestos seleccionados como biomarcadores diagnósticos de TB (**Tabla 4.9**) recopilados de la literatura (Horst, Feringa y Minnaard, 2007; Shui et al, 2012; Kaneda, Imaizumi y Yano, 1995; Kaneda, Imaizumi, Mizuno, Baba, Tsukamura y Yano, 1988; Kaneda et al., 1986) Las masas escogidas correspondientes a los fragmentos ( $m/z$ ) del espectro de cada uno de los biomarcadores diagnósticos, fueron las siguientes:

$\alpha$ -Micolato C <sub>78</sub> ( $m/z$ 1136)	$\alpha$ -Micolato C <sub>80</sub> ( $m/z$ 1164)	Metoximicolato C <sub>85</sub> ( $m/z$ 1252)	Cetomicolato C <sub>87</sub> ( $m/z$ 1278)	Micocerosato C <sub>29</sub> ( $m/z$ 437)	Micocerosato C <sub>30</sub> ( $m/z$ 451)	Micocerosato C <sub>32</sub> ( $m/z$ 479)
339	339	871	510	237	251	279
367	367	513	539	265	279	307
368	395	484	897	279	293	321
395	396			307	321	349
397	425			321	335	363
755	783					

**Tabla 4.9.** Compuestos diagnósticos de TB y valores del ion negativo de los fragmentos más importantes en los espectros de masas de cada compuesto, listados por criterio ascendente de  $m/z$ .

Para el conjunto de muestras analizadas utilizando el programa cromatográfico de 13.5 minutos (**conjunto 1**), se consideró como referencia el extracto de células de TB (BL-ECTB), ya que fueron corridas en el mismo programa. Por otro lado, para el conjunto de muestras analizadas empleando el programa cromatográfico de 35 minutos (**conjunto 2**) se consideró como referencia el estándar de metil ester de ácidos micólicos hidrolizado (BL-EACMYC).

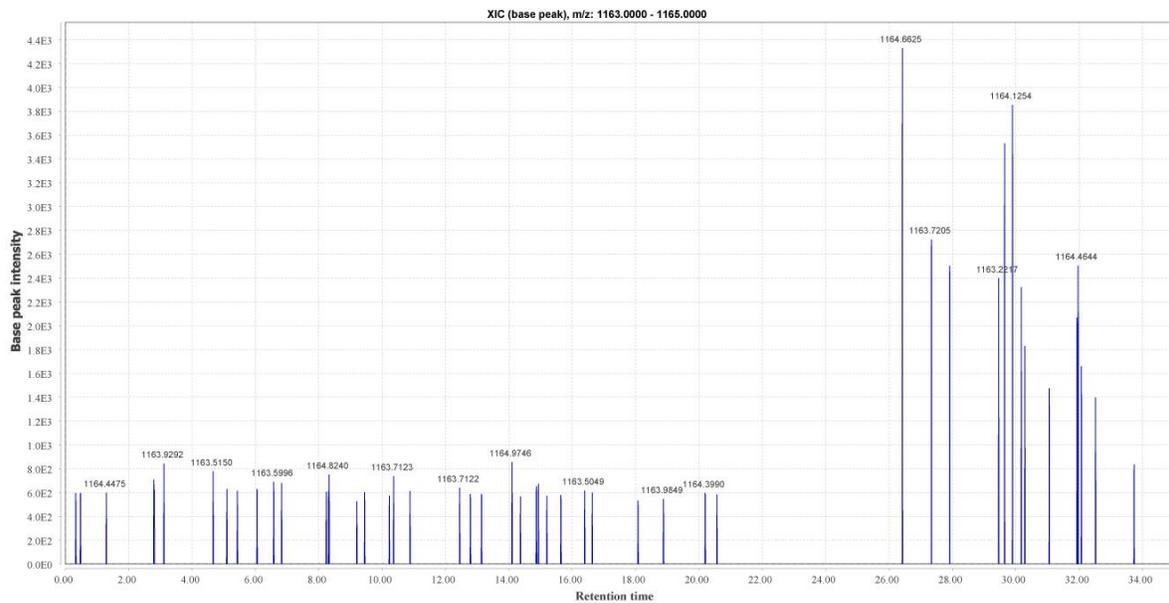
Una vez obtenidos los *peaks* alineados por *peak detection*, se procedió a buscar las  $m/z$  de los iones moleculares de los compuestos usando la opción de filtro por  $m/z$  del programa MZmine. Las  $m/z$  de los iones moleculares buscadas se listan en la siguiente tabla (**Tabla 4.10**):

Nombre	$m/z$
$\alpha$ -Micolato C <sub>78</sub>	1136
$\alpha$ -Micolato C <sub>80</sub>	1164
Metoximicolato C <sub>85</sub>	1252
Cetomicolato C <sub>87</sub>	1278
Micocerosato C <sub>29</sub>	437
Micocerosato C <sub>30</sub>	451
Micocerosato C <sub>32</sub>	479

**Tabla 4.10.**  $m/z$  de los iones moleculares buscadas.

De no encontrarse las  $m/z$  de los iones moleculares de los compuestos, estas se buscaron directamente en el espectro mediante la opción de filtro por  $m/z$  de MZmine (**Figura 4.23**). Lo anterior debido a que, si bien la lista de cromatogramas a analizar generada intentaba abarcar el máximo número de señales, algunos fueron leídos como ruido por presentar una intensidad demasiado baja (Bajo  $1.5E5$ ).

Para este nuevo grupo de *peaks* alineados por *peak detection*, se procedió nuevamente a buscar las  $m/z$  de los fragmentos de cada uno de los compuestos diagnósticos usando el filtro por  $m/z$  del programa con MZmine (**Figura 4.24**). Los fragmentos no encontrados mediante el filtro señalado fueron descartados.



**Figura 4.23.** Ejemplo del proceso de búsqueda del ion molecular del compuesto  $C_{80}$ ,  $m/z = 1164$  directamente en el espectro al no ser detectado mediante *peak detection*.

m/z	rt	peak	estado
339.21	25.45		●
367.18	23.99		●
367.18	29.90		●
367.21	25.52		●
367.21	23.99		●
395.26	28.30		●
396.09	28.77		●
396.09	30.65		●
396.09	30.65		●
425.32	28.62		●
783.49	28.45		●
783.49	25.45		●

**Figura 4.24.** Ejemplo de la búsqueda de las  $m/z$  de los fragmentos del compuesto  $C_{80}$ . El punto verde en la columna de estado señala la detección positiva del  $m/z$ .

La presencia del ion molecular y de varios otros fragmentos ( $m/z$ ) en un tiempo de retención similar se consideró como criterio diagnóstico de la presencia del compuesto. La intensidad relativa tanto del ion molecular como los otros fragmentos de estos no se consideró como relevante. La racionalidad de lo anterior pondera la utilidad de la técnica para la detección de los biomarcadores buscados en términos cualitativos, pero no necesariamente en términos cuantitativos. Esto pues no necesariamente mayores intensidades en los *peaks* de los espectros significan mayor cantidad de “tuberculosis” en las muestras. Por ello, los análisis se enfocan aquí como indicativos cualitativos de la presencia/ausencia de las moléculas buscadas y no cuantitativos de la cantidad de TB padecida por el individuo muestreado, o de si hay individuos con más TB que otros.

En síntesis, este primer paso metodológico analizó la presencia de  $m/z$  específicas esperadas (teóricas) considerando el criterio de tiempo de retención similares y no intensidades relativas.

#### 4.2.e.2 Análisis de coincidencias y similitud de *peaks* cromatográficos

En segundo lugar, se analizó la coincidencia en el tiempo de retención y la similitud de *peaks* cromatográficos ( $m/z$ ) para cada conjunto. Para el **conjunto 1** se consideró como referencia el extracto de células de TB (BL-ECTB), en tanto para el **conjunto 2** se consideró como referencia el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) hidrolizado. En ambos casos el procedimiento de análisis fue simultáneo. La premisa del análisis consideró que las muestras con tuberculosis deberían presentar mayor similitud con las referencias.

La matriz de datos se recopiló en un archivo con extensión \*. CSV para su procesamiento. Previamente, se establecieron los  $m/z$  y tiempos de retención de casi 4.000 variables para

el **conjunto 1** y de casi 10.000 variables para el **conjunto 2**. Cada una de las variables tomó un “*row ID*” (o fila) en las planillas de procesamiento de datos.

El primer filtro consideró como base o “*fingerprint*” de referencia el extracto de células de TB (BLECTB) para el **conjunto 1**, y el estándar de metil estéres de ácidos micólicos (BLECTB) para el **conjunto 2**. Este primer filtro redujo las casi 4.000 variables para el **conjunto 1** a 543 en tanto que las casi 10.000 variables del **conjunto 2** se redujeron a 916. Las 543 variables resultantes del primer filtro en el **conjunto 1** fueron luego sometidas a un segundo filtro, que consistió en identificar las coincidencias entre la referencia (extracto de células de TB, BL-ECTB) y las muestras de hueso de los individuos probablemente afectados por tuberculosis. Las variables no coincidentes fueron descartadas. Con lo anterior se configuró un grupo 197 de variables, las cuales se consideraron preliminarmente como de interés en la detección de TB (**Ver Anexo 2**).

Las 916 variables resultantes del primer filtro en el **conjunto 2** fueron también sometidas a un segundo filtro, que consistió en identificar las coincidencias entre el compuesto de referencia (estándar de metil estéres de ácidos micólicos, BL-EACMYC) y las muestras de hueso de los individuos probablemente afectados por tuberculosis. Las variables no coincidentes fueron descartadas. Con lo anterior se configuró un grupo 179 de variables. (**Ver anexo 2**) Al notar que algunas de estas variables se detectaron en individuos no tuberculosos (controles negativos) se decidió hacer un tercer filtro que consistió en remover aquellas variables presentes (detectadas) en los controles. Así, se estableció un grupo de variables coincidentes únicamente entre la referencia y los individuos probablemente afectados por tuberculosis, las cuales deberían ponderarse como importantes en la detección de TB. Este grupo de variables correspondió a un total de 109 variables.

## Capítulo 5: 5. Resultados

### 5.1 Análisis de identificación de la presencia de compuestos con *m/z* diagnósticos de tuberculosis

Las muestras se evaluaron mediante la función *peak detection* del programa MZmine utilizando espectros de masas teóricos de los siete compuestos seleccionados como biomarcadores diagnósticos de tuberculosis recopilados de la bibliografía (ver **Tabla 4.9**). Como se indicó en la metodología, al no encontrarse una de las *m/z* de los fragmentos, esta se buscó directamente en el espectro mediante el filtro por *m/z*. Para el **conjunto 1** (programa cromatográfico de 13.5 minutos) se consideró como referencia el extracto de células de TB (BL-ECTB), en tanto para el **conjunto 2** (programa cromatográfico de 35 minutos) se consideró como referencia el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC). Para la investigación se consideró que todos los tiempos de retención detectados durante un intervalo de 1 segundo de tiempo de retención corresponderían a un mismo tiempo de retención dentro de ambos programas cromatográficos. Las detecciones generadas para cada molécula en las referencias utilizadas y en las muestras analizadas se indican a continuación en las tablas de resumen.

#### 5.1.a Conjunto 1

### 5.1.a.1 Análisis de ácidos micólicos

Los resultados del análisis del compuesto  $C_{78}$  se indican en la **Tabla 5.1**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el extracto de células de TB (BL-ECTB), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo para todas las muestras excepto BL-TBPISA-03.

Los *peaks* para los valores de  $m/z$  368, 395, y 755 no fueron encontrados en el extracto de células de TB (BL-ECTB), por lo que no fueron considerados. El valor de  $m/z$  de uno de los tres fragmentos hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fue hallado en las muestras BL-TBPISA-03 y BL-TBEOB-05.

$C_{78}$ (1136 g/mol)	$m/z$ fragmentos						$m/z$ ion molecular
	339	367	368	395	397	755	1136
RT (min)	2	2	-	-	9	-	2
BL-ECTB	1	1	-	-	1	-	1
BL-TBPISA-02	0	0	-	-	0	-	1
BL-TBPISA-03	0	1	-	-	0	-	0
BL-TBPI8-07	0	0	-	-	0	-	1
BL-TBPI8-09	0	0	-	-	0	-	1
BL-TBPI8-10	0	0	-	-	0	-	1
BL-TBEOB-03	0	0	-	-	0	-	1
BL-TBEOB-05	1	0	-	-	0	-	1

**Tabla 5.1.** Resultados de la presencia del ion molecular (1136, destacado en la tabla) y de los fragmentos de  $C_{78}$  en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto  $C_{80}$  se indican en la **Tabla 5.2**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el extracto de células de TB (BL-ECTB), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo para todas las muestras excepto BL-TBPISA-03.

Los *peaks* para los valores de  $m/z$  395, 396, 425 y 783 no fueron encontrados en el extracto de células de TB (BL-ECTB), por lo que no fueron considerados. El valor de  $m/z$  de uno de los dos fragmentos hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fue hallado en las muestras BL-TBPISA-03 y BL-TBEOB-05.

$C_{80}$ (1164 g/mol)	$m/z$ fragmentos						$m/z$ ion molecular
	339	367	395	396	425	783	1164
RT (min)	2	2	-	-	-	-	2
BL-ECTB	1	1	-	-	-	-	1
BL-TBPISA-02	0	0	-	-	-	-	1
BL-TBPISA-03	0	1	-	-	-	-	0
BL-TBPI8-07	0	0	--	-	-	-	1
BL-TBPI8-09	0	0	-	-	-	-	1
BL-TBPI8-10	0	0	-	-	-	-	1
BL-TBEOB-03	0	0	-	-	-	-	1

BL-TBEOB-05	1	0	-	-	--	-	1
-------------	---	---	---	---	----	---	---

**Tabla 5.2.** Resultados de la presencia del ion molecular (1164, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>80</sub> en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>85</sub> se indican en la **Tabla 5.3**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el extracto de células de TB (BL-ECTB), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo únicamente en la muestra BL-TBPISA-02.

Los *peaks* para los valores de  $m/z= 484$  y  $871$  no fueron encontrados en el extracto de células de TB (BL-ECTB), por lo que no fueron considerados. El valor de  $m/z$  del fragmento hallado en el extracto de células de TB (BL-ECTB) no fue hallado en ninguna de las muestras.

C <sub>85</sub> (1252 g/mol)	m/z fragmentos			m/z Ion molecular
	484	513	871	1252
RT (min)	-	4	-	1
BL-ECTB	-	1	-	1
BL-TBPISA-02	-	0	-	1
BL-TBPISA-03	-	0	-	0
BL-TBPi8-07	-	0	-	0
BL-TBPi8-09	-	0	-	0
BL-TBPi8-10	-	0	-	0
BL-TBEOB-03	-	0	-	0
BL-TBEOB-05	-	0	-	0

**Tabla 5.3.** Resultados de la presencia del ion molecular (1252, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>85</sub> en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras analizadas del conjunto 1. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>87</sub> se indican en la **Tabla 5.4**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el extracto de células de TB (BL-ECTB), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo en todas las muestras.

Los *peaks* para los valores de  $m/z 510$ ,  $539$  y  $897$  no fueron encontrados en el extracto de células de TB (BL-ECTB), por lo que no fueron considerados.

C <sub>87</sub> (1278 g/mol)	m/z fragmentos			m/z Ion molecular
	510	539	897	1278
RT (min)	-	-	-	1
BL-ECTB	-	-	-	1
BL-TBPISA-02	-	-	-	1
BL-TBPISA-03	-	-	-	1
BL-TBPi8-07	-	-	-	1
BL-TBPi8-09	-	-	-	1
BL-TBPi8-10	-	-	-	1
BL-TBEOB-03	-	-	-	1
BL-TBEOB-05	-	-	-	1

**Tabla 5.4.** Resultados de la presencia del ion molecular (1278, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>87</sub> en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras analizadas del conjunto 1. RT: Tiempo de Retención.

### 5.1.a.2 Análisis de ácidos micocerósicos

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>29</sub> se indican en la **Tabla 5.5**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el extracto de células de TB (BL-ECTB), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo en cinco de las muestras: BL-TBPISA-02, BL-TBPI8-07, BL-TBPI8-09, BL-TBPI8-10 y BL-TBEOB-03.

El *peak* para el valor de *m/z* 307 no fue encontrado en el extracto de células de TB (BL-ECTB), por lo que no fue considerado. Los valores de *m/z* de uno de los tres fragmentos hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fueron hallados en las muestras BL-TBPISA-02, BL-TBPISA-03, BL-TBPI8-07, y BL-TBEOB-03.

C <sub>29</sub> (437 g/mol)	m/z fragmentos					m/z Ion molecular
	237	265	279	307	321	437
RT (min)	2	12	2	-	2	2
BL-ECTB	1	1	1	-	1	1
BL-TBPISA-02	1	0	0	-	0	1
BL-TBPISA-03	1	0	0	-	0	0
BL-TBPI8-07	1	0	0	-	0	1
BL-TBPI8-09	0	0	0	-	0	1
BL-TBPI8-10	0	0	0	-	0	1
BL-TBEOB-03	0	1	0	-	0	0
BL-TBEOB-05	0	0	0	-	0	1

**Tabla 5.5.** Resultados de la presencia del ion molecular (437, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>29</sub> en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>30</sub> se indican en la **Tabla 5.6**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el extracto de células de TB (BL-ECTB), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo en tres de las muestras: BL-TBPISA-02, BL-TBPI8-09 y BL-TBEOB-03.

El *peak* para el valor de *m/z* 251 no fue encontrado en el extracto de células de TB (BL-ECTB), por lo que no fue considerado. Los valores de *m/z* de uno de los cuatro fragmentos hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fueron hallados en las muestras BL-TBPISA-02, BL-TBPI8-07, y BL-TBPI8-09.

C <sub>30</sub> (451 g/mol)	m/z fragmentos					m/z Ion molecular
	251	279	293	321	335	451
RT (min)	-	2	2	2	2	2
BL-ECTB	-	1	1	1	1	1
BL-TBPISA-02	-	0	1	0	0	1
BL-TBPISA-03	-	0	0	0	0	0

BL-TBPi8-07	-	0	0	0	1	0
BL-TBPi8-09	-	0	0	0	0	1
BL-TBPi8-10	-	0	1	0	0	0
BL-TBEOB-03	-	0	0	0	0	1
BL-TBEOB-05	-	0	0	0	0	0

**Tabla 5.6.** Resultados de la presencia del ion molecular (451, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>30</sub> en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>32</sub> se indican en la **Tabla 5.7**.

El ion molecular fue detectado por *peak detection* sólo en el extracto de células de TB (BLECTB).

El *peak* para el valor de *m/z* 307 no fue encontrado en el extracto de células de TB (BL-ECTB), por lo que no fue considerado. Los valores de *m/z* de uno de los cuatro fragmentos hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fueron hallados en las muestras BL-TBPi8-09 y BL-TBEOB-03.

C <sub>32</sub> (479 g/mol)	m/z fragmentos					m/z Ion molecular
	279	307	321	349	363	479
RT (min)	2	-	2	5	2	2
BL-ECTB	1	-	1	1	1	1
BL-TBPISA-02	0	-	0	0	0	0
BL-TBPISA-03	0	-	0	0	0	0
BL-TBPi8-07	0	-	0	0	0	0
BL-TBPi8-09	0	-	0	0	0	0
BL-TBPi8-10	0	-	0	0	1	0
BL-TBEOB-03	0	-	0	0	1	0
BL-TBEOB-05	0	-	0	0	0	0

**Tabla 5.7.** Resultados de la presencia del ion molecular (479, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>32</sub> en el extracto de células de TB (BL-ECTB) y en las muestras del conjunto 1. RT: Tiempo de Retención.

## 5.1.b Conjunto 2.

### 5.1.b.1 Análisis de ácidos micólicos

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>78</sub> se indican en la **Tabla 5.8**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo para las muestras BL-TBCG-01, BL-CG-03 y BL-TBPi8-11.

El *peak* para el valor de *m/z* 755 no fue encontrado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), por lo que no se consideró. Los valores de *m/z* de los cinco fragmentos hallados en el BL-EACMYC se encontraron en cuatro de las muestras (BL-CG-03, BL-PISA-04, BL-TBPi8-08, y BL-TBPi8-11). En la muestra BL-TBCG-01 se hallaron tres

de los cinco fragmentos hallados en BL-EACMYC, y dos de estos fueron hallados en la muestra BL-TBCG-02.

<b>C<sub>78</sub></b> <b>(1136 g/mol)</b>	<b>m/z fragmentos</b>						<b>m/z ion molecular</b>
	339	367	368	395	397	755	1136
RT (min)	25	25	25	28	26	-	27
BLEACMYC	1	1	1	1	1	-	1
BL-TBCG-01	1	0	1	1	0	-	1
BL-TBCG-02	0	1	1	0	0	-	0
BL-CG-03	1	1	1	1	1	-	1
BL-PISA-04	1	1	1	1	1	-	0
BL-TBPI8-08	1	1	1	1	1	-	0
BL-TBPI8-11	1	1	1	1	1	-	1

**Tabla 5.8.** Resultados de la presencia del ion molecular (1136, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>78</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>80</sub> se indican en la **Tabla 5.9**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo para las muestras BL-TBCG-01, BL-CG-03 y BL-TBPI8-11.

El *peak* para el valor de *m/z* 783 no fue encontrado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), por lo que no se consideró. Los valores de *m/z* de los cinco fragmentos hallados en el BL-EACMYC se encontraron en tres de las muestras: BL-PISA-04, BL-CG-03, BL-TBPI8-11. En la muestra BL-TBPI8-08 se hallaron cuatro de los cinco fragmentos hallados en el BL-EACMYC, y tres de estos fueron hallados en las muestras BL-TBCG-01 y BL-TBCG-02.

<b>C<sub>80</sub></b> <b>(1164 g/mol)</b>	<b>m/z fragmentos</b>						<b>m/z ion molecular</b>
	339	367	395	396	425	783	1164
RT (min)	25	25	28	30	28	-	29
BLEACMYC	1	1	1	1	1	-	1
BL-TBCG-01	1	0	1	0	1	-	1
BL-TBCG-02	0	1	0	1	1	-	1
BL-CG-03	1	1	1	1	1	-	1
BL-PISA-04	1	1	1	1	1	-	0
BL-TBPI8-08	1	1	1	0	1	-	0
BL-TBPI8-11	1	1	1	1	1	-	1

**Tabla 5.9.** Resultados de la presencia del ion molecular (1164, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>80</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>85</sub> se indican en la **Tabla 5.10**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo en las muestras BL-CG-03 y BL-TBPI8-08.

El *peak* para el valor de  $m/z$  871 no fue encontrado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), por lo que no se consideró. Los dos valores de  $m/z$  hallados en el BL-EACMYC se encontraron sólo en la muestra BL-TBCG-02.

<b>C<sub>85</sub></b> <b>(1252 g/mol)</b>	<b><math>m/z</math></b> <b>fragmentos</b>			<b><math>m/z</math> Ion</b> <b>molecular</b>
	483	513	871	1252
RT (min)	-	-	-	27
BL-EACMYC	1	1	-	1
BL-TBCG-01	0	0	-	0
BL-TBCG-02	1	1	-	0
BL-CG-03	0	0	-	1
BL-PISA-04	0	0	-	0
BL-TBPI8-08	0	0	-	1
BL-TBPI8-11	0	0	-	0

**Tabla 5.10.** Resultados de la presencia del ion molecular (1252, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>85</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>87</sub> se indican en la **Tabla 5.11**.

El ion molecular no fue detectado por *peak detection* ni siquiera en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), así que se obtuvo directamente del espectro. El ion molecular fue detectado del mismo modo para las muestras BL-CG-03 y BL-TBPI8-08 y BL-TBCG-02.

Los *peaks* para los valores de  $m/z$  539 y 897 no fueron encontrados en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), por lo que no se consideraron. El valor de  $m/z$  hallado en el BL-EACMYC se encontró sólo en las muestras BL-TBCG-02 y BL-CG-03.

<b>C<sub>87</sub></b> <b>(1278 g/mol)</b>	<b><math>m/z</math></b> <b>fragmentos</b>			<b><math>m/z</math> Ion</b> <b>molecular</b>
	510	539	897	1278
RT (min)	29	-	-	27
BL-EACMYC	1	-	-	1
BL-TBCG-01	0	-	-	0
BL-TBCG-02	1	-	-	1
BL-CG-03	1	-	-	1
BL-PISA-04	0	-	-	0
BL-TBPI8-08	0	-	-	1
BL-TBPI8-11	0	-	-	0

**Tabla 5.11.** Resultados de la presencia del ion molecular (1278, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>87</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2. RT: Tiempo de Retención.

### 5.1.b.2 Análisis de ácidos micocerósicos

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>29</sub> se indican en la **Tabla 5.12**.

El ion molecular fue detectado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las seis muestras.

El *peak* para el valor de  $m/z$  307 no fue encontrado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), por lo que no se consideró. En la muestra BL-CG-03 se hallaron tres de los cinco fragmentos hallados en el BL-EACMYC, dos de estos fueron hallados en las muestras BL-PISA-04, BL-TBCG-02, y BL-TBPi8-11. En BL-TBCG-01 y BL-TBPi8-08 sólo se halló un fragmento.

C <sub>29</sub> (437 g/mol)	m/z fragmentos					m/z Ion molecular
	237	265	279	307	321	437
RT (min)	23	29	26	-	25	23
BL-EACMYC	1	1	1	-	1	1
BL-TBCG-01	0	0	0	-	1	1
BL-TBCG-02	0	1	1	-	0	1
BL-CG-03	1	1	1	-	0	1
BL-PISA-04	1	0	0	-	1	1
BL-TBPi8-08	0	0	0	-	1	1
BL-TBPi8-11	0	0	1	-	1	1

**Tabla 5.12.** Resultados de la presencia del ion molecular (437, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>29</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>30</sub> se indican en la **Tabla 5.13**.

El ion molecular fue detectado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las seis muestras.

El *peak* para el valor de  $m/z$  321 no fue encontrado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), por lo que no se consideró. Los valores de  $m/z$  de los cuatro fragmentos hallados en el BL-EACMYC se encontraron en BL-TBCG-02. Dos de los fragmentos fueron encontrados en BL-TBCG-01, BL-CG-03, BL-PISA-04, BL-TBPi8-08, y BL-TBPi8-11.

C <sub>30</sub> (451 g/mol)	m/z fragmentos					m/z Ion molecular
	251	279	293	321	335	451
RT (min)	29	26	23	-	19	27
BL-EACMYC	1	1	1	-	1	1
BL-TBCG-01	0	0	1	-	1	1
BL-TBCG-02	1	1	1	-	1	1
BL-CG-03	0	1	1	-	0	1
BL-PISA-04	1	0	1	-	0	1
BL-TBPi8-08	0	0	1	-	1	1
BL-TBPi8-11	0	1	1	-	0	1

**Tabla 5.13.** Resultados de la presencia del ion molecular (451, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>30</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2. RT: Tiempo de Retención.

Los resultados del análisis del compuesto C<sub>32</sub> se indican en la **Tabla 5.14**.

El ion molecular fue detectado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en cinco de las muestras. No se encontró en BL-CG-03

El *peak* para el valor de  $m/z$  307 no fue encontrado en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), por lo que no se consideró. Los valores de  $m/z$  de tres de los fragmentos hallados en el BL-EACMYC fueron encontrados en BL-PISA-04, BL-TBPI8-08 Y BL-TBPI8-11.

C <sub>32</sub> (479 g/mol)	m/z fragmentos					m/z Ion molecular
	279	307	321	349	363	479
RT (min)	26	-	25	25	27	25
BL-EACMYC	1	-	1	1	1	1
BL-TBCG-01	0	-	1	1	0	1
BL-TBCG-02	1	-	0	0	1	1
BL-CG-03	1	-	0	1	1	0
BL-PISA-04	0	-	1	1	1	1
BL-TBPI8-08	0	-	1	1	1	1
BL-TBPI8-11	1	-	1	0	1	1

**Tabla 5.14.** Resultados de la presencia del ion molecular (479, destacado en la tabla) y de los fragmentos de C<sub>32</sub> en el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y en las muestras del conjunto 2. RT: Tiempo de Retención.

## 5.2 Análisis de coincidencias y similitud de *peaks* cromatográficos

### 5.2.a Conjunto 1

Las muestras analizadas con el programa cromatográfico de 13.5 min constituyen un solo grupo que incluye las muestras arqueológicas y el extracto de células de TB (BL-ECTB) el cual no fue separado pues no se corrieron controles.

En el extracto de células de TB se encontraron 543 señales de  $m/z$  que luego del primer filtro (dejar solo aquellas que tuviesen alguna coincidencia entre el extracto de células de TB y alguna de las siete muestras arqueológicas) se redujeron a 197. De estas 197 detecciones, el nivel de coincidencias entre el extracto de células de TB y las muestras fue en general bastante alto. Las muestras con mayor número de coincidencias correspondieron a BL-TBPI8-09 y BL-TBEOB-05, con 133 y 126 respectivamente. La muestra BL-TBEOB-03 mostró 116, la BL-TBPISA-02 registró 113 y para la BL-TBPI8-10 se contabilizaron 111. Las muestras con menos coincidencias fueron la BL-TBPI8-07 ( $n = 49$ ) y la BL-TBPISA-03 ( $n = 20$ ).

Debido al gran rango de diferencia observado entre el valor máximo y mínimo de coincidencias (Diferencia = 113), en vez del promedio (95.4) resulta mejor utilizar la mediana de las coincidencias (valor = 113.5) para expresar un índice de coincidencias. Ponderando, lo anterior resulta un 57% (113.5 de 197) de coincidencias entre las señales de  $m/z$  obtenidas en el extracto de células de TB y las muestras.

Solo una  $m/z$  presentó coincidencias entre el extracto de células de TB y todas las muestras ( $m/z = 299$ ,  $RT = 0.32$ ). Un total de 12  $m/z$  fueron coincidentes entre el extracto de células de TB y seis muestras, en tanto que 65  $m/z$  coincidieron entre el extracto de células de TB y cinco muestras (**Tabla 5.15**). Sumando lo anterior, las coincidencias entre el extracto de células de TB y las siete muestras analizadas se elevan a 77 de las 197.

$m/z$	BL-TBPISA-02	BL-TBPISA-03	BL-TBPI8-07	BL-TBPI8-09	BL-TBPI8-10	BL-TBEOB-03	BL-TBEOB-05	Muestras coincidentes
121.02	0	0	1	1	1	1	1	5
137.02	0	0	1	1	1	1	1	5
138.01	0	0	1	1	1	1	1	5
149.01	1	0	0	1	1	1	1	5
149.01	1	0	0	1	1	1	1	5
165.04	1	0	0	1	1	1	1	5
239.06	1	0	0	1	1	1	1	5
250.14	1	1	1	1	1	0	1	6
271.22	1	0	0	1	1	1	1	5
271.22	1	0	1	1	1	1	1	6
271.22	1	0	0	1	1	1	1	5
297.04	1	0	0	1	1	1	1	5
297.24	1	1	1	1	1	0	0	5
299.26	1	1	1	1	1	1	1	7
299.26	1	0	1	1	1	1	1	6
313.07	1	0	0	1	1	1	1	5
313.07	1	0	0	1	1	1	1	5
409.20	1	0	1	1	0	1	1	5
409.20	1	0	0	1	1	1	1	5
415.17	1	0	0	1	1	1	1	5
443.20	1	0	0	1	1	1	1	5
445.08	1	0	0	1	1	1	1	5
445.08	1	0	0	1	1	1	1	5
461.11	1	0	0	1	1	1	1	5
461.11	1	0	0	1	1	1	1	5
461.11	1	0	0	1	1	1	1	5
462.11	1	0	0	1	1	1	1	5
462.11	1	0	0	1	1	1	1	5
463.11	1	0	0	1	1	1	1	5
463.11	1	0	0	1	1	1	1	5
464.11	1	0	0	1	1	1	1	5
464.11	1	0	0	1	1	1	1	5
507.12	1	0	0	1	1	1	1	5
507.12	1	0	0	1	1	1	1	5
508.12	1	0	0	1	1	1	1	5
508.12	1	0	0	1	1	1	1	5
509.12	1	0	0	1	1	1	1	5
509.12	1	0	0	1	1	1	1	5
521.08	1	0	0	1	1	1	1	5
521.08	1	0	0	1	1	1	1	5
521.08	1	1	0	1	1	1	1	6
522.08	1	0	0	1	1	1	1	5
522.08	1	0	0	1	1	1	1	5
523.08	1	0	0	1	1	1	1	5
523.08	1	0	0	1	1	1	1	5
535.10	1	0	1	1	1	1	1	6
535.10	1	0	0	1	1	1	1	5
535.10	0	1	1	0	1	1	1	5
535.10	1	0	0	1	1	1	1	5
536.10	1	0	1	1	1	1	1	6
536.10	1	0	0	1	1	1	1	5
567.09	1	0	0	1	1	1	1	5
567.09	1	0	0	1	1	1	1	5
568.09	1	0	0	1	1	1	1	5
568.09	1	0	0	1	1	1	1	5

569.08	1	0	0	1	1	1	1	5
569.08	1	0	0	1	1	1	1	5
593.12	1	1	1	1	0	1	1	6
595.10	1	0	0	1	1	1	1	5
595.10	1	0	0	1	1	1	1	5
595.10	1	0	1	1	1	1	1	6
595.10	1	0	1	1	1	0	1	5
671.10	1	0	1	1	1	1	1	6
671.10	1	0	0	1	1	1	1	5
671.10	1	0	0	1	1	1	1	5
671.10	1	0	0	1	1	1	1	5
672.10	1	0	1	1	1	1	1	6
672.10	1	0	0	1	1	1	1	5
672.10	1	0	0	1	1	1	1	5
672.10	1	0	0	1	1	1	1	5
673.10	1	0	1	1	1	1	1	6
673.10	1	0	0	1	1	1	1	5
673.10	1	0	0	1	1	1	1	5
719.15	1	0	0	1	1	1	1	5
731.06	1	0	0	1	1	1	1	5
732.06	1	0	0	1	1	1	1	5
733.06	1	0	1	1	1	1	1	6
Total	73	6	19	76	75	74	76	

**Tabla 5.15.** Coincidencias de  $m/z$  entre el extracto de células de TB y las siete muestras analizadas.

## 5.2.b Conjunto 2

Las muestras analizadas con el programa cromatográfico de 35 min fueron separadas en dos grupos: uno que incluye las muestras arqueológicas de tuberculosos y el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), y otro que incluye los dos controles (BL-CG-03 y BL-PISA-04).

Las señales de  $m/z$  coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y alguno/cualquiera de los cuatro tuberculosos (BL-TBCG-01, BL-TBCG-02, BLTBPI8-08, BLTBPI8-11), ascendieron a 179, las cuales por haber sido detectadas en el estándar y en alguno de los tuberculosos se consideraron preliminarmente como de interés. Al notar que algunas de las 179  $m/z$  coincidentes incluían la detección en muestras controles (BL-CG-03 y BL-PISA-04) se decidió hacer otro filtro que consistió en remover las  $m/z$  detectadas en los controles. Con ello quedaron 109  $m/z$  que deberían ponderarse como importantes en la detección de TB.

Las  $m/z$  coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Cementerio General (CG) resultaron muy disímiles. Las coincidencias con la muestra BL-TBCG-01 son muy altas ( $n=77$  de 109 posibles), y muy bajas con la BL-TBCG-02 ( $n=28$  de 109 posibles). Las coincidencias entre los dos tuberculosos de CG ascienden únicamente a 10 (**Tabla 5.16** destacado en color naranja). La mayoría de las  $m/z$  s detectadas en BL-TBCG-02 (18/28) no están dentro de las 77

detectadas en BL-TBCG-01. Las  $m/z$  detectadas en BL-TBCG-02 pero no en BL-TBCG-01 ( $n = 18$ ) se muestran destacadas en color rojo en la Tabla 5.16.

$m/z$	BL-TBCG-01	BL-TBCG-02
73	1	1
158	1	1
201	0	1
235	1	1
240	0	1
262	0	1
268	1	1
333	0	1
347	0	1
400	0	1
404	0	1
422	0	1
423	0	1
454	0	1
464	0	1
474	0	1
543	1	1
605	0	1
685	0	1
686	1	1
770	0	1
793	1	1
821	1	1
822	1	1
855	0	1
856	0	1
864	1	1
881	0	1
Total	10	28

**Tabla 5.16.**  $m/z$  coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Cementerio General (CG).

El número de  $m/z$  coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Pica 8 es bajo y relativamente similar: BL-TBPI8-08 ( $n= 32$  de 109 posibles), BL-TBPI8-11 ( $n= 22$  de 109 posibles). Las coincidencias entre los tuberculosos de Pica 8 ascienden a 14 (Tabla 5.17 destacado en color anaranjado). La mayoría de las  $m/z$  detectadas en BL-TBPI8-11 (14/22) están dentro de las 32  $m/z$  detectadas en BL-TBPI8-08. Las  $m/z$  detectadas en BL-TBPI8-11 pero no en BL-TBPI8-08 ( $n=8$ ) se muestran destacadas en color rojo color en la **Tabla 5.17**.

<i>m/z</i>	BL-TBPI8-08	BL-TBPI8-11
76	0	1
87	0	1
158	1	1
163	1	1
166	1	1
172	1	1
173	1	1
174	1	1
175	1	1
177	1	1
179	1	1
180	1	1
268	1	1
357	1	1
396	0	1
417	0	1
426	0	1
543	0	1
582	0	1
622	1	1
630	1	1
793	0	1
Total	14	22

**Tabla 5.17.** *m/z* coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Pica 8.

Las  $m/z$  coincidentes en cualquiera de los dos tuberculosos de CG y en cualquiera de los dos tuberculosos de Pica 8 ascienden a 26 (de 109 posibles). La mayor cantidad de coincidencias se hallaron en BL-TBCG-01 (25/26), aunque también se encontró una en BL-TBCG-02 que no fue hallada en las 77  $m/z$  detectadas en BLTBCG-01 (**Tabla 5.18**, color rojo). Las  $m/z$  coincidentes en BLTBCG-02 son bajísimas (5/26) y contrastan con las altas coincidencias de BL-TBPi8-08 (21/26) y BL-TBPi8-11 (19/26).

$m/z$	BL-TBCG-01	BL-TBCG-02	BL-TBPi8-08	BL-TBPi8-11
12	1	0	1	0
76	1	0	0	1
87	1	0	0	1
95	1	0	1	0
96	1	0	1	0
158	1	1	1	1
163	1	0	1	1
166	1	0	1	1
172	1	0	1	1
173	1	0	1	1
174	1	0	1	1
175	1	0	1	1
177	1	0	1	1
179	1	0	1	1
180	1	0	1	1
193	1	0	1	0
201	0	1	1	0
213	1	0	1	0
234	1	0	1	0
268	1	1	1	1
357	1	0	1	1
426	1	0	0	1
543	1	1	0	1
622	1	0	1	1
630	1	0	1	1
793	1	1	0	1
Total	25/77	5/28	21/32	19/22

**Tabla 5.18.**  $m/z$  coincidentes en cualquiera de los dos tuberculosos de CG y en cualquiera de los dos tuberculosos de Pica 8. Los números abajo contabilizan las coincidencias e indican como referencia el número total de coincidencias de la muestra dentro de las 109 posibles variables.

El número de  $m/z$  coincidentes en ambos tuberculosos de CG y en ambos tuberculosos de Pica 8 es de solo 22 (de 109 posibles). Las coincidencias entre las dos muestras de cada grupo ascienden a solo 2 (**Tabla 5.19** en color anaranjado)

$m/z$	BL-TBCG-01	BL-TBCG-02	BL-TBPI8-08	BL-TBPI8-11
73	1	1		
158	1	1	1	1
163			1	1
166			1	1
172			1	1
173			1	1
174			1	1
175			1	1
177			1	1
179			1	1
180			1	1
235	1	1		
268	1	1	1	1
357			1	1
543	1	1		
622			1	1
630			1	1
686	1	1		
793	1	1		
821	1	1		
822	1	1		
864	1	1		
Total	10	10	14	14

**Tabla 5.19.**  $m/z$  coincidentes en ambos tuberculosos de CG y en ambos tuberculosos de Pica

8.

### 5.3 Síntesis de los resultados obtenidos

Los resultados del análisis de identificación de la presencia de compuestos con  $m/z$  diagnósticas de tuberculosis en el **conjunto 1** son resumidos en las **Tabla 5.20** (ácidos micólicos) y **Tabla 5.21** (ácidos micoserósicos).

**Ácidos micólicos:** Los iones moleculares de los compuestos  $C_{78}$ ,  $C_{80}$ ,  $C_{85}$  y  $C_{87}$  fueron detectados directamente del espectro. El ion molecular del compuesto  $C_{78}$  fue detectado directamente del espectro en todas las muestras excepto BL-TBPISA-03. El valor de  $m/z$  de uno de los tres fragmentos del compuesto  $C_{78}$  hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fue hallado en las muestras BL-TBPISA-03 y BL-TBEOB-05. El ion molecular del compuesto  $C_{80}$  fue detectado directamente del espectro en todas las muestras excepto BL-TBPISA-03. El valor de  $m/z$  de uno de los dos fragmentos hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fue hallado en las muestras BL-TBPISA-03 y BL-TBEOB-05. El ion molecular del compuesto  $C_{85}$  fue detectado del directamente del espectro únicamente en la muestra BL-TBPISA-02. El valor de  $m/z$  del fragmento hallado en el extracto de células de TB (BL-ECTB) no fue hallado en ninguna de las muestras. El ion molecular del compuesto  $C_{87}$  fue detectado directamente del espectro en todas las muestras. No se encontró ningún valor de  $m/z$  de fragmentos en el extracto de células de TB (BL-ECTB). En síntesis, sólo en BL-TBEOB-05 se detectaron los iones moleculares y valores de  $m/z$  para un fragmento de  $C_{78}$  y uno de  $C_{80}$ . En la muestra BL-TBPISA-03 no fueron detectados los iones moleculares de los compuestos  $C_{78}$  y  $C_{80}$ , pero si los valores de  $m/z$  para un fragmento de  $C_{78}$  y uno de  $C_{80}$ . Por lo anterior, los resultados de la muestra BL-TBEOB-05 serían más fiables y concluyentes que la BL-TBPISA-03 por la presencia del ion molecular.

Individuo	$C_{78}$ (1136 g/mol)					$C_{80}$ (1164 g/mol)				$C_{85}$ (1252g/mol)	$C_{87}$ (1278 g/mol)
	$m/z$ 339	$m/z$ 367	$m/z$ 397	N° fragmentos detectados	$m/z$ 1136	$m/z$ 339	$m/z$ 367	N° fragmentos detectados	$m/z$ 1164	$m/z$ 1252	$m/z$ 1278
BL-TBPISA-02	0	0	0	0/3	1	0	0	0/2	1	1	1
BL-TBPISA-03	0	1	0	1/3	0	0	1	1/2	0	0	1
BL-TBPi8-07	0	0	0	0/3	1	0	0	0/2	1	0	1
BL-TBPi8-09	0	0	0	0/3	1	0	0	0/2	1	0	1
BL-TBPi8-10	0	0	0	0/3	1	0	0	0/2	1	0	1
BL-TBEOB-03	0	0	0	0/3	1	0	0	0/2	1	0	1
BL-TBEOB-05	1	0	0	1/3	1	1	0	1/2	1	0	1

**Tabla 5.20.** Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras del conjunto 1.

**Ácidos micocerósicos:** Los iones moleculares de los compuestos  $C_{29}$  y  $C_{30}$  fueron detectados directamente del espectro, mientras que el de  $C_{32}$  fue detectado por *peak detection*. El ion molecular del compuesto  $C_{29}$  fue detectado directamente del espectro en cinco de las muestras: BL-TBPISA-02, BL-TBPi8-07, BL-TBPi8-09, BL-TBPi8-10, y BL-TBEOB-03. Los valores de  $m/z$  de dos de los cuatro fragmentos del compuesto  $C_{29}$  hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fueron detectados en las muestras BL-TBPISA-02, BL-TBPISA-03, BL-TBPi8-07, y BL-TBEOB-03. El ion molecular del compuesto  $C_{30}$  fue

detectado directamente del espectro de tres de las muestras: BL-TBPISA-02, BL-TBPI8-09, y BL-TBEOB-03. Los valores de  $m/z$  de uno de los cuatro fragmentos del compuesto  $C_{30}$  hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fueron detectados en las muestras BL-TBPISA-02, BL-TBPI8-07, y BL-TBPI8-09. El ion molecular del compuesto  $C_{32}$  fue detectado por *peak detection* sólo en el extracto de células de TB (BLECTB). Los valores de  $m/z$  de uno de los cuatro fragmentos del compuesto  $C_{32}$  hallados en el extracto de células de TB (BL-ECTB) fueron detectados en las muestras BL-TBPI8-09 y BL-TBEOB-03.

Así, BL-TBPISA-02 presentó el ion molecular de  $C_{29}$  y valor de  $m/z$  de un fragmento. BL-TBPISA-03 no presentó el ion molecular de  $C_{29}$ , pero sí el valor de  $m/z$  de un fragmento. BL-TBPI8-07 no presentó el ion molecular de  $C_{30}$ , pero si el valor de  $m/z$  de un fragmento. BL-TBPI8-10 no presentó los iones moleculares de  $C_{30}$  y  $C_{32}$ , pero sí un valor de  $m/z$  de un fragmento para cada uno. BL-TBEOB-03 no presentó los iones moleculares de  $C_{29}$  y  $C_{32}$ , pero sí un valor de  $m/z$  de un fragmento para cada uno. Por lo anterior la muestra BL-TBPISA-02 05 sería más fiable que las otras por la presencia del ion molecular.

individuo	$C_{29}$ (437 g/mol)					$C_{30}$ (451 g/mol)					$C_{32}$ (479 g/mol)							
	$m/z$ 237	$m/z$ 265	$m/z$ 279	$m/z$ 321	N° fragmentos detectados	$m/z$ 437	$m/z$ 279	$m/z$ 293	$m/z$ 321	$m/z$ 335	N° fragmentos detectados	$m/z$ 451	$m/z$ 279	$m/z$ 321	$m/z$ 349	$m/z$ 363	N° fragmentos detectados	$m/z$ 479
BL-TBPISA-02	1	0	0	0	1/4	1	0	1	0	0	0/4	1	0	0	0	0	0/4	0
BL-TBPISA-03	1	0	0	0	1/4	0	0	0	0	0	0/4	0	0	0	0	0	0/4	0
BL-TBPI8-07	1	0	0	0	1/4	1	0	0	0	1	1/4	0	0	0	0	0	0/4	0
BL-TBPI8-09	0	0	0	0	0/4	1	0	0	0	0	0/4	1	0	0	0	0	0/4	0
BL-TBPI8-10	0	0	0	0	0/4	1	0	1	0	0	1/4	0	0	0	0	1	1/4	0
BL-TBEOB-03	0	1	0	0	1/4	0	0	0	0	0	0/4	1	0	0	0	1	1/4	0
BL-TBEOB-05	0	0	0	0	0/4	1	0	0	0	0	0/4	0	0	0	0	0	0/4	0

**Tabla 5.21.** Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras del conjunto 1.

El análisis de coincidencias del **conjunto 1** determinó fijarse en 197 señales de  $m/z$ . Si bien las detecciones coincidentes entre el extracto de células de TB (BL-ECTB) y las muestras fue en general bastante alto (57% con una mediana de 113.5  $m/z$  de las 197  $m/z$  totales), las muestras presentaron diferente número de coincidencias con el extracto de células de TB: BL-TBPI8-09 ( $n = 133$ ), BL-TBEOB-05 ( $n=126$ ), BL-TBEOB-03 ( $n= 116$ ), BL-TBPISA-02 ( $n = 113$ ), BL-TBPI8-09 ( $n = 111$ ), BL-TBPI8-07 ( $n=49$ ), y BL-TBPISA-03 ( $n = 20$ ). Solo un  $m/z$  se observó en el extracto de células de TB y a su vez en todas las muestras ( $m/z = 299$ ,  $RT = 0.32$ ), 12  $m/z$  fueron halladas en el extracto de células de TB y en seis muestras, y 65  $m/z$  coincidieron entre el extracto de células de TB y cinco muestras.

Los resultados del análisis de identificación de la presencia de compuestos con  $m/z$  diagnósticos de tuberculosis en las muestras del **conjunto 2** son resumidos en las **Tabla 5.22** (ácidos micólicos) y **Tabla 5.23** (ácidos micoserósicos).

**Ácidos micólicos:** Los iones moleculares de los compuestos  $C_{78}$ ,  $C_{80}$ ,  $C_{85}$  y  $C_{87}$  fueron detectados directamente del espectro. El ion molecular del compuesto  $C_{78}$  fue detectado directamente del espectro en las muestras BL-TBCG-01, BL-CG-03, y BL-TBPI8-11. Los valores de  $m/z$  de los cinco fragmentos del compuesto  $C_{78}$  hallados en el BL-EACMYC se encontraron en cuatro de las muestras (BL-CG-03, BL-PISA-04, BL-TBPI8-08, y BL-TBPI8-11). En la muestra BL-TBCG-01 se hallaron tres de los cinco fragmentos del compuesto  $C_{78}$  detectados en BL-EACMYC, y dos de estos fueron hallados en la muestra BL-TBCG-02. El ion molecular del compuesto  $C_{80}$  fue detectado directamente del espectro en las muestras BL-TBCG-01, BL-CG-03, y BL-TBPI8-11. Los valores de  $m/z$  de los cinco fragmentos del compuesto  $C_{80}$  detectados en el BL-EACMYC se encontraron en tres de las muestras: BL-PISA-04, BL-CG-03, BL-TBPI8-11. En la muestra BL-TBPI8-08 se hallaron cuatro de los cinco fragmentos del compuesto  $C_{80}$  detectados en el BL-EACMYC, y tres de estos fueron hallados en las muestras BL-TBCG-01 y BL-TBCG-02. El ion molecular del compuesto  $C_{85}$  fue detectado directamente del espectro en las muestras BL-CG-03 y BL-TBPI8-08. Los dos valores de  $m/z$  de los fragmentos del compuesto  $C_{85}$  detectados en el BL-EACMYC se encontraron sólo en la muestra BL-TBCG-02. El ion molecular del compuesto  $C_{87}$  fue detectado directamente del espectro en las muestras BL-CG-03 y BL-TBPI8-08 y BL-TBCG-02. El valor de  $m/z$  del fragmento del compuesto  $C_{87}$  hallado en el BL-EACMYC se encontró sólo en las muestras BL-TBCG-02 y BL-CG-03.

En síntesis, en las muestras BL-CG-03 y BL-TBPI8-11 se detectaron los iones moleculares de  $C_{78}$  y de  $C_{80}$  y los cinco fragmentos de estos compuestos. En la muestra BL-CG-03 se detectó el ion molecular y un fragmento del compuesto  $C_{87}$ . En la muestra BL-TBPI8-11 no se detectó el ion molecular del compuesto  $C_{87}$ , pero sí un fragmento. En la muestra BL-TBCG-01 se detectaron los iones moleculares de los compuestos  $C_{78}$  y  $C_{80}$  y tres de los cinco fragmentos de cada compuesto. En la muestra BL-TBCG-02 se detectaron los iones moleculares de los compuestos  $C_{80}$  y  $C_{87}$ , tres de los cinco fragmentos del compuesto  $C_{80}$ , y un fragmento del compuesto  $C_{87}$ . También en la muestra BL-TBCG-02 no fueron detectados los iones moleculares de los compuestos  $C_{78}$  y  $C_{85}$ , pero sí dos de los cinco fragmentos del  $C_{78}$  y dos de los dos fragmentos del  $C_{85}$ . Por lo anterior, los resultados obtenidos del análisis de la muestra BL-CG-03 sería la más fiable y concluyentes pues no solo presentó los iones moleculares de tres compuestos, sino además once fragmentos de estos compuestos. Siguiendo la misma lógica, le sigue la muestra BL-TBPI8-11, pues presentó los iones moleculares de dos compuestos, los cinco fragmentos de estos compuestos, y un fragmento de otro compuesto. Las muestras BL-TBCG-01 y BL-TBCG-02, finalmente, presentaron los iones moleculares de dos compuestos, seis fragmentos de estos compuestos, y un fragmento de otro compuesto.

Individuo	C <sub>78</sub> (1136 g/mol)						C <sub>80</sub> (1164 g/mol)						C <sub>85</sub> (1252 g/mol)			C <sub>87</sub> (1278 g/mol)					
	m/z 339	m/z 367	m/z 368	m/z 395	m/z 397	N° fragmentos detectados	m/z 1136	m/z 339	m/z 367	m/z 395	m/z 396	m/z 425	N° fragmentos detectados	m/z 1164	m/z 483	m/z 513	N° fragmentos	m/z 1252	510	N° fragmentos detectados	m/z 1278
BL-TBCG-01	1	0	1	1	0	3/5	1	1	0	1	0	1	3/5	1	0	0	0/2	0	0	0/1	0
BL-TBCG-02	0	1	1	0	0	2/5	0	0	1	0	1	1	3/5	1	1	1	2/2	0	1	1/1	1
BL-CG-03	1	1	1	1	1	5/5	1	1	1	1	1	1	5/5	1	0	0	0/2	1	1	1/1	1
BL-PISA-04	1	1	1	1	1	5/5	0	1	1	1	1	1	5/5	0	0	0	0/2	0	0	0/1	0
BL-TBPI8-08	1	1	1	1	1	5/5	0	1	1	1	0	1	4/5	0	0	0	0/2	1	0	0/1	1
BL-TBPI8-11	1	1	1	1	1	5/5	1	1	1	1	1	1	5/5	1	0	0	0/2	0	0	0/1	0

**Tabla 5.22.** Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras del conjunto 2.

**Ácidos micocerósicos:** Los iones moleculares de los compuestos C<sub>29</sub>, C<sub>30</sub> y C<sub>32</sub> fueron detectados por *peak detection*.

El ion molecular del compuesto C<sub>29</sub> fue detectado por *peak detection* en las seis muestras. En la muestra BL-CG-03 se hallaron tres de los cinco fragmentos del compuesto C<sub>29</sub> hallados en el BL-EACMYC, dos de los fragmentos del compuesto C<sub>29</sub> fueron detectados en las muestras BL-PISA-04, BL-TBCG-02, y BL-TBPI8-11. En BL-TBCG-01 y BL-TBPI8-08 sólo se halló un fragmento del compuesto C<sub>29</sub>.

El ion molecular del compuesto C<sub>30</sub> fue detectado por *peak detection* en las seis muestras. Los valores de *m/z* de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>30</sub> hallados en el BL-EACMYC se detectaron en BL-TBCG-02. Dos de los fragmentos del compuesto C<sub>30</sub> fueron encontrados en BL-TBCG-01, BL-CG-03, BL-PISA-04, BL-TBPI8-08, y BL-TBPI8-11.

El ion molecular del compuesto C<sub>32</sub> fue detectado por *peak detection* en cinco de las muestras. Los valores de *m/z* de tres de los fragmentos del compuesto C<sub>32</sub> hallados en el BL-EACMYC fueron detectados en BL-PISA-04, BL-TBPI8-08, y BL-TBPI8-11.

En síntesis, en la muestra BL-TBCG-02 se detectaron los iones moleculares de los tres compuestos, dos de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>29</sub>, cuatro de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>30</sub>, y dos de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>32</sub>. En la muestra BL-PISA-04 se detectaron los iones moleculares de los tres compuestos, dos de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>29</sub>, dos de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>30</sub>, y tres de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>32</sub>. En la muestra BL-TBPI8-11 se detectaron los iones moleculares de los tres compuestos, dos de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>29</sub>, dos de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>30</sub>, y dos de los cuatro fragmentos del compuesto C<sub>32</sub>. Como las tres muestras presentaron los tres iones moleculares, su diferencia en fiabilidad estaría determinada por la cantidad de fragmentos detectados: ocho en la muestra BL-TBCG-02, siete en la muestra BL-PISA-04 y seis en la muestra BL-TBPI8-11.

Individuo	C <sub>29</sub> (437)					C <sub>30</sub> (451)					C <sub>32</sub> (479)							
	<i>m/z</i> 237	<i>m/z</i> 265	<i>m/z</i> 279	<i>m/z</i> 321	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 437	<i>m/z</i> 251	<i>m/z</i> 279	<i>m/z</i> 293	<i>m/z</i> 335	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 451	<i>m/z</i> 279	<i>m/z</i> 321	<i>m/z</i> 349	<i>m/z</i> 363	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 479
BL-TBCG-01	0	0	0	1	1/4	1	0	0	1	1	2/4	1	0	1	1	0	2/4	1
BL-TBCG-02	0	1	1	0	2/4	1	1	1	1	1	4/4	1	1	0	0	1	2/4	1
BL-CG-03	1	1	1	0	3/4	1	0	1	1	0	2/4	1	1	0	1	1	3/4	0
BL-PISA-04	1	0	0	1	2/4	1	1	0	1	0	2/4	1	0	1	1	1	3/4	1
BL-TBPI8-08	0	0	0	1	1/4	1	0	0	1	1	2/4	1	0	1	1	1	3/4	1
BL-TBPI8-11	0	0	1	1	2/4	1	0	1	1	0	2/4	1	1	0	0	1	2/4	1

**Tabla 5.23.** Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras del conjunto 2.

Para el análisis de coincidencias en el **conjunto 2**, estas fueron separadas en dos grupos: uno que incluye las cuatro muestras arqueológicas de tuberculosos (BL-TBCG-01, BL-TBCG-02, BL-TBPI8-08, BL-TBPI8-11) y el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC), y otro que incluye los dos controles (BL-CG-03 y BL-PISA-04).

Las señales de *m/z* coincidentes entre BL-EACMYC y alguno/cualquiera de los cuatro tuberculosos ascendieron a 179. Al remover las *m/z* detectadas en los controles, estas se redujeron a 109. Las *m/z* coincidentes entre BL-EACMYC y los dos tuberculosos de Cementerio General (CG) resultaron muy disímiles (BL-TBCG-01=77; BL-TBCG-02=28). Las coincidencias entre los dos tuberculosos de CG ascendieron únicamente a 10. El número de *m/z* coincidentes entre BL-EACMYC y los dos tuberculosos de Pica 8 es bajo y relativamente similar (BL-TBPI8-08 = 32; BL-TBPI8-11 = 22). Las coincidencias entre los dos tuberculosos de Pica 8 ascendieron a 14. Solo se hallaron 2 *m/z* coincidentes en las cuatro muestras (*m/z* = 191.11, RT = 24.1; *m/z* = 255.03, RT = 24.17).

## 6. Capítulo 6: Discusión

En términos generales, el propósito de la presente investigación fue cumplido. Por primera vez se realizaron análisis químicos usando espectrometría de masas de biomarcadores lipídicos de TB en muestras de individuos del territorio actualmente chileno. Cabe destacar que este estudio tuvo un carácter exploratorio, ya que la técnica fue aplicada y puesta a prueba, y que las especificaciones acerca del procedimiento de extracción y de cómo abordar del análisis de los datos contenidas en la presente memoria suponen la ampliación de los recursos técnicos a utilizar en la investigación bioarqueológica de la tuberculosis en Chile.

En cuanto al OE N° 1, en su primera parte, se desarrolló un protocolo propio y local para el análisis de biomarcadores lipídicos de TB basado en parte en las sugerencias analíticas del Dr. Minnikin. Estudios recientes indican que mediante el fraccionamiento previo de los preparados se obtienen cromatogramas de HPLC-fluorescencia con mejor resolución (Minnikin et al., 2012, Donoghue et al., 2017). Sin embargo, también existen antecedentes de un estudio analítico de LC-MS/MS donde no se realizaron fraccionamientos previos obteniéndose buenos resultados (Borowska-Strugińska et al., 2014). En nuestro caso, los espectros de masas obtenidos no mostraron diferencias notorias entre las muestras de las células de TB fraccionadas y no fraccionadas en términos de las *m/z* obtenidas (**ver Capítulo 5.2**), por lo que es posible indicar que no es imprescindible realizar el fraccionamiento de los preparados previo a los análisis de espectrometría de masas. Esta observación tiene implicancias económicas y metodológicas, pues los fraccionamientos encarecen el costo de los análisis -para fraccionar es necesario contar con los cartuchos de extracción de fase sólida (SPE) y un sistema de vacío Mannifold-, y el tiempo de los análisis, pues incorporan un paso procedimental adicional, lo que adicionalmente aumenta la probabilidad de un error de manipulación que podría incidir en los resultados finales. Respecto a lo anterior, al trabajar con muestras arqueológicas (las cuales generalmente representan muestras únicas y de baja cantidad de material) se corre el riesgo de que esta serie de pasos sucesivos generen una pérdida de muestra en los cartuchos de SPE, disminuyendo la cantidad de muestra que se somete al análisis de masas.

En términos experimentales, en el presente trabajo no se realizó la derivatización de las muestras debido a que la técnica de UHPLC-MS no lo requiere, a diferencia de otros protocolos que las incluyen, como por ejemplo en los análisis cromatográficos que utilizan detección de fluorescencia donde es necesario generar el fluoroforo utilizando PFB como reactivo (Minnikin et al., 2012). En ese sentido el método desarrollado en la presente investigación ofrece un procedimiento más sencillo que simplifica los análisis.

En lo que respecta a los análisis químicos de los biomarcadores lipídicos de TB, el presente trabajo fue dirigido a analizar su presencia en base a sus espectros de masas. Esto supone una diferencia a los trabajos previos, los cuales han analizado las muestras con HPLC-fluorescencia (Minnikin et al., 2012).

En cuanto a la segunda parte del OE N° 1, los análisis químicos de identificación de compuestos diagnósticos de tuberculosis arrojaron resultados positivos en las muestras

óseas de individuos sub-actuales (Cementerio General) con TB ósea y diagnosticados con TB (BL-TBCG-01 y BL-TBCG-02). Inesperadamente uno de los controles negativos (BL-CG-03) dio resultados positivos inesperados.

En cuanto a los ácidos micólicos, la muestra BL-TBCG-02 presentó la detección del menor número de *m/z* de las tres analizadas, pese a tratarse de una muestra con alta probabilidad debido a que presenta registro de causa de muerte por tuberculosis (**Tabla 6.1**). Por el contrario, el control negativo de CG (BL-CG-03) arrojó la mayor cantidad de detecciones de *m/z*, con sus respectivos iones moleculares y el 100% de las *m/z* detectados para los marcadores diagnósticos C<sub>78</sub>, C<sub>80</sub> y C<sub>87</sub>.

Respecto de los ácidos micoserósicos, para BL-TBCG-02 se detectaron los iones moleculares de los compuestos C<sub>29</sub>, C<sub>30</sub>, y C<sub>32</sub>, un 100% de las *m/z* de los compuestos C<sub>30</sub> y el 50% de los fragmentos de los compuestos C<sub>29</sub> y C<sub>32</sub>. Las detecciones de *m/z* en el control negativo se mantuvieron elevadas, incluso por sobre las de BL-TBCG-01 (**Tabla 6.2**). Cabe mencionar que el comportamiento de la muestra BL-TBCG-02 (con menor detección de *m/z* de micólicos, pero con más alta detección de *m/z* de micocerósicos) resulta llamativo, y sobre todo el observado con la muestra control, la cual presentó altas detecciones en ambos conjuntos de compuestos. La muestra BL-TBCG-01, en tanto, presentó baja detección para ambos conjuntos de compuestos.

### Ácidos micólicos

Individuo	C <sub>78</sub> (1136 g/mol)						C <sub>80</sub> (1164 g/mol)						C <sub>85</sub> (1252 g/mol)			C <sub>87</sub> (1278 g/mol)					
	<i>m/z</i> 339	<i>m/z</i> 367	<i>m/z</i> 368	<i>m/z</i> 395	<i>m/z</i> 397	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 1136	<i>m/z</i> 339	<i>m/z</i> 367	<i>m/z</i> 395	<i>m/z</i> 396	<i>m/z</i> 425	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 1164	<i>m/z</i> 483	<i>m/z</i> 513	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 1252	<i>m/z</i> 510	N° Fragmentos Detectados	<i>m/z</i> 1278
BL-TBCG-01	1	0	1	1	0	3/5	1	1	0	1	0	1	3/5	1	0	0	0/2	0	0	0/1	0
BL-TBCG-02	0	1	1	0	0	2/5	0	0	1	0	1	1	3/5	1	1	1	2/2	0	1	1/1	1
BL-CG-03	1	1	1	1	1	5/5	1	1	1	1	1	1	5/5	1	0	0	0/2	1	1	1/1	1

**Tabla 6.1.** Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras analizadas con programa cromatográfico de 35 minutos.

### Ácidos micoserósicos

Individuo	C <sub>29</sub> (437 g/mol)					C <sub>30</sub> (451 g/mol)					C <sub>32</sub> (479 g/mol)							
	<i>m/z</i> 237	<i>m/z</i> 265	<i>m/z</i> 279	<i>m/z</i> 321	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 437	<i>m/z</i> 251	<i>m/z</i> 279	<i>m/z</i> 293	<i>m/z</i> 335	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 451	<i>m/z</i> 279	<i>m/z</i> 321	<i>m/z</i> 349	<i>m/z</i> 363	N° fragmentos detectados	<i>m/z</i> 479
BL-TBCG-01	0	0	0	1	1/4	1	0	0	1	1	2/4	1	0	1	1	0	2/4	1
BL-TBCG-02	0	1	1	0	2/4	1	1	1	1	1	4/4	1	1	0	0	1	2/4	1
BL-CG-03	1	1	1	0	3/4	1	0	1	1	0	2/4	1	1	0	1	1	3/4	0

**Tabla 6.2.** Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras analizadas con programa cromatográfico de 35 minutos.

Las *m/z* coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Cementerio General (CG) resultaron muy disímiles. Las coincidencias con la muestra BL-TBCG-01 fueron altas (n=77 de 109 posibles), y bajas con la BL-TBCG-02 (n=28 de 109 posibles). Las coincidencias entre los dos tuberculosos de CG ascienden únicamente a 10. La mayoría de las *m/z* detectadas en BL-TBCG-02 no se hallaron dentro de las 77 detectadas en BL-TBCG-01 (18/28). Las *m/z* detectadas en BL-TBCG-02 pero no en BL-TBCG-01 ascendieron a 18.

Las coincidencias de *m/z* entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y el control negativo (BL-CG-03) fueron bajas (n=61 de 179 posibles). Al buscar estas 61 coincidencias en las muestras de los dos tuberculosos de Cementerio General se hallaron 56 coincidencias. Las cinco *m/z* detectadas en BL-CG-03, pero no en los tuberculosos de CG se ven en color rojo en la Tabla 6.3. Las coincidencias de *m/z* entre BL-CG-03 y ambas muestras de tuberculosos de CG ascendieron a 24 (Tabla 6.3, en color anaranjado), en tanto las coincidencias de BL-CG-03 con uno de los tuberculosos de CG ascendieron a 32 (**Tabla 6.3**, en amarillo). Los resultados, nuevamente, no cumplieron con lo esperado, principalmente por la discrepancia entre las *m/z* detectadas en los dos tuberculosos.

<i>m/z</i>	BL-TBCG-01	BL-TBCG-02	BL-CG-03
5	0	1	1
21	1	1	1
25	1	1	1
33	0	1	1
36	0	1	1
47	1	1	1
48	0	1	1
53	0	1	1
54	0	1	1
58	0	1	1
100	1	0	1
128	1	1	1
129	1	1	1
130	0	1	1
134	1	1	1
150	1	1	1
151	1	1	1
160	1	1	1
161	1	1	1
164	1	0	1
165	1	0	1
171	1	0	1
178	1	1	1
186	0	1	1
187	1	1	1
194	0	1	1
195	0	1	1
207	1	1	1
208	0	1	1
214	0	0	1
224	1	1	1
228	0	1	1
236	0	0	1
239	1	1	1

249	1	1	1
264	1	1	1
267	1	1	1
290	0	0	1
295	1	1	1
318	1	1	1
323	1	0	1
324	0	1	1
349	1	1	1
350	0	1	1
355	0	0	1
375	1	1	1
376	0	0	1
384	1	0	1
403	1	1	1
462	1	1	1
506	0	1	1
507	1	0	1
508	1	0	1
509	0	1	1
510	0	1	1
604	0	1	1
638	0	1	1
748	0	1	1
749	0	1	1
751	0	1	1
788	0	1	1
Total	32	48	61

**Tabla 6.3.** *m/z* coincidentes entre el estándar de metil ésteres de ácidos micólicos (BL-EACMYC) y los dos tuberculosos de Cementerio General (BL-TBCG-01 y BL-TBCG-02) y el control negativo (BL-CG-03).

En cuanto al OE N° 2, el análisis de la presencia de biomarcadores lipídicos de TB en muestras humanas de distintos periodos cronoculturales chilenos permitió su detección en varias de ellas, con resultados dispares.

Las muestras óseas de individuos recuperados en contextos arqueológicos con antigüedades de 2500 años (Pisagua) con lesiones probablemente causadas por TB presentaron una muy baja detección de las *m/z* de ácidos micólicos (una sola en BL-TBPISA-03) (Tabla 6.4). Los ácidos micoserósicos en las muestras óseas de estos individuos también presentaron muy baja detección: sólo la BL-TBPISA-02 presentó el ion molecular y solo hubo una detección de fragmentos de C<sub>29</sub> en BL-TBPISA-02 y BL-TBPISA-03 (Tabla 6.5).

El control negativo (BL-PISA-04), por su parte, mostró una alta detección de los iones moleculares y de las *m/z* de los compuestos de ácidos micólicos C<sub>78</sub> y C<sub>80</sub>, y alta detección de ácidos micoserósicos, incluyendo el ion molecular y el 75% de las *m/z* del compuesto C<sub>32</sub> (Tabla 6.5).

Los análisis de coincidencias de *m/z* entre las muestras de individuos de Pisagua con lesiones probablemente causadas por TB (BL-TBPISA-02 y BL-TBPISA-03) y la referencia (extracto de células de TB, BL-ECTB) arrojaron 113 y 20, respectivamente (de un total de 197 posibles). La alta coincidencia de la BL-TBPISA-02 puede considerarse acorde con la

mediana del conjunto (=113.5), pero la de BL-TBPISA-03 aparece como muy baja. Las coincidencias entre la muestra control negativo (BL-PISA-04) y la referencia (estándar de metil ésteres de ácidos micólicos, BL-EACMYC) ascendieron a 14 (de un total de 179 posibles), y puede considerarse como baja considerando la mediana del conjunto (=66).

Las muestras óseas de individuos con lesiones probablemente atribuidas a TB recuperados en contextos arqueológicos con antigüedades de aproximadamente 1000 a 500 años (Pica 8, El Olivar) con un programa cromatográfico de 13.5 minutos presentaron bajas detecciones de  $m/z$  atribuidas a ácidos micólicos. Estos fueron altamente detectados en las muestras con un programa cromatográfico de 35 minutos, destacándose dentro del conjunto la BL-TBPi8-11, la cual evidenció una detección total para los compuestos  $C_{78}$  y  $C_{80}$ . Para los ácidos micoserósicos la situación descrita siguió la misma tendencia (bajas detecciones en 13.5 minutos y altas detecciones en 35 minutos) (**Tabla 6.4** y **Tabla 6.5**).

Las comparaciones entre las muestras de individuos con lesiones probablemente causadas por TB recuperados en contextos arqueológicos con antigüedades de aproximadamente 1000 a 500 años (Pica 8, El Olivar) y las referencias mostraron generalmente altas coincidencias. Las coincidencias entre la referencia (extracto de células de TB, BL-ECTB) y las muestras de Pica 8 BL-TBPi8-07, BI-TBPi8-09 y BL-TBPi8-10, arrojaron 49, 133 y 111, respectivamente (de un total de 197 posibles), y las dos últimas pueden además considerarse altas acorde con la mediana del conjunto (=113.5). Las coincidencias entre la referencia (extracto de células de TB, BL-ECTB) y las muestras de El Olivar BL-TBEOB-03 y BL-TBEOB-05 arrojaron 126 y 116, respectivamente (de un total de 197 posibles), y pueden además considerarse altas acorde con la mediana del conjunto (=113.5).

Las coincidencias entre la referencia (estándar de metil ésteres de ácidos micólicos, BL-EACMYC) y las muestras de Pica 8 BL-TBPi8-08 y BL-TBPi8-11 arrojaron 71 y 55, respectivamente (de un total de 179 posibles) y pueden considerarse como altas considerando la mediana del conjunto (=66).

Cabe señalar que los números de coincidencias hallados en ambos conjuntos de muestras (conjunto 1 usando como referencia al extracto de células de TB, BL-ECTB, y conjunto 2 usando como referencia al estándar de metil ésteres de ácidos micólicos, BL-EACMYC) no son comparables entre sí. Lo anterior se debe a que el **conjunto 1** tuvo una menor detección de  $m/z$  en su referencia (las variables resultantes del primer filtro fueron 543), en comparación con la detección en el **conjunto 2** (cuyo primer filtro arrojó un total de 914 variables). La mayor cantidad de variables base en el conjunto 2 y los filtros aplicados (**Ver sección 4.2.e.2 de Material y Métodos y sección 5.2 de Resultados**) introducen un componente artefactual que impide considerar los resultados de coincidencias como un todo al momento de comparar y que señala que las comparaciones deben hacerse en relación a las referencias y el tiempo específico de análisis, pues lo relevante es cuánta similitud se está produciendo entre la referencia y las muestras analizadas en cada conjunto.

## Ácidos micólicos

Individuo	C <sub>78</sub> (1136 g/mol)						C <sub>80</sub> (1164 g/mol)						C <sub>85</sub> (1252 g/mol)			C <sub>87</sub> (1278 g/mol)					
	m/z 339	m/z 367	m/z 368	m/z 395	m/z 397	N° fragmentos detectados	m/z 1136	m/z 339	m/z 367	m/z 395	m/z 396	m/z 425	N° fragmentos detectados	m/z 1164	m/z 483	m/z 513	N° Fragmentos detectados	m/z 1252	m/z 510	N° fragmentos detectados	1278
BL-TBPISA-02*	0	0	-	-	0	0/3	1	0	0	-	-	-	0/2	1	-	-	0/0	1	-	0/0	1
BL-TBPISA-03*	0	1	-	-	0	1/3	0	0	0	-	-	-	0/2	0	-	-	0/0	0	-	0/0	1
BL-PISA-04**	1	1	1	1	1	5/5	0	1	1	1	1	1	5/5	0	0	0	0/2	0	0	0/1	0
BL-TBPI8-07*	0	0	-	-	0	0/3	1	0	0	-	-	-	0/2	1	-	-	0/0	0	-	0/0	1
BL-TBPI8-08**	1	1	1	1	1	5/5	0	1	1	1	0	1	4/5	0	0	0	0/2	1	0	0/1	1
BL-TBPI8-09*	0	0	-	-	0	0/3	1	0	0	-	-	-	0/2	1	-	-	0/0	0	-	0/0	1
BL-TBPI8-10*	0	0	-	-	0	0/3	1	0	0	-	-	-	0/2	1	-	-	0/0	0	-	0/0	1
BL-TBPI8-11**	1	1	1	1	1	5/5	1	1	1	1	1	1	5/5	1	0	0	0/2	0	0	0/1	0
BL-TBEOB-03*	0	0	-	-	0	0/3	1	0	0	-	-	-	0/2	1	-	-	0/0	0	-	0/0	1
BL-TBOEB-05*	1	0	-	-	0	1/3	1	1	0	-	-	-	1/2	1	-	-	0/0	0	-	0/0	1

**Tabla 6.4.** Resultados de los análisis de ácidos micólicos en las muestras arqueológicas. Las diferencias en el denominador del número de fragmentos detectados se debe a que este fue mayor en las muestras analizadas con el programa cromatográfico de 35 minutos (\*\*), los fragmentos no detectados en la referencia para las muestras analizadas con el programa cromatográfico de 13.5 minutos (\*), se indican con un guión (-).

## Ácidos micoserósicos

Individuo	C <sub>29</sub> (437g/mol)					C <sub>30</sub> (451 g/mol)						C <sub>32</sub> (479 g/mol)							
	m/z 237	m/z 265	m/z 279	m/z 321	N° fragmentos detectados	m/z 437	m/z 251	m/z 279	m/z 293	m/z 321	m/z 335	N° fragmentos detectados	m/z 451	m/z 279	m/z 321	m/z 349	m/z 363	N° fragmentos detectados	m/z 479
BL-TBPISA-02*	1	0	0	0	1/4	1	-	0	1	0	0	1/4	1	0	0	0	0	0/4	0
BL-TBPISA-03*	1	0	0	0	1/4	0	-	0	0	0	0	0/4	0	0	0	0	0	0/4	0
BL-PISA-04**	1	0	0	1	2/4	1	1	0	1	-	0	2/4	1	0	1	1	1	3/4	1
BL-TBPI8-07*	1	0	0	0	1/4	1	-	0	0	0	1	1/4	0	0	0	0	0	0/4	0
BL-TBPI8-08**	0	0	0	1	1/4	1	0	0	1	-	1	2/4	1	0	1	1	1	3/4	1
BL-TBPI8-09*	0	0	0	0	0/4	1	-	0	0	0	0	0/4	1	0	0	0	0	0/4	0
BL-TBPI8-10*	0	0	0	0	0/4	1	-	0	1	0	0	1/4	0	0	0	0	1	1/4	0
BL-TBPI8-11**	0	0	1	1	2/4	1	0	1	1	-	0	2/4	1	1	0	0	1	2/4	1
BL-TBEOB-03*	0	1	0	0	1/4	0	-	0	0	0	0	0/4	1	0	0	0	1	1/4	0
BL-TBEOB-05*	0	0	0	0	0/4	1	-	0	0	0	0	0/4	0	0	0	0	0	0/4	0

**Tabla 6.5.** Resultados de los análisis de ácidos micoserósicos en las muestras arqueológicas. Las diferencias en el denominador del número de fragmentos detectados se deben a que este fue mayor en las muestras analizadas con el programa cromatográfico de 35 minutos (\*\*), los fragmentos no detectados en la referencia para las muestras analizadas con el programa cromatográfico de 13.5 minutos (\*), se indican con un guión (-).

En cuanto al OE N° 3, a continuación, se describe la utilidad de la técnica (Punto 1), y luego se abordan consideraciones respecto de cómo el presente trabajo generó información pertinente de ponderar en términos técnico-metodológicos (Punto 2).

1. La técnica de UHPLC-MS mostró ser útil para el análisis de TB en muestras humanas de distintos periodos cronoculturales chilenos, procedentes de distintos ambientes y con distintas historias tafonómicas, pero de forma diferencial respecto de los resultados positivos e indicando que se requieren mejoras (**ver abajo**).

Durante el desarrollo de la presente discusión, se tuvo acceso a la tesis inédita “*Ancient DNA and Lipid Biomarkers: the identification of M. tuberculosis in ancient remains using aDNA and mycolic acids*” (David Green, 2014). Parte de los análisis realizados en la investigación de Green incluyó el monitoreo de ácidos micólicos y micoserósicos en un conjunto de muestras arqueológicas de varios sitios de Europa actualmente conservadas en colecciones de la Universidad de Manchester: Early Medieval Great Chesterford, Cambridgeshire (n=5), siglos XII y XIII Guarda Portugal (n=1), Early Medieval East Lothian (n=1), 1118-1650 DC Chichester, Sussex (n=7), siglos XVI-XVII Francia (n=5), siglos XII-XIV Hereford, Herefordshire (n=5), siglos XV-XVII Lituania (n=1), siglo XVI Florence, Italia (n=1), XV-XVIII Lituania (n=1). Las muestras analizadas fueron seleccionadas por presentar evidencia osteológica de TB y de esa manera aumentar la posibilidad de obtener resultados positivos.

Para tener una referencia comparativa, Green generó una serie de fluoroforos, específicamente ésteres de 6,7-dimetoxicumarina (DMC) a partir de células de TB. El protocolo de análisis utilizado por Green fue facilitado por el Dr. Minnikin (y es similar al utilizado en la presente investigación). Green realizó este fraccionamiento y la derivatización para la detección mediante fluorescencia (lo cual no se realizó en la presente investigación, **ver Discusión del Objetivo 1**). Los análisis de Green no rindieron resultados positivos: en ninguna de las muestras arqueológicas analizadas se detectó el perfil de fluorescencia esperado para ácidos micólicos y micocerósicos según el preparado generado desde células de TB, lo cual fue atribuido a varios factores dentro de los que destacan: i) los métodos de HPLC no fueron optimizados adecuadamente por falta de repeticiones, ii) los procesos de extracción y fraccionamiento no fueron hechos de forma óptima para las muestras arqueológicas, iii) a la mínima posibilidad de que las muestras no contuvieran lípidos micobacterianos (aunque el autor reconoce que en teoría no podría ser el caso tomando en consideración que estos lípidos son muy resistentes y deberían estar presentes). Al respecto, cabe señalar que la presente investigación determinó que el fraccionamiento no influye al realizar análisis de coincidencias cromatográficas o espectrométricas (**ver sección 4.2.d.1 de Material y Método, sección de Resultados y Discusión del Objetivo 1**). Por lo anterior, pese a que los resultados obtenidos en el presente trabajo no se alinearon en un 100% con las expectativas (“*Las muestras bioarqueológicas con lesiones óseas patognomónicas y/o consistentes con un diagnóstico de TB arrojarán resultados positivos para biomarcadores lipídicos de membrana de TB*”), fue posible elaborar interpretaciones de los resultados y las futuras directrices respecto a la técnica.

2. Si bien los biomarcadores lipídicos de TB se detectaron en las muestras de individuos con lesiones óseas patognomónicas y/o consistentes con un diagnóstico de TB, los resultados no fueron lo suficiente consistentes ni robustos para generar un diagnóstico certero en base a esta técnica. Esto se debe principalmente a dos situaciones que serán descritas continuación.

2.1. Inesperada detección de los compuestos seleccionados como biomarcadores diagnósticos de TB en las muestras control. El análisis de identificación de la presencia de compuestos con  $m/z$  diagnósticas de TB fue muy alto en los controles, incluso por sobre la detección generada en muestras para las cuales se esperaba un diagnóstico positivo (por ejemplo, BL-CG-03 versus BL-TBCG-02), lo cual puede explicarse por:

a) Posible contaminación durante la extracción. Si bien los procedimientos de limpieza constante aplicados deberían haberla evitado, puede que la alta sensibilidad de la técnica utilizada haya detectado contaminación residual generada por la reutilización de algunos materiales (morteros y tubos) o equipos (balanza, sistema de flujo de nitrógeno, etc.), o de las superficies utilizadas para el trabajo de extracción, la cual no se distingue mediante una cromatografía de capa fina debido a su menor resolución. Frente a la posibilidad de replicar este estudio, se recomienda extremar los cuidados para evitar una potencial contaminación a la hora de manipular el material y/o las muestras.

b) Criterio de procesamiento de datos cromatográfico y espectro métrico. La decisión de reducir al máximo la lectura de señales como ruido al aplicar *peak detection* pudo haber distorsionado los resultados del análisis, y así la lectura de ruido o de señales poco informativas pudo ser confundida como una detección importante. Para el análisis de identificación de la presencia de compuestos con  $m/z$  diagnósticas de TB se siguió el principio teórico de la espectrometría de masas de sólo diagnosticar positivamente un compuesto si se encontraba su ion molecular y todos sus fragmentos en un mismo y corto intervalo de tiempo de retención. Muy pocas muestras cumplieron al 100% con este criterio de forma estricta (BL-CG-03: compuestos  $C_{78}$ - $C_{80}$ - $C_{87}$ ; BL-TBCG-02 compuestos  $C_{30}$  - $C_{87}$  y BL-TBPI8-11 compuestos  $C_{78}$ - $C_{80}$ ) mientras que la gran mayoría presentó una dispersión de datos tanto en tiempos de retención como en  $m/z$  que no puede ser considerada como concluyente. Para corregir este punto se sugiere definir con mayor precisión el intervalo de intensidad de las señales a considerar, así como re-evaluar la búsqueda directa de iones moleculares en el espectro. Los análisis de masas de ácidos micólicos realizados con anterioridad en bioarqueología utilizaron monitoreo de reacción múltiple (Multiple Reaction Monitoring, MRM), con una aplicación del monitoreo selectivo de iones (Selected Ion Monitoring, SIM) (Borowska-Strugińska et al., 2014). Estas metodologías incluso se han utilizado exitosamente en análisis biomédicos actuales para realizar diagnóstico diferencial de distintas cepas de tuberculosis (Shui et al., 2011). En el monitoreo de reacción múltiple se selecciona un ion precursor de interés en el primer analizador de masa en un espectrómetro de masas en tándem. Este ion precursor es fragmentado y produce otro ion característico el cual es seleccionado en el segundo analizador de masa. Estas metodologías, al conocer la masa teórica de los iones que se requieren buscar, facilitan el

trabajo de detección pues sólo se monitorean los iones de mayor interés y se ignora la distorsión que pueden producir iones comunes a varios compuestos biológicos.

Cabe señalar que la bibliografía de la espectrometría de masas de los compuestos seleccionados como biomarcadores diagnósticos de TB es escasa, lo cual dificulta el trabajo incluso desde lo teórico. En el Capítulo de Materiales y Métodos se señaló la imposibilidad de incluir en el análisis de masas al ácido micolipénico C<sub>29</sub> pese a su gran potencial como biomarcador de TB (Minnikin et al., 2015), debido a que no se encontró ningún soporte bibliográfico sobre su espectro de masas. Otro problema observado guarda relación con que los perfiles de masas teóricos generados para buscar los fragmentos de los compuestos mediante *peak detection* se basaron en espectros de masas obtenidos con equipos y especificaciones diferentes al utilizado en la presente investigación. Si bien los datos pudieron ser transformados según lo requerido para la metodología utilizada, esta tarea fue de una complicación importante. Para futuras investigaciones se sugiere re-evaluar los espectros de masas escogidos a fin de determinar los fragmentos más relevantes y así evitar contaminación por ruido en los resultados (iones repetitivos). En este sentido la constante ampliación de las bases de datos para lipidómica (LipidBank, LipidMaps, etc.) hará más sencillo acceder a una mayor cantidad de perfiles de masas de los distintos compuestos que facilitarán un diagnóstico más certero.

c) Calidad de los estándares de referencias: Puede asumirse que no habría diferencias relevantes para esta investigación en la composición lipídica entre diferentes cepas de tuberculosis que forman parte del MTBC que impidieran la utilización de las referencias utilizadas, sobre todo teniendo en consideración que en la presente memoria se están teniendo en cuenta varias moléculas en paralelo para evitar el sesgo producido por utilizar sólo un tipo. En la investigación recientemente publicada por Luna et al. (2020) se utilizan las mismas referencias utilizadas en esta investigación, obteniendo resultados positivos principalmente para los perfiles de micocerosatos, pero también para los de micolatos. Si bien en esta misma publicación se abre la interesante interrogante de cómo sería bueno realizar estudios que caracterizaran mejor la distribución de todos los biomarcadores lipídicos de TB abordados en esta memoria para *M pinnipedii* por la posibilidad de la historia evolutiva antes mencionada, se señala que no hay referencias e investigaciones aún al respecto. Del mismo modo, dejamos abierta la pregunta para futura investigación en esta memoria. Aún así, no puede dejar de mencionarse que los compuestos utilizados como referencias (BL-EACMYC y BL-ECTB) no están disponibles comercialmente, sino que fueron preparados en laboratorio, tanto por el Dr. Minnikin como por la autora de la presente investigación, por lo que no se pueden descartar problemas de manipulación (manejo/preparación) que potencialmente incidan en su calidad como referencias.

Debido a las restricciones (de presupuesto, tiempo y disponibilidad de equipamiento) de la presente investigación no fue posible replicar la corrida cromatográfica de las referencias en múltiples ocasiones, así como tampoco analizar ambas referencias utilizando el mismo tiempo en el programa cromatográfico. Para futuras investigaciones se sugiere trabajar con estándares comerciales, re-evaluar las referencias al compararlas con éstos, generar estándares de ácidos micocerósicos (hasta ahora solo hay disponibles estándares de

ácidos micólicos), y generar múltiples corridas cromatográficas para una mejor replicación y calibración.

d) Posibles problemas de contaminación en las muestras ya sea por los sedimentos de depósito y/o por aspectos curatoriales (almacenamiento).

Las investigaciones que utilizan biomarcadores lipídicos de tuberculosis se sustentan principalmente en dos premisas teóricas: la buena conservación de los lípidos como moléculas en general las plantea como útiles como biomarcadores para el registro arqueológico, y la especificidad de los lípidos de la pared celular del bacilo de los integrantes del MTBC permiten considerarlos diagnósticos.

Pese a que era sabido que los lípidos sobreviven en asociación a varios materiales arqueológicos (Evershed et al, 2008), el estudio de Evershed et al. (1995) fue el pionero en comprobar la supervivencia de estos en huesos arqueológicos. La preservación de las moléculas lipídicas se relaciona teóricamente con su inherente resistencia a la degradación química y microbiana combinada con su hidrofobicidad. A través de GC-MS, el estudio realizó la detección de perfiles lipídicos en huesos recuperados de sitios con diversas condiciones (áridos, inundados, con distinta antigüedad, etc), llegando a la conclusión de que los perfiles eran coherentes con lo esperable para los distintos ambientes y similares a perfiles control actuales. El estudio abordó además las posibilidades de contaminación externa sobre el hueso, proponiendo la comparación del suelo aledaño a la muestra como forma de descarte. Esta es una consideración que también se realiza en la presente investigación. De ahí en adelante, varios estudios abordaron la naturaleza promisoría de los lípidos incluso como alternativas para otras biomoléculas en el registro arqueológico. (Para reviews extensivos, ver Collins et al., 2002; Evershed et al., 2008 y Regert et al., 2010)

A la fecha, no se reportan estudios puntuales respecto de la degradación de lípidos de pared celular del bacilo de TB en muestras arqueológicas. Si bien en Minnikin et al (2012) se menciona la posibilidad de degradación con el paso del tiempo, lo cual en el caso del uso de HPLC-fluorescencia generaba perfiles de menor resolución en términos de intensidad, también se explica cómo el uso de varios biomarcadores lipídicos en paralelo busca evitar este problema y generar diagnósticos más certeros. (Redman et al., 2009; Molnar et al, 2015.).

A pesar de que las moléculas pueden degradarse, reduciendo la posibilidad de encontrarlas en las muestras, estas no pueden contaminarse ni modificarse debido a su gran estabilidad química al tratarse de cadenas largas y complejas. La contaminación puede producirse a nivel de las muestras por diversos motivos, pero no a nivel molecular. La búsqueda de masas específicas descarta a priori aquellas masas que no corresponden a las de interés. En el caso de haber degradación de las moléculas en el tiempo, el resultado será la no-detección o señales de menor intensidad para las masas buscadas en los espectros generados. ). En la presente investigación se usó un Orbitrap: Su alto poder de resolución (>150,000) y excelente precisión de masa (2-5 ppm, o incluso 0.2 ppm bajo condiciones favorables), lo hacen recomendable para el análisis de biomoléculas en matrices complejas (Richard, Perry, Graham y Robert, 2008), por lo que se propuso que sería adecuado.

En lo que respecta a los inesperados resultados de esta memoria, no puede descartarse que ciertos biomarcadores lipídicos detectados sean de (mico)bacterias que colonizaron los restos humanos analizados. Al respecto se ha indicado que las bacterias del MTBC (*Mycobacterium tuberculosis Complex*) pueden sobrevivir en los sedimentos (Ghodbane, Medie, Lepidi, Nappez y Drancourt, 2014), pero también existe un amplio espectro de bacterias (y otros microorganismos) que pueden hallarse en los sedimentos asociados a restos humanos (Kazarina, Gerhards, Petersone-Gordina, Kimsis, Pole, Zole, Leonova y Ranka, 2019; Reitz y Shackley, 2012; Southern, 2008; Warinner, Herbig, Mann, Fellow, Weiß, Burbano, Orlando y Krause, 2017). Para futuras investigaciones se sugiere evaluar la presencia de estos agentes mediante otras técnicas complementarias (por ejemplo, ADN y UHPLC-MS) en muestras del sedimento de depósito y de los textiles asociados a los restos humanos (de haberlos) a fin de determinar el grado de posible contaminación y posible incidencia en los análisis. También se sugiere la incorporación de otras bacterias y hongos como controles. Favorablemente, es posible extraer pequeñas cantidades de sedimento asociado a los huesos de CG, de El Olivar-Brillamar, y posiblemente de los huesos de Pisagua y Pica 8, y de las colecciones de Pisagua y Pica 8 se dispone, además, de textiles asociados, los cuales también podrían ser muestreados.

2.2. Dispersión e inconsistencia entre los resultados de ambos análisis realizados. Las muestras con mejores resultados en el análisis de identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas no lo fueron en el análisis de coincidencias.

La muestra de Cementerio General BL-TBCG-01, por ejemplo, presentó una baja detección en el análisis de compuestos con  $m/z$  diagnósticas tanto para ácidos micólicos como ácidos micoserósicos, pero el análisis de  $m/z$  coincidentes mostró alta coincidencia con la referencia. Lo anterior complica tomar una decisión respecto a la positividad de la muestra. Lo mismo ocurre con las muestras del sitio Pisagua. Las muestras BL-TBPISA-02 y BL-TBPISA-03 presentaron baja detección para el análisis de compuestos con  $m/z$  diagnósticas tanto para ácidos micólicos como ácidos micoserósicos, pero la BL-TBPISA-02 mostró una alta coincidencia con la referencia. Con la muestra BL-PISA-04 se observó una situación inversa, pues presentó alta detección en el análisis de compuestos con  $m/z$  diagnósticas tanto para ácidos micólicos como ácidos micoserósicos, pero muy bajas coincidencias con la referencia. Así, nuevamente es complicado establecer un consenso entre ambos análisis.

Respecto de las muestras de Pica 8 y El Olivar es posible indicar que en el análisis de identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas las detecciones dependieron más del tiempo del programa cromatográfico que de las muestras en sí. En aquellas con el programa de 13.5 minutos fueron bajas las detecciones de ácidos micólicos, pero en las muestras con el programa de 35 minutos estos fueron altamente detectados. Lo mismo ocurrió para los ácidos micoserósicos. El análisis de coincidencias mostró en general altas coincidencias entre las muestras de individuos con lesiones probablemente causadas por TB y las referencias, siendo la única con un bajo porcentaje de coincidencias la BL-TBPi8-07.

Las observaciones descritas sugieren que funcionó mejor el análisis de coincidencias, pues diferenció mejor entre aquellas muestras consideradas como controles y las que deberían arrojar resultados positivos (individuos con lesiones óseas patognomónicas y/o

consistentes con un diagnóstico de TB) (**Tabla 6.6**). También debe mencionarse que este análisis generó una diferenciación para ambos tiempos de programa cromatográfico y para ambas referencias (**Tabla 6.6**). Sin embargo, es necesario tener cuidado con este análisis, pues es posible que se ponderen  $m/z$  poco diagnósticas que eleven las coincidencias (**ver arriba, problemas descritos en el punto 2.1**). En síntesis, y considerando las mejoras sugeridas en el punto 2.1, el análisis de coincidencias se postula como una buena alternativa para seguir con este tipo de metodología.

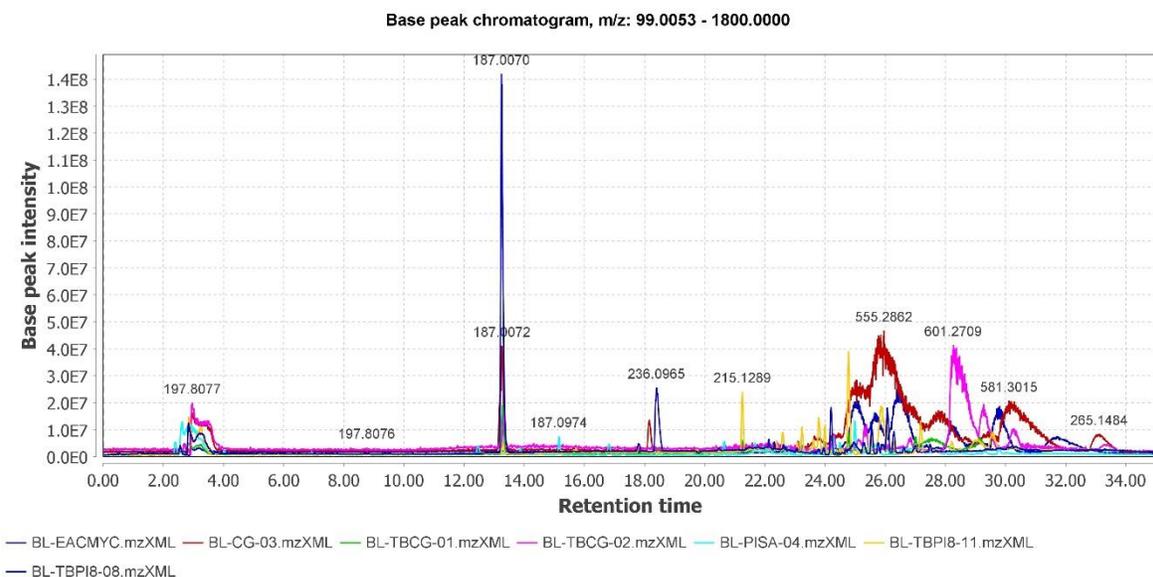
Muestra	N° de coincidencias/referencia	Ponderación de las coincidencias en relación a la referencia	Ponderación de las coincidencias en relación a la mediana de cada conjunto
BL-TBCG-01	114/179	Alto	Alto
BL-TBCG-02	79/179	Bajo	Alto
BL-CG-03*	61/179	Bajo	Bajo
BL-TBPISA-02	113/197	Alto	Alto
BL-TBPISA-03	20/197	Bajo	Bajo
BL-PISA-04*	14/179	Bajo	Bajo
BL-TBPi8-07	49/197	Bajo	Bajo
BL-TBPi8-08	71/179	Bajo	Alto
BL-TBPi8-09	133/197	Alto	Alto
BL-TBPi8-10	111/197	Alto	Alto
BL-TBPi8-11	55/179	Bajo	Bajo
BL-TBEOB-03	116/197	Alto	Alto
BL-TBEOB-05	126/197	Alto	Alto

**Tabla 6.6.** Resumen del análisis de coincidencias. \*= Controles negativos.

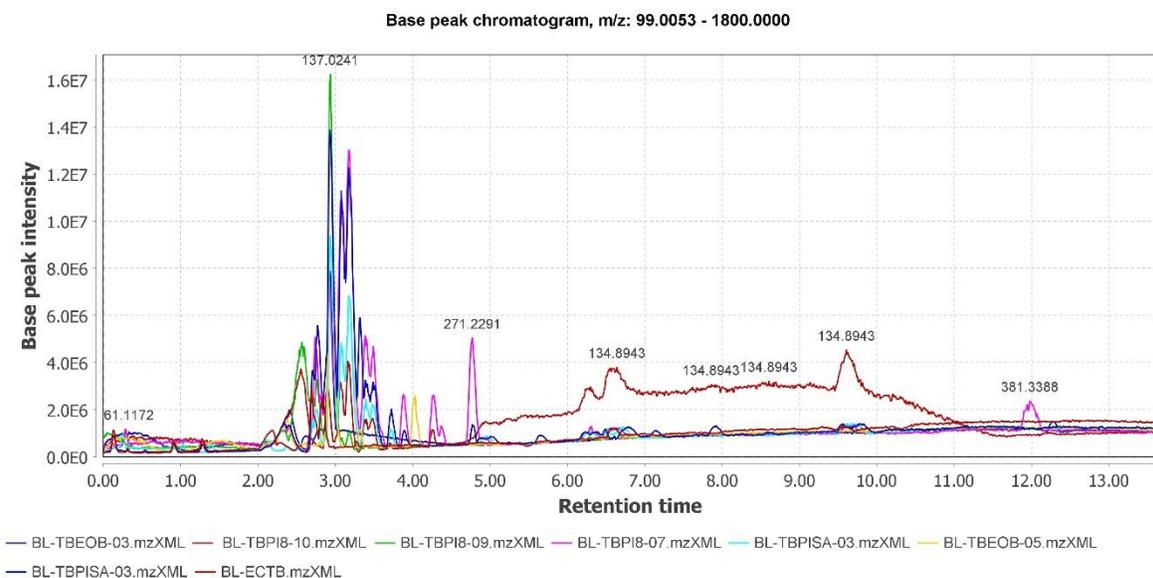
Conjunto 1= 197 variables de la referencia: 0-99 bajo, 100-197 alto; Mediana del conjunto 1=113.5

Conjunto 2= 179 variables de la referencia: 0-90 bajo, 91-179 alto; Mediana del conjunto 2=66.

Pasando ahora a los programas cromatográficos, los resultados evidenciaron que las detecciones resultaron mejor en el conjunto 2 tanto para el análisis de identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas como en el análisis de coincidencias. Para Pica 8 y El Olivar, la detección en las muestras dependió más del programa cromatográfico que de las muestras en sí: las muestras del conjunto 2 presentaron altas detecciones de ácidos micólicos, pero estas fueron bajas en las muestras del conjunto 1. Lo mismo ocurrió para los ácidos micoserosicos. Lo anterior apoya el punto discutido arriba respecto que los números de coincidencias entre ambos programas cromatográficos no son comparables entre sí. El análisis de coincidencias del conjunto 2 se inició con un número de detecciones mucho más elevado (BL-EACMYC), y por tanto es posible que el menor número inicial de detecciones en la referencia del conjunto 1 (BL-ECTB) haya influido en los resultados finales. La falta de estudios previos realizados con el mismo equipamiento utilizado en la presente investigación no permitió determinar de antemano el programa cromatográfico correcto para los compuestos a identificar. Los resultados obtenidos señalan que es pertinente utilizar un programa cromatográfico de 35 minutos, pues los compuestos de interés mostraron tiempos de retención de forma mucho más consistente sobre los 23 minutos (**Figura 6.1**), en comparación con los que aparecieron entre los 2- 3 minutos en el programa cromatográfico de 13.5 minutos (**Figura 6.2**) (los gráficos de cada muestra se encuentran en el Anexo 3).



**Figura 6.1.** Comparación de muestras y referencia del conjunto 2 (programa cromatográfico de 35 minutos)



**Figura 6.2.** Comparación de muestras y referencia del conjunto 1 (programa cromatográfico de 13.5 minutos).

En relación al OE N° 4, se contrastaron los resultados químicos con los resultados de los análisis genéticos (qPCR) de TB realizados a las muestras de Pica 8 y El Olivar-Brillamar (inéditos y que forman parte de un proyecto de investigación del Sr Aryel Pacheco) con los resultados obtenidos en la presente investigación. La **Tabla 6.7** lista los resultados de los análisis de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* usando tres ensayos de qPCR por triplicado, luego establece el número de compuestos detectados mediante el análisis químico de identificación de compuestos con *m/z* diagnósticas utilizando como criterio

estricto para su contabilización la presencia del ion molecular y todos sus fragmentos, y finalmente indica el número de coincidencias entre la muestra y la referencia utilizada.

Números Inventario / códigos presente investigación	rpoB2	IS6110	IS1081	Análisis identificación de compuestos con <i>m/z</i> diagnósticas	Análisis de coincidencias
Pica 8					
B0418/BL-TBPI8-07	2/3	3/3	2/3	0/7	49/197
B0438/BL-TBPI8-08	0/3	0/3	1/3	0/7	71/179
B0439/ BL-TBPI8-09	0/3	0/3	1/3	0/7	133/197
B0469/ BL-TBPI8-10	3/3	3/3	3/3	0/7	111/197
B0644/ BL-TBPI8-11	0/3	0/3	0/3	2/7	55/179
El Olivar-Brillamar					
Ind 22 /BL-TBEOB-03	0/3	0/3	0/3	0/7	116/197

**Tabla 6.7.** Comparación entre los resultados de análisis genéticos de TB y los resultados obtenidos en la presente investigación.

Para el sitio Pica 8, la muestra del individuo **B0469** amplificó en los tres replicados para el ensayo rpoB2, en los tres replicados del ensayo IS6110, y en los tres del ensayo IS1081, y el número de coincidencias con la referencia puede considerarse como alto. El análisis de compuestos con *m/z* diagnósticas en la muestra de este individuo, sin embargo, no arrojó resultados positivos. La muestra del individuo **B0418** amplificó en dos de los tres replicados del ensayo rpoB2, en los tres replicados para el ensayo IS6110, y en dos de los tres replicados para el ensayo IS1081, y el número de coincidencias con la referencia puede considerarse como bajo. El análisis de compuestos con *m/z* diagnósticas en la muestra de este individuo no arrojó resultados positivos. La muestra del individuo **B0439** solo amplificó en uno de los tres replicados para el ensayo IS1081, sin embargo, el número de coincidencias con la referencia puede considerarse como alto. El análisis de compuestos con *m/z* diagnósticas en la muestra de este individuo, sin embargo, no arrojó resultados positivos. La muestra del individuo **B0438** solo amplificó en uno de los tres replicados para el ensayo IS1081 y el número de coincidencias con la referencia puede considerarse como bajo. El análisis de compuestos con *m/z* diagnósticas en la muestra de este individuo, además, no arrojó resultados positivos. La muestra del individuo **B0644**, finalmente, no amplificó ningún replicado para ningún ensayo, y el número de coincidencias con la referencia puede considerarse como bajo. El análisis de compuestos con *m/z* diagnósticas, sin embargo, si arrojó resultados positivos para dos compuestos ( $C_{78}$  y  $C_{80}$ ). La muestra del **individuo 22** de El Olivar-Brillamar, por su parte, tampoco amplificó ningún replicado para ningún ensayo, aunque el número de coincidencias con la referencia puede considerarse como alto. El análisis de compuestos con *m/z* diagnósticas en la muestra de este individuo, sin embargo, no arrojó resultados positivos.

Según esta comparación, las muestras B0439/ BL-TBPI8-09 y Ind 22 /BL-TBEOB-03 deben tomarse en consideración pues pese a no generar buenos resultados para ADN, sus resultados para el análisis de coincidencias fueron bastante altos. Las muestras con mejores resultados fueron la B0418/BL-TBPI8-07 y la B0469/ BL-TBPI8-10. Esta última presentó sólidos resultados de ADN y alto número de coincidencias con la referencia, y

puede considerarse la mejor muestra del conjunto analizado, la cual fue extraída de un individuo con claras evidencias osteológicas de tuberculosis (**Figura 6.3**).



**Figura 6.3.** Lesiones identificadas en el individuo B0469 de Pica 8. Arriba a la derecha: lesiones en los cuerpos de T12 y L1, Arriba al centro: lesión lítica en L1; Arriba a la derecha lesión lítica en el borde inferior del acetábulo derecho. Abajo: resorción, porosidad y periostitis en el codo derecho (húmero distal, radio y ulna proximal)

## 7. Capítulo 7. Conclusiones

De acuerdo al Objetivo General de esta investigación se concluyó que la técnica de análisis químico aplicada para la identificación de biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras esqueléticas presenta potencial para la identificación de individuos arqueológicos afectados por TB. El presente trabajo representa la primera prueba de esta metodología química en Chile.

A partir de los resultados obtenidos y retomando la Hipótesis planteada:

*Las muestras bioarqueológicas de individuos con lesiones óseas patognomónicas y/o consistentes con un diagnóstico de TB arrojarán resultados positivos para biomarcadores lipídicos de membrana de TB.*

podemos indicar que la hipótesis se comprueba, pero con consideraciones. Esto señala que las muestras bioarqueológicas de individuos con lesiones óseas patognomónicas y/o consistentes con un diagnóstico de TB analizadas con la metodología utilizada serán positivas para la presencia de los biomarcadores lipídicos de membrana de TB.

El Objetivo específico N° 1 se cumplió mediante el desarrollo de un protocolo propio y local para el análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB en muestras esqueléticas arqueológicas. Uno de los aportes a considerar es que fue demostrado que, a diferencia de lo hecho en trabajos previos, no es imprescindible el fraccionamiento de los preparados para los análisis utilizando espectrometría de masas. Otro aporte del presente trabajo es que constituye el segundo estudio en donde no se hicieron derivatizaciones (el primero siendo Borowska-Strugińska et al. 2014). En ese sentido el protocolo desarrollado en la presente investigación ofrece una manera de proceder que disminuye los costos, el tiempo, simplifica los análisis y reduce las posibles incidencias de errores procedimentales.

Los análisis de identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas de TB en las dos muestras óseas de individuos subactuales (Cementerio General) con TB ósea y diagnosticados con TB, y de un control negativo dieron resultados inesperados: alta detección en el control negativo, y detecciones inconsistentes en los dos tuberculosos. El análisis de  $m/z$  coincidentes, por su parte, dio resultados muy disímiles para los dos individuos con TB (alto número de coincidencias en uno y bajas coincidencias en el otro), en tanto las coincidencias fueron bajas con el control negativo.

El Objetivo específico N° 2, análisis de la presencia de biomarcadores lipídicos de TB en muestras humanas de distintos periodos cronoculturales chilenos, se cumplió. Sin embargo, deben considerarse algunas observaciones que se consignan a continuación. Las muestras óseas más antiguas (2500 años, Pisagua) de dos individuos con lesiones probablemente causadas por TB presentaron muy baja detección en el análisis de compuestos con  $m/z$  diagnósticas, en tanto que el control negativo mostró una alta detección de iones moleculares y fragmentos de algunos compuestos. Las coincidencias entre la referencia utilizada y las muestras de los dos individuos con lesiones probablemente causadas por TB

fueron disimiles, altas en un caso y bajas en el otro. Las coincidencias entre la referencia y el control negativo también fueron bajas.

Los resultados del análisis de compuestos con  $m/z$  diagnósticas en las muestras óseas de individuos con antigüedades de aproximadamente 1000 a 500 años (Pica 8, El Olivar) con lesiones probablemente causadas por TB dependieron de la duración del programa cromatográfico utilizado. Los ácidos micólicos y micoserósicos fueron detectados altamente en el programa con duración de 35 minutos y bajamente en el programa con duración de 35 minutos. En general, las coincidencias entre las referencias y las muestras fueron altas (las únicas bajas fueron BL-TBPi8-07, BL-TBPi8-08 y BL-TBPi8-11).

Es necesario recalcar que las detecciones resultaron mejor en el conjunto 2 tanto para el análisis de identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas como en el análisis de coincidencias. A su vez, no se deben comparar entre sí los números de coincidencias hallados en ambos conjuntos sino solo en relación a las referencias y el tiempo específico de análisis en cada conjunto.

El Objetivo específico N° 3 comprendió dos aspectos. El primero fue describir la utilidad de la técnica química en el análisis de TB en muestras humanas de distintos periodos cronoculturales chilenos, procedentes de distintos ambientes y con distintas historias tafonómicas, y el segundo fue generar información útil y pertinente para su publicación en términos técnico-metodológicos. Se concluyó que la técnica es útil, pero no definitiva, y que se requieren ajustes para mejorarla. Es útil, pues se obtuvieron resultados positivos a diferencia de la investigación de Green (2014) cuyos análisis no rindieron resultados positivos para ninguna de las muestras arqueológicas que analizó. No es definitiva, pues los resultados positivos fueron dispersos y no se alinearon en un 100% con las expectativas (*“Las muestras bioarqueológicas con lesiones óseas patognomónicas y/o consistentes con un diagnóstico de TB arrojarán resultados positivos para biomarcadores lipídicos de membrana de TB”*). Otro problema importante fue la inesperada detección de los compuestos seleccionados como biomarcadores lipídicos diagnósticos de TB en las muestras de control negativo. La falta de robustez de los resultados respecto de diagnósticos certeros en base a esta técnica debe considerar varios factores, incluyendo posible contaminación, posibles problemas al generar bases comparativas desde información teórica, calidad de las referencias utilizadas, y falta de calibración del método mediante múltiples pruebas. La falta de consistencias en los resultados respecto de diagnósticos certeros en base a esta técnica debe considerar que algunos resultados positivos en un análisis (identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas) no se reflejaron en el otro análisis (de coincidencias).

Frente a ambas opciones, se concluye que funcionaría mejor el análisis de coincidencias. Otra consideración tiene ver con la duración de los programas cromatográficos empleados, pues hubo mayores detecciones en el conjunto 2 (35 minutos), tanto para el análisis de identificación de compuestos con  $m/z$  diagnósticas como en el análisis de coincidencias. Por lo tanto, la técnica sirve para la detección cualitativa de los biomarcadores buscados, pero que es necesario atender los factores mencionados anteriormente. La robustez de la técnica se incrementaría al evaluar la presencia de agentes contaminantes exógenos en las muestras, evitar posible contaminación en los procedimientos de laboratorio, y evitar

contaminación por “ruido” en las detecciones mediante el software. Además, debe considerarse disponer de mejores bases comparativas, trabajar con estándares comerciales, generar estándares de ácidos micocerósicos (hasta ahora solo se dispone de estándares de ácidos micólicos), y calibrar los resultados mediante múltiples repeticiones del programa cromatográfico seleccionado.

El cumplimiento del Objetivo específico N°4 señaló una muestra con sólidos resultados respecto de la presencia del agente causante de tuberculosis y cuyos análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB resultaron positivos, hallándose entre aquellas con los más altos número de coincidencias con la referencia. En las otras muestras comparadas destaca una con buenos resultados para la detección genética del agente causante de tuberculosis, pero cuyos análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB arrojó bajo número de coincidencias. Lo que resultó más llamativo fue observar dos muestras cuyos análisis de biomarcadores lipídicos de membrana de TB mostraron alto número de coincidencias con la referencia, pero cuyos análisis genéticos no generaron tan buenos resultados. Al respecto debe señalarse que los resultados de los análisis genéticos de tuberculosis antigua todavía dan cuenta de problemas relacionados con la preservación del ADN del agente infeccioso (Harkins et al., 2015; Nelson et al., 2020).

La capacidad de la técnica para detectar la presencia de biomarcadores lipídicos de membrana de TB es cualitativa. En este sentido depende de establecer similitudes con las referencias, pero queda abierto el problema de ponderar las similitudes observadas (no siempre las muestras arqueológicas analizadas mostraran todos los indicadores de las referencias). Si bien se asume que las moléculas de los lípidos investigados son muy estables por sus características (**ver Marco Conceptual**), y su presencia se hace muy evidente en los análisis clínico-bioquímicos actuales (Song et al. 2009, Shui et al. 2011), la búsqueda de tales moléculas en muestras óseas arqueológicas debe ponderar que pueden estar incidiendo factores tafonómicos que las degraden y por tanto disminuyan las posibilidades de encontrarlas.

Al evaluar la técnica de análisis de los lípidos investigados en tanto biomarcadores de tuberculosis se puede señalar que esta es rápida, compleja (pero el protocolo evidenció que es más fácil de realizar que otros estudios similares), dependiente de la disponibilidad de instrumental y de los equipos de análisis (en este caso UHPLC acoplada a un espectrómetro de masas Orbitrap). La técnica es invasiva y destructiva, pero permite trabajar con muestras mínimas. Los resultados obtenidos de la presente investigación mostraron que corresponden a muestras complejas (huesos sometidos al tiempo y a condiciones ambientales distintas), pero que constituyen las normalmente disponibles en contextos arqueológicos. Se sugiere, en próximos experimentos, aplicar la técnica a otros tejidos humanos (piel, músculos y órganos momificados). Hasta ahora en general el diagnóstico paleopatológico de la TB depende de la consideración de evidencia esquelética, y en ocasiones de comprobaciones desde la genética (comprobación de la presencia del agente). Por ello, constituiría un avance el disponer de una técnica química complementaria, que sirva no solo para confirmar probables casos de TB con lesiones esqueléticas evidentes, sino que pueda dar resultados en individuos que no presenten

lesiones típicas, casos donde las lesiones no sean tan claras; o inclusive en restos humanos que no tengan ningún tipo de lesión visualmente verificable (Wood, Milner, Harpending, Weiss, Cohen, Eisenberg, y Wilkinson, 1992).

## 8. Referencias Bibliográficas

- Abián, J., Carrascal, M., Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica* 2. 16-35
- Allison, M., Mendoza, D., Pezzia, A. (1973). Documentation of a Case of Tuberculosis in Pre-Columbian America. *American Review of Respiratory Diseases* 107: 985-991.
- Allison, M., E. Gerszten, J., Munizaga, C. Santoro, Mendoza, D. (1981). Tuberculosis in Pre-Columbian Andean Populations. In J. Buikstra (ed.), *Prehistoric Tuberculosis in the Americas*: 49-51. Northwestern University, Archaeological Program.
- Anastasiou E, Mitchell P. (2013). Palaeopathology and genes: Investigating the genetics of infectious diseases in excavated human skeletal remains and mummies from past populations. *Gene* 528 (1). 33-40.
- Arriaza, B., W. Salo, Aufderheide, A, Holcomb, T. (1995). Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: molecular and skeletal evidence. *American Journal of Physical Anthropology* 98(1): 37-45.
- Arriaza, B., L. Cartmell, C. Moragas, A. Nerlich, W. Salo, M. Madden, A. Aufderheide (2008). The bioarchaeological value of human mummies without provenience. *Chungará* 40(1): 55-65.
- Aspillaga E, Castro M., C. Ocampo. (1990). Paleopathology and life-style: the Chonoan and Fuegian examples (Abstract). *American Journal of Physical Anthropology, Supplement*, p190.
- Aspillaga E, Castro M, Rodríguez M., C. Ocampo. (2006). Paleopatología y estilo de vida: el ejemplo de los Chonos. *Magallania (Chile)* 34 (1): 77-85.
- Assis S. and Keenleyside A. (2019). The macroscopic and histomorphological properties of periosteal rib lesions and its relation with disease duration: evidence from the Luis Lopes Skeletal Collection (Lisbon, Portugal). *Journal of Anatomy* 234: 480-501. doi:10.1111/joa.12936
- Aufderheide, A., Rodríguez-Martín, C. (1998). The Cambridge Encyclopedia of Human. *Paleopathology*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Ayala Bretón, C. (2004). Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. *Cuernavaca, Morelos: Instituto de Biotecnología, UNAM*.
- Backo H. and Verano J. (2001). Early tuberculosis in prehistoric northern coastal Peru. Paper presented at the 28th Annual Meeting of the Paleopathology Association, Kansas City, Missouri.
- Baker, O.; Lee, O.Y.-C.; Wu, H.H.T.; Besra, G.S.; Minnikin, D.E.; Llewellyn, G.; Williams, C.M.; Maixner, F.; O'Sullivan, N.; Zink, A.; Khawam, R; Coqueugniot, E; Helmer, D; Le Mort, F; Perrin, P; Gourichon, L; Dutailly, B; Pálfi, G; Coqueurniot, H; Dutour, O . (2015). Human tuberculosis predates domestication in ancient Syria. *Tuberculosis* 95, S4–S12
- Bastida R, Guichón R, Quse V. (2010). Escenarios para el origen y dispersión de la tuberculosis en Patagonia Austral y Tierra del Fuego. Nuevos actores y líneas de evidencia. *Mendoza: XVII Congreso Nacional de Arqueología Argentina*.

- Bastida R, Quse V, Guichón R. (2011). La tuberculosis en grupos de cazadores recolectores de Patagonia y Tierra del Fuego: Nuevas Alternativas de contagio a través de la fauna silvestre. *Revista Argentina de Antropología Biológica* 13 (1):83-95
- Bhatt, A., Molle, V., Besra, G. S., Jacobs, W. R., Kremer, L. (2007). The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: Their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Molecular Microbiology* 64(6): 1442-1454.
- Bello, S, Martinez, A, Gómez, A, Guerrero, M. (2008). Determinación de DNA de Mycobacterium tuberculosis en una momia Muisca por métodos moleculares: spoligotyping y PCR.IS6110. *Revista Salud Historia Sanidad* 3(2): on-line (acceso 06 Enero 2014)
- Berenguer J, and Dauelsberg P. (1989). El Norte Grande en la órbita de Tiwanaku (400 a 1200 d.C.). In Culturas de Chile. Prehistoria. Desde sus orígenes hasta los albores de la Conquista, Hidalgo J, Schiapacasse V, Niemeyer H, Aldunate C, and Solimano I. (Eds.), Andrés Bello, Santiago. pp 129-180.
- Borowska-Strugińska, B, Druszczyńska, M, Lorkiewicz, W, Szewczyk, R, Żądzińska, E. (2014). Mycolic acids as markers of osseous tuberculosis in the Neolithic skeleton from Kujawy region (central Poland). *Anthropological Review* 77 (2): 137-149
- Bos, K., K. Harkins, A. Herbig, M. Coscolla, N. Weber, I. Comas, S. Forrest, J. Bryant, S. Harris, V. Schuenemann, T. Campbell, K. Majander, A. Wilbur, R. Guichon, D. Wolfe Steadman, D. Collins Cook, S. Niemann, M. Behr, M. Zumarraga, R. Bastida, D. Huson, K. Nieselt, D. Young, J. Parkhill, J. Buikstra, S. Gagneux, A. Stone, J. Krause (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*. 514: 494-497 doi: 10.1038/nature13591.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, and Cole ST. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6): 3684–3689. <http://doi.org/10.1073/pnas.052548299>
- Buikstra J, Dahlstedt A, Honap T, Vågane A, Herbig A, Bos K, Krause J, Stone A. (2017). Orígenes y transmisiones de la tuberculosis en Sudamérica. VII PAMinSA, Paleopathology Association Meeting in South America, Arica (Chile), 25th-27th October 2017. Book of abstracts p 62-63.
- Buikstra, J. (2019). Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. *Tercera Edición. Arizona State University, Tempe, Arizona, Estados Unidos.*
- Burgess S. (1999). Chiribayan Skeletal Pathology on the South Coast of Peru: Patterns of Production and Consumption. Ph.D. dissertation, University of Chicago, Chicago, Illinois.
- Butler WR, Guthertz LS. (2001). Mycolic acid analysis by high-performance liquid Chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* 14:704–726
- Calle, S., Chasiluisa, S., Carvajal, J., Herrera, R. (2015). Procesamiento de datos de

- espectrometría de masas: Algoritmos y metodologías. *Maskana*, 6(Supl.), 199-207. Recuperado de <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/715>.
- Campana, M.G., Robles García, N., Rühli, F.J., Tuross, N. (2014). False positives complicate ancient pathogen identifications using high-throughput shotgun sequencing. *BMC Research Notes* 7: 111 <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-111>
- Castro M, and Aspillaga E. (2004). Paleopatología de las poblaciones prehistóricas. In *Poblaciones Chilenas: cuatro décadas de investigaciones bioantropológicas*. Rothhammer F, and Llop E. (Eds). Editorial Universitaria, Santiago, Chile. pp 37-55.
- Collins, M.J., Nielsen–Marsh, C.M., Hiller, J., Smith, C.I., Roberts, J.P., Prigodich, R.V., Wess, T.J., Csapò, J., Millard, A.R. and Turner–Walker, G. (2002), The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44: 383-394. doi:10.1111/1475-4754.t01-1-00071
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt K, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris S, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, and Gagneux S. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics* 45 (10): 1176-1182.
- Daffé, M., Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39: 131–203.
- Daffé M., Quémard A., Marrakchi H. (2017). Mycolic Acids: From Chemistry to Biology. En: Geiger O. (eds) *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. DOI 10.1007/978-3-319-43676-0\_18-1
- Daniel T. (1997). *Captain of Death. The Story of Tuberculosis*. Rochester, NY: University of Rochester Press.
- Daniel T. (2000). The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 4 (5): 395-400.
- Dkhar, H.K., Nanduri, R., Mahajan, S., Dave, S., Saini, A., Somavarapu, A.K., Arora, A., Parkesh, R., Thakur, K.G., Mayilraj, S., Gupta, P. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* Keto-Mycolic Acid and Macrophage Nuclear Receptor TR4 Modulate Foamy Biogenesis in Granulomas: A Case of a Heterologous and Noncanonical Ligand-Receptor Pair. *The Journal of Immunology* 193 (1) 295-305; DOI: 10.4049/jimmunol.1400092
- Donoghue H, Spigelman M, Zias J, Gernaey-Child A, D. Minnikin. (1998). Demonstration of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Letters in Applied Microbiology* 27: 265-269.
- Donoghue H. (2008). Paleomicrobiology of Tuberculosis. In *Raoult D, Drancourt M Eds.*,

*Paleomicrobiology: Past Human Infections. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp 75-99.*

- Donoghue H. (2009). Human tuberculosis -an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes and Infection* 11: 1156-1162
- Donoghue, H.D., Lee, O.Y-C., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Taylor, J.H., Spigelman, M. (2010). Tuberculosis in Dr. Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 51-56.
- Donoghue, H.D., Taylor G.M., Stewart G.R., Lee O.Y-C., Wu H.H.T., Besra G.S., Minnikin D.E. (2017). Positive Diagnosis of Ancient Leprosy and Tuberculosis Using Ancient DNA and Lipid Biomarkers. *Diversity* 9(4), 46; doi: 10.3390/d9040046
- Dormandy T. (1999). The white death: A history of tuberculosis. London: Hambledon.
- Dubnau E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Lanéelle, M.A., Yu, K., Quéward, A., Smith, I., Daffé, M. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* 36: 630–637.
- Ehrt S., Schnappinger, D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* virulence: lipids inside and out. *Nat. Med.* 13: 284–285
- Evershed, R. P., Turner-Walker, G., Hedges, R. E. M., Tuross, N., and Leyden, A., (1995), Preliminary results for the analysis of lipids in ancient bone, *Journal of Archaeological Science*, 22, 277–90
- Evershed, R.P. (2008), Organic residue analysis in archaeology: the archaeological biomarker revolution\*. *Archaeometry*, 50: 895-924. Doi:10.1111/j.1475-4754.2008.00446.x
- Feldberg GD. (1995). Disease and class: Tuberculosis and the shaping of modern North American society. New Brunswick, N.J.: Rutgers University Press.
- Fletcher H, Donoghue H, Holton J, Pap I, and Spigelman M. (2003). Widespread occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from 18th-19th century Hungarians. *American Journal of Physical Anthropology* 120(2):144-152. <https://doi:10.1002/ajpa.10114>
- Friedrich K, Nemeč S, Czerny C, Fischer H, Plischke S, Gahleitner A, Viola T, Imhof H, Seidler H, and Guillen S. (2010). The story of 12 Chachapoyan mummies through multidetector computed tomography. *European Journal of Radiology* 76 (2): 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2009.07.009>.
- Gagneux S. (2012). Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:850-859 doi:10.1098/rstb.2011.0316
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Power, J., Ahmed, A.M.S., Dixon, R.A., Roberts, C.A., Robertson, D.J., Nolan, J., Chamberlain, A. (1998). Detecting ancient tuberculosis. *Internet Archaeology* [http://intarch.ac.uk/journal/issue5/gernaey\\_index.html](http://intarch.ac.uk/journal/issue5/gernaey_index.html)
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Ahmed, A.M.S., Robertson, D.J., Nolan, J & Chamberlain, A.T. (1999). Correlation of the occurrence of mycolic acids with tuberculosis in an archaeological population. In: *Tuberculosis Past and Present*, Pálffy, G., Dutour, O., Deák J. & Hutás, I., pp. 275-282, Golden Book Publisher Ltd., Tuberculosis Foundation, Szeged, Hungary.

- Gernaey A, Minnikin D. (2000). Chemical methods in paleopathology. In *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science*, Cox, M. & Mays, S., pp. 239-253, Greenwich Medical Media Ltd., London, UK.
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Dixon, R.A., Middleton, J.C., Roberts, C.A. (2001). Mycolic acids and ancient DNA confirm an osteological diagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis* 81: 259-265.
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Ahmed, A.M.S., Chamberlain, A. (2002). A correlation between mycolic acid prevalence and reported tuberculosis frequency suggests a “biomarker” for poverty in ancient populations. In: *Archaeometry* 98, Jerem, E. & Biró, K.T., pp. 27-32, Archaeopress, Oxford, UK.
- Ghodbane, R., Medie, F. M., Lepidi, H., Nappez, C., and Drancourt, M. (2014). Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology* 160 (3): 496-501, <https://doi.org/10.1099/mic.0.073379-0>
- Gómez J, and Mendonça S. (2003) Prehistoric tuberculosis in America: adding Comments to a Literature Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl. I): 151-159
- Gomis Yagües, V. (2008). Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial: Cromatografía, principios generales. *España. Universidad de Alicante. Recuperado de <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8246>*
- Guichón R, Buikstra J, Massone M, Wilbur A, Suby J, Constantinescu F, Prieto A. (2009). Tuberculosis pre contacto interétnico en Tierra del Fuego. Confirmación por métodos moleculares en el sitio Myren (Chile). Puentes y transiciones (Bridges and transitions), Resúmenes del III Congreso de la Asociación de Paleopatología en Sudamérica (*III Paleopathology Association Meeting in South America*). Edited by Suby J. and R. Guichón, Editorial Laboratorio de Ecología Evolutiva Humana. p: 46.
- Guichón RA, Buikstra JE, Stone AC, Harkins KM, Suby JA, Massone M, Prieto A, Wilbur A, Constantinescu F, Rodríguez-Martín C. (2015). Pre-Columbian tuberculosis in Tierra del Fuego? Discussion of the paleopathological and molecular evidence. *International Journal of Paleopathology* 11: 92–101
- Guillén S. (2012). A History of Paleopathology in Peru and Northern Chile: From Head Hunting to Head Counting. In *The Global History of Paleopathology: Pioneers and Prospects*, Buikstra J, and Roberts C. (Eds). Oxford University Press, pp 312-328.
- Gupta, R. S., Lo, B., Son, J. (2018). Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Frontiers in Microbiology* 9: 67 doi: 10.3389/fmicb.2018.00067
- Harkins KM, Buikstra JE, Campbell T, Bos KI, Johnson ED, Krause J, Stone AC. (2015). Screening ancient tuberculosis with qPCR: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1660), 20130622. <http://doi.org/10.1098/rstb.2013.0622>
- Hershkovitz, I., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Lee, O.Y-C., Gernaey, A.M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C.L., Lemma, E., Bar-Gal, G.K., Spigelman, M. (2008). Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium*

- tuberculosis* from a Neolithic settlement in the eastern Mediterranean. *PLoS ONE* 3: e3426.
- Horst, Bjorn & Feringa, Ben & Minnaard, Adriaan. (2007). Catalytic Asymmetric Synthesis of Mycoerolic Acid. *Chemical communications* (Cambridge, England). 38. 489-91. 10.1039/b612593j.
- Kazarina, A, Gerhards,G, Petersone-Gordina, E, Kimsis,J, Pole, I, Zole,E, Leonova, V, Ranka, R. (2019). Analysis of the bacterial communities in ancient human bones and burial soil samples: Tracing the impact of environmental bacteria. *Journal of Archaeological Science* 109: <https://doi.org/10.1016/j.jas.2019.104989>.
- Kalsum, S., Braian, C., Koeken, V.A.C.M., Raffetseder, J., Lindroth, M., van Crevel, R., Lerm, M. (2017). The cording phenotype of *Mycobacterium tuberculosis* induces the formation of extracellular traps in human macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 7: 278. doi: 10.3389/fcimb.2017.00278
- Kaneda, K., Imaizumi, S., & Yano, I. (1995). Distribution of C22-, C24- and C26-alpha-unit-containing mycolic acid homologues in mycobacteria. *Microbiology and immunology*, 39(8), 563–570. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02243.x>
- Kaneda, K., Imaizumi, S., Mizuno, S., Baba, T., Tsukamura, M., & Yano, I. (1988). Structure and molecular species composition of three homologous series of alpha-mycolic acids from *Mycobacterium* spp. *Journal of general microbiology*, 134(8), 2213–2229. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-8-2213>
- Kaneda, K., Naito, S., Imaizumi, S., Yano, I., Mizuno, S., Tomiyasu, I., Baba, T., Kusunose, E., & Kusunose, M. (1986). Determination of molecular species composition of C80 or longer-chain alpha-mycolic acids in *Mycobacterium* spp. by gas chromatography-mass spectrometry and mass chromatography. *Journal of clinical microbiology*, 24(6), 1060–1070. <https://doi.org/10.1128/JCM.24.6.1060-1070.1986>
- Klaus H, Wilbur A, Temple D, Buikstra J, Stone A, Fernandez M, Wester C, Tam M. (2010). Tuberculosis on the north coast of Peru: skeletal and molecular paleopathology of late pre-Hispanic and postcontact mycobacterial disease. *Journal Archaeological Science* 37: 2587–2597.
- Kaur, D., Guerin, M.E., Skovierová, H., Brennan, P.J., Jackson, M. (2009). Biogenesis of the Cell Wall and Other Glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in Applied Microbiology* 69: 23-78 doi: 10.1016/S0065-2164(09)69002-X.
- Kim Y, Lee I, Oh C, Kim M, Cha S, and Shin D. (2016). Calcified Pulmonary Nodules Identified in a 350-Year-Old-Joseon Mummy: the First Report on Ancient Pulmonary Tuberculosis from Archaeologically Obtained Pre-modern Korean Samples. *Journal of Korean Medical Science* 31(1):147-151. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.1.147>
- Klaus H, Wilbur A, Temple D, Buikstra J, Stone A, Fernandez M, Wester C, and Tam M. (2010). Tuberculosis on the north coast of Peru: skeletal and molecular

- paleopathology of late pre-Hispanic and postcontact mycobacterial disease. *Journal Archaeological Science* 37: 2587–2597.
- Konomi N, Lebowhl E, Mowbray K, Tattersall I, and Zhang D. (2002). Detection of Mycobacterial DNA in Andean Mummies. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (12): 4738-4740
- Lee O, Bull I, Molnár E, Marcsik A, Pálfi G, Donoghue H, Besra G, D. Minnikin. (2012a). Integrated strategies for the use of lipid biomarkers in the diagnosis of ancient mycobacterial disease. *In Proceedings of the 12th Annual Conference of the British Association for Biological Anthropology and Osteoarchaeology (BABA O). Mitchell, P.D. & Buckberry J., editors. Archaeopress, Oxford, UK.*
- Lee, O.Y.-C.; Wu, H.H.T.; Donoghue, H.D.; Spigelman, M.; Greenblatt, C.L.; Bull, I.D.; Rothschild, B.M.; Martin, L.D.; Minnikin, D.E.; Besra, G.S. (2012b). Mycobacterium tuberculosis complex lipid virulence factors preserved in the 17,000-year-old skeleton of an extinct bison, *Bison antiquus*. *PLoS ONE* 7, e41923.
- Lee, O.Y.-C.; Wu, H.H.T.; Besra, G.S.; Rothschild, B.M.; Spigelman, M.; Hershkovitz, I.; Kahila Bar-Gal, G.; Donoghue, H.D.; Minnikin, D.E. (2015). Lipid biomarkers provide evolutionary signposts for the oldest known cases of tuberculosis. *Tuberculosis* 95, S127–S132
- Leguizamón, J.E. (2012). Búsqueda de marcadores genómicos y lipídicos de *Mycobacterium colombiense*, una micobacteria potencialmente virulenta perteneciente al complejo MAC. *Tesis Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.*
- Lemp, C., Rodríguez, M., Retamal, R., Aspillaga, E. (2008). Arqueología del depósito: manejo integral de las colecciones bioantropológicas en el Departamento de Antropología de la Universidad de Chile. *Conserva* 12: 69-96
- Lombardi G., García, U. (2000). Multisystemic Tuberculosis in a Pre-Columbian Peruvian Mummy: Four Diagnostic Levels, and a Paleoepidemiological Hypothesis. *Chungara* 32 (1): 55-60.
- Lovell, N.C. (2000). Paleopathological description and diagnosis. En *Biological Anthropology of the Human Skeleton*. Katzenberg M.A. y Saunders S.R. (Eds). Segunda Edición. Willey. pp. 217-248.
- Lumbreras L. (2006). Un formativo sin cerámica y cerámica preformativa. *Estudios Atacameños* 32:11-34.
- Luna, L., Aranda, C., Santos, AL., Donoghue, H., Minnikin, D., Lee, O., Houdini, W., Besra, G., Ratto N. (2017). *Mycobacterium Tuberculosis* Complex en un individuo de fines del primer milenio D.C. procedente de Saujil, Provincia De Catamarca, Argentina. Resúmenes del VII PAMinSA (*Paleopathology Association Meeting in South America*), páginas 60-61.
- Luna, L, Aranda, C, Santos, A, Donoghue, H, Lee, O, Wu, H, Besra, G, Minnikin, D; Llewellyn, G, Williams, C, Ratto, N (2020). Oldest evidence of tuberculosis in Argentina: A multidisciplinary investigation in an adult male skeleton from Saujil, Tinogasta, Catamarca (905-1030 CE). *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland). 125. 101995. 10.1016/j.tube.2020.101995.
- Marrakchi, H., Lanéelle, MA., Daffé, M. (2014) Mycolic acids: structures, biosynthesis, and

- beyond. *Chemistry & Biology* (1):67-85. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.11.011
- Mark, L., Z. Patonai, A. Vaczy, T. Lorand, A. Marcsik. (2010). High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection. *Journal of Archaeological Science* 37:302-305.
- Mark L, Gulyas-Fekete G, Marcsik A, Molnar E, Palfi G. (2011). Analysis of ancient mycolic acids by using MALDI TOF MS: response to “Essentials in the use of mycolic acid biomarkers for tuberculosis detection” by Minnikin et al., 2010. *Journal of Archaeological Science* 38: 1111-1118
- Martín, M., Ballesteros, M. (2008). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 30: 113-168.
- Martinez A, Meléndez B, and Manrique F. (2010). Bio-anthropology and paleopathology of the SO10-IX muisca mummy from Sátivanorte, Boyacá, Colombia. *Colombia Médica* 41(2): 112-120.
- Masson, M.; Molnár, E.; Donoghue, H.D.; Besra, G.S.; Minnikin, D.E.; Wu, H.H.T.; Lee, O.Y.-C.; Bull, I.; Pálfi, G. (2013). Osteological and biomolecular evidence of a 7000-year-old case of hypertrophic pulmonary osteopathy secondary to tuberculosis from Neolithic Hungary. *PLoS ONE* 8, e78252.
- Masson, M.; Bereczki, Z.; Molnár, E.; Donoghue, H.D.; Minnikin, D.E.; Lee, Y.-C.; Wu, H.H.T.; Besra, G.S.; Bull, I.D.; Pálfi, G. (2015). 7000 year-old tuberculosis cases from Hungary—Osteological and biomolecular evidence. *Tuberculosis* 95, S13–S17
- Minnikin, D.E. & Polgar, N. (1967a). Mycolic acids from human and avian tubercle bacilli. *Chemical Communications*, 916–918.
- Minnikin, D.E. & Polgar, N. (1967b). The methoxymycolic and ketomycolic acids from human tubercle bacilli. *Chemical Communications*, 1172-1174.
- Minnikin, D.E., Lee, O.Y.-C., Pitts, M., Baird, M.S. and Besra, G.S. (2010). Essentials in the use of mycolic acid biomarkers for tuberculosis detection: response to “High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection” by Mark *et al.* 2010. *Journal of Archaeological Science* 37: 2407-2412.
- Minnikin D, Besra G, Lee O, Spigelman M, Donoghue H. (2011). The interplay of DNA and lipid biomarkers in the detection of tuberculosis and leprosy in mummies and other skeletal remains, In: *Yearbook of Mummy Studies 1*, Gill-Frerking, G., Rosendahl, W., Zink, A. & Piombino-Mascali, D., pp. 109-114, Verlag Dr. Friedrich Pfeil, ISBN 978-3-89937-137-6, München, Germany.
- Minnikin D, Lee O, Wu H, Besra G, Donoghue, H. (2012). Molecular Biomarkers for Ancient Tuberculosis, Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), ISBN: 978-953-307-946-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-deciphering-the-secret-life-of-thebacilli/molecular-biomarkers-for-ancient-tuberculosis>
- Minnikin DE, Lee OY, Wu HH, Besra GS, Bhatt A, Nataraj V, Rothschild BM, Spigelman M Donoghue HD. (2015) Ancient mycobacterial lipids: Key reference biomarkers in charting the evolution of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*.95 Suppl 1: S133-9. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.009.

- Minnikin DE., Lee OY-C., Wu HHT., Besra G. (2017). The power and potential of lipid biomarkers in the diagnosis of ancient tuberculosis. *Poster presentado VII PAMinSA, Paleopathology Association Meeting in South America, Arica, 25-27 Octubre 2017. Resumen publicado en VII Reunión de la asociación de Paleopatología en Sudamérica: Vida y muerte en el Desierto de Atacama. Disponible en: <http://www.paminsavii.uta.cl/downloads/Programa-PAMinSA-28-09-2017.pdf> [Revisado Nov 09 2018].*
- Molnar E, Helen D. Donoghue, Oona Y-C. Lee, Houdini H.T. Wu, Gurdyal S. Besra, David E. Minnikin, Ian D. Bull, Gareth Llewellyn, Christopher M. Williams, Olga Spekker, György Pálfi. (2015). Morphological and biomolecular evidence for tuberculosis in 8th century AD skeletons from Bélmegyer-Csömöki domb, Hungary. *Tuberculosis* DOI 10.1016/j.tube.2015.02.032
- Moon, M-S., Kim, S-S., Moon, H-L., Kim, D-H. (2017). Mycobacterium Tuberculosis in Spinal Tuberculosis. *Asian Spine Journal* 11(1):138-149. <https://doi.org/10.4184/asj.2017.11.1.138>
- Myers, O. D., Sumner, S. J., Li, S., Barnes, S., & Du, X. (2017). Detailed Investigation and Comparison of the XCMS and MZmine 2 Chromatogram Construction and Chromatographic Peak Detection Methods for Preprocessing Mass Spectrometry Metabolomics Data. *Analytical chemistry*, 89(17), 8689–8695. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01069>
- Nataraj, V-S, Varela Ramirez, C, Javid, A, Singh, A, Besra, GS., Bhatt, A (2015). Mycolic acids: deciphering and targeting the Achilles' heel of the tubercle bacillus. *Molecular Microbiology* 98 (1): 7-16. <https://doi.org/10.1111/mmi.13101>
- Nelson, E, Buikstra, J Herbig, A , Tung, T, Bos, K. (2020). Advances in the molecular detection of tuberculosis in pre-contact Andean South America. *International Journal of Paleopathology*. 29. 10.1016/j.ijpp.2019.12.006.
- Nieto L.M., Mehaffy, C., Dobos K.M. (2017). The Physiology of Mycobacterium tuberculosis in the Context of Drug Resistance: A System Biology Perspective. En: *Mycobacterium - Research and Development*, Wellman Ribón, IntechOpen. DOI:10.5772/intechopen.69594. Disponible en <https://www.intechopen.com/books/mycobacterium-research-and-development/the-physiology-of-mycobacterium-tuberculosis-in-the-context-of-drug-resistance-a-system-biology-pers>
- Nieto, L.M., Mehaffy, C., Nurul Islam, M., Fitzgerald, B., Belisle, J., Prenni, J., Dobos, J. (2018). Biochemical Characterization of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Can the Analysis of Clonal Strains Reveal Novel Targetable Pathways?. *Molecular & Cellular Proteomics* 17(9): 1685-1701. DOI: 10.1074/mcp.RA118.000821
- Núñez L. (2006). Asentamientos Formativos Complejos en el Centro-Sur Andino: cuando la periferia se constituye en núcleo. *Boletín de Arqueología PUCP* 10:321-356.

- Ocampo C., E. Aspillaga. (1984). Breves notas sobre una prospección arqueológica en los archipiélagos de las Guaitecas y de los Chono. *Revista Chilena de Antropología* 4:155-156.
- Ortner, D. (2003). Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. *Second Edition; Smithsonian Institution, National Museum of Natural History. Academic Press.*
- Ortner D.J., Putschar W. G. J. (1981). Identification of pathological conditions in human skeletal remains. *Smithsonian Contributions to Anthropology No. 28. Smithsonian Institution Press, Washington D. C*
- Pacheco A. (2015). New Probable Cases of Pre-Columbian Tuberculosis (TB) in Chile. *Poster presented at IV PAMinSA, Paleopathology Association Meeting in South America, Buenos Aires, 12-14 August 2015. Resumen publicado en Libro de resúmenes del VI Congreso de la Asociación de Paleopatología en Sudamérica / Leandro Hernán Luna... [et.al.]. -1a ed.- Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Grupo de Investigación en Bioarqueología, 2015. (PDF) PAMinSA VI 2015. Libro de resúmenes - Book of abstracts. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/280320608\\_PAMinSA\\_VI\\_2015\\_Libro\\_de\\_resúmenes\\_-\\_Book\\_of\\_abstracts](https://www.researchgate.net/publication/280320608_PAMinSA_VI_2015_Libro_de_resúmenes_-_Book_of_abstracts) [Revisado Nov 09 2018].*
- Pálfi G, Dutour O, Deák J, Hutás I (eds). (1999). Tuberculosis Past and Present. *Golden Books/Tuberculosis Foundation: Szeged.*
- Piombino-Mascali D, Jankauskas R, Tamošiūnas A, Valančius R, Gill-Frerking H, Spigelman M, and Panzer S. (2015). Evidence of probable tuberculosis in Lithuanian mummies. HOMO 66(5): 420-431. <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2015.01.004>*
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M, (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics* 11:395. PMID: 20650010
- Raman, K., Rajagopalan, P., Chandra, N. (2005). Flux Balance Analysis of Mycolic Acid Pathway: Targets for Anti-Tubercular Drugs. *PLoS Computational Biology* 1(5): e46. doi: 10.1371/journal.pcbi.0010046.
- Redman J, Stewart M, Gernaey, A. (2002). Ancient tuberculosis and lipid chemistry - odd bedfellows! *European Journal of Archaeology* 5: 112-120
- Redman, J.E., Shaw, M.J., Mallet, A.I., Santos, A.L., Roberts, C.A., Gernaey, A.M. Minnikin, D.E. (2009). Mycocerosic acid biomarkers for the diagnosis of tuberculosis in the Coimbra skeletal collection. *Tuberculosis* 89: 267-277.
- Reitz E.J., Shackley M. (2012) Viruses, Bacteria, Archaea, Protists, and Fungi. In: *Environmental Archaeology. Manuals in Archaeological Method, Theory and Technique.* Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3339-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3339-2_6)
- Retamal R, and Pacheco A. (2010). Perfil Bioantropológico Cementerio Pica-8: Paleopatología y Modos de Vida (Período Intermedio Tardío, Complejo Pica-Tarapacá). Presentation to the Simposio Regional Norte Grande, XVII Congreso Nacional de Arqueología Chilena (Valdivia, October 2006). Published in *Actas* (2010) p 71-81

- Retamal R, Pacheco A, Uribe M. (2018) Bioarchaeology in Chile: What It Is, Where We Are, and Where We Want to Go. In *Archaeological Human Remains: Legacies of Imperialism, Communism and Colonialism*. O'Donnabhain B, and Lozada M. (Eds). Springer Publishing, Chapter 2, pp 7-24.
- Regert, M. (2011), Analytical strategies for discriminating archeological fatty substances from animal origin. *Mass Spectrom. Rev.*, 30: 177-220. doi:10.1002/mas.20271
- Reyes O, San Román M., Moraga, M. (2011). Archipiélago de Los Chonos: Nuevos registros arqueológicos y bioantropológicos en los canales septentrionales. Isla Traiguén, Región de Aisén. *Magallania (Chile)* 39 (2):293-301
- Richard, H., Perry, R., Graham, C., Robert, J. (2008). Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 661-699.
- Rivera M. 1991. The prehistory of Northern Chile: A Synthesis. *Journal of World Prehistory* 5 (1): 1-47.
- Roberts, C. (2011). The Bioarchaeology of Leprosy and Tuberculosis: a comparative study of perceptions, stigma, diagnosis, and treatment. *En: Arwal S. y Glencross B. (eds). Social Bioarchaeology, Wiley-Blackwell. 252-281.*
- Roberts, C. (2012). Re-emerging infections: developments in bioarchaeological contributions to understanding tuberculosis today. *En: Grauer A. (ed), A companion to paleopathology. Wiley-Blackwell. 434-457.*
- Roberts C, Buikstra J. (2003). The Bioarchaeology of Tuberculosis. *University Press of Florida: Gainesville.*
- Roberts C, and Buikstra J. 2019. Bacterial Infections. In *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*. Buikstra J. (Ed.). Third Edition, Arizona State University, Tempe, Arizona (USA), pp 321-439.
- Roberts, C., Lucy, D., Manchester, K. (1994). Inflammatory lesions of ribs: An analysis of the Terry Collection. *American Journal of Physical Anthropology* 95 (2): 169-182.
- Roberts C., Manchester, K. (2010). *The Archaeology of Disease*. 3<sup>rd</sup> Edition. The History Press.
- Rodríguez M. (2012). Análisis intrapoblacional de paleopatologías en el Colección Archipiélago de Chonos de la Universidad de Chile. Memoria para obtener el título profesional de Antropóloga Física. *Departamento de Antropología, Facultad de Ciencias Sociales, Universidad de Chile.*
- Ryan F. (1992). *Tuberculosis: The greatest story never told*. Bromsgrove: Swift Publishers.
- Sabin S, Herbig A, Vågane A, Ahlström T, Bozovic G, Arcini C, Kühnert D, and Bos K. version posted March 25, 2019. A seventeenth-century Mycobacterium tuberculosis genome supports a Neolithic emergence of the Mycobacterium tuberculosis complex. bioRxiv 588277; <https://doi.org/10.1101/588277>
- Salo W, Aufderheide A, Buikstra J, Holcomb T. (1994). Identificación of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian mummy. *Proceedings of the National Academy of Science* 91: 2091-2094.

- Sáez, A. (2008). Impacto del contacto hispano-indígena en la salud de la población de Chiloé. Un caso de tuberculosis en el Cementerio Puqueldon 1. *Magallania* 36(2): 167-174.
- Schultz M, and Schmidt-Schultz TH. (2015). Is it possible to diagnose TB in ancient bone using microscopy?. *Tuberculosis (Edinb)*, 95 Suppl 1:80-86.  
doi:10.1016/j.tube.2015.02.035
- Secanella-Fandos, S., Luquin, M., Pérez-Trujillo, M., Julián, E. (2011). Revisited mycolic acid pattern of *Mycobacterium confluentis* using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B* 879(26): 2821-2826.  
<https://doi.org/10.1016/j.ichromb.2011.08.001>
- Shui, G., Bendt, A. K., Jappar, I. A., Lim, H. M., Laneelle, M., Hervé, M., Via, L. E., Chua, G. H., Bratschi, M. W., Zainul Rahim, S. Z., Michelle, A. L., Hwang, S. H., Lee, J. S., Eum, S. Y., Kwak, H. K., Daffé, M., Dartois, V., Michel, G., Barry, C. E., 3rd, & Wenk, M. R. (2012). Mycolic acids as diagnostic markers for tuberculosis case detection in humans and drug efficacy in mice. *EMBO molecular medicine*, 4(1), 27–37.  
<https://doi.org/10.1002/emmm.201100185>
- Silva V, Pacheco A, Bahamondez F, Cabello H, Olguín Y. (2016). Radiographic analysis of the Pisagua Mummies Collection curated at the Museo Nacional de Historia Natural of Chile. *Poster presentado al 9th World Congress on Mummy Studies, Lima, Peru, Agosto 2016. En Abstracts p. 205.*  
<http://www.centromallqui.pe/mummycongress/bookofabstracts/>
- Song, S. H., Park, K. U., Lee, J. H., Kim, E. C., Kim, J. Q., & Song, J. (2009). Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *Journal of microbiological methods*, 77(2), 165–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.023>
- Sotomayor H, Burgos J., Arango M. (2004). Demostración de tuberculosis en una momia prehispánica colombiana por la ribotipificación del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica* 24 (Supl.): 18-26
- Southern, P (2008) Archeology Meets Clinical Microbiology: Analysis of the Microbial Content of Soil From Archeological Sites in Italy and Belize, *Laboratory Medicine*, Volume 39, Issue 10, October 2008, Pages 601–602,  
<https://doi.org/10.1309/LMHJGYSYAPHCNV9>
- Steinbock R. (1976). *Paleopathological Diagnosis and Interpretation. Charles C. Thomas: Springfield, IL.*
- Stone A, Wilbur A, Buikstra J, and Roberts C. (2009). Tuberculosis and Leprosy in Perspective. *Yearbook of Physical Anthropology* 52:66-94
- Suby J, and Luna L. (2019). Paleopathology in Southern South America: recent advances and future challenges. In *Biological Anthropology of Latin America: Historical*

Development and Recent Advances. Ubelaker D, and Colantonio S. (Eds.). Smithsonian Contributions to Anthropology N°51, Smithsonian Institution Scholarly Press. pp 311-323.

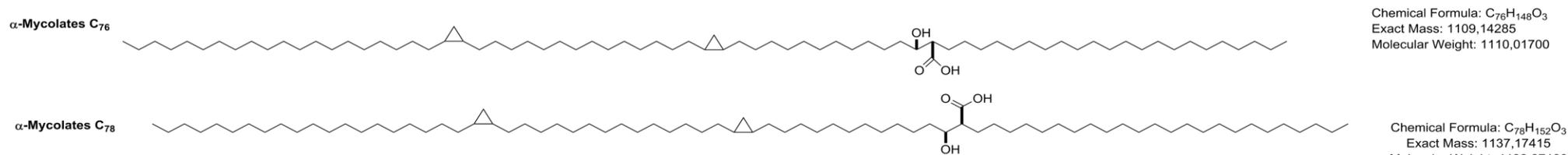
- Takayama K, Wang C, Besra GS. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews* 18(1):81–101.
- Tilley L, Nystrom K. (2019). A “cold case” of care: Looking at old data from a new perspective in mummy research. *International Journal of Paleopathology* <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.08.001>
- Toyne J, Murphy M, Klaus H. (2020). An introduction to advances in Andean South American paleopathology. *International Journal of Paleopathology*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2019.09.001>.
- Velayati ,A, Farnia, P. (2016). Atlas of *Mycobacterium Tuberculosis*. 1ra Edición. Academic Press.
- Verano J. (1997). Advances in the paleopathology of Andean South America. *Journal of World Prehistory* 11: 237–268. <https://doi.org/10.1007/BF02221205>
- Verano J, and Lombardi G. (1999). Paleopatología en Sudamerica Andina. *Bulletin du Institute Francaise d’Études Andines* 28(1): 91-121.
- Verano J. (2003). Human Skeletal Remains from Machu Picchu. In *The 1912 Yale Peruvian Scientific Expedition Collections from Machu Picchu: Human and Animal Remains*. Burger R. L and L. Salazar (Eds.), Yale University Publications in Anthropology, New Haven. pp. 65-117.
- Verano J. (2019). Looking back, looking forward: Paleopathology in Andean South America. *International Journal of Paleopathology*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2019.10.001>.
- Waldron, T. (2009). *Palaeopathology*. Cambridge Manuals in Archaeology. New York. Cambridge University Press.
- Warinner, C , Herbig, A ,Mann, A Fellows Yates,J., Weiß, C, Burbano,H, Orlando,L, Krause,J. (2017) A Robust Framework for Microbial Archaeology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2017 18:1, 321-356
- Warrier, T. Tropis, M., Werngren, J., Diehl, A., Gengenbacher, M., Schlegel, B., Schade, M., Oschkinat, H., Daffe, M., Hoffner, S. Eddine, A. N., Kaufmann, Stefan H. E. (2012). Antigen 85C Inhibition Restricts *Mycobacterium tuberculosis* Growth through Disruption of Cord Factor Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (4): 1735–1743. DOI: 10.1128/AAC.05742-11
- Wood, J., Milner, G., Harpending, H., Weiss, K., Cohen, M., Eisenberg, L., Wilkinson, R. (1992). The Osteological Paradox: Problems of Inferring Prehistoric Health from Skeletal Samples [and Comments and Reply]. *Current Anthropology*, 33(4), 343-370. **Anexos**



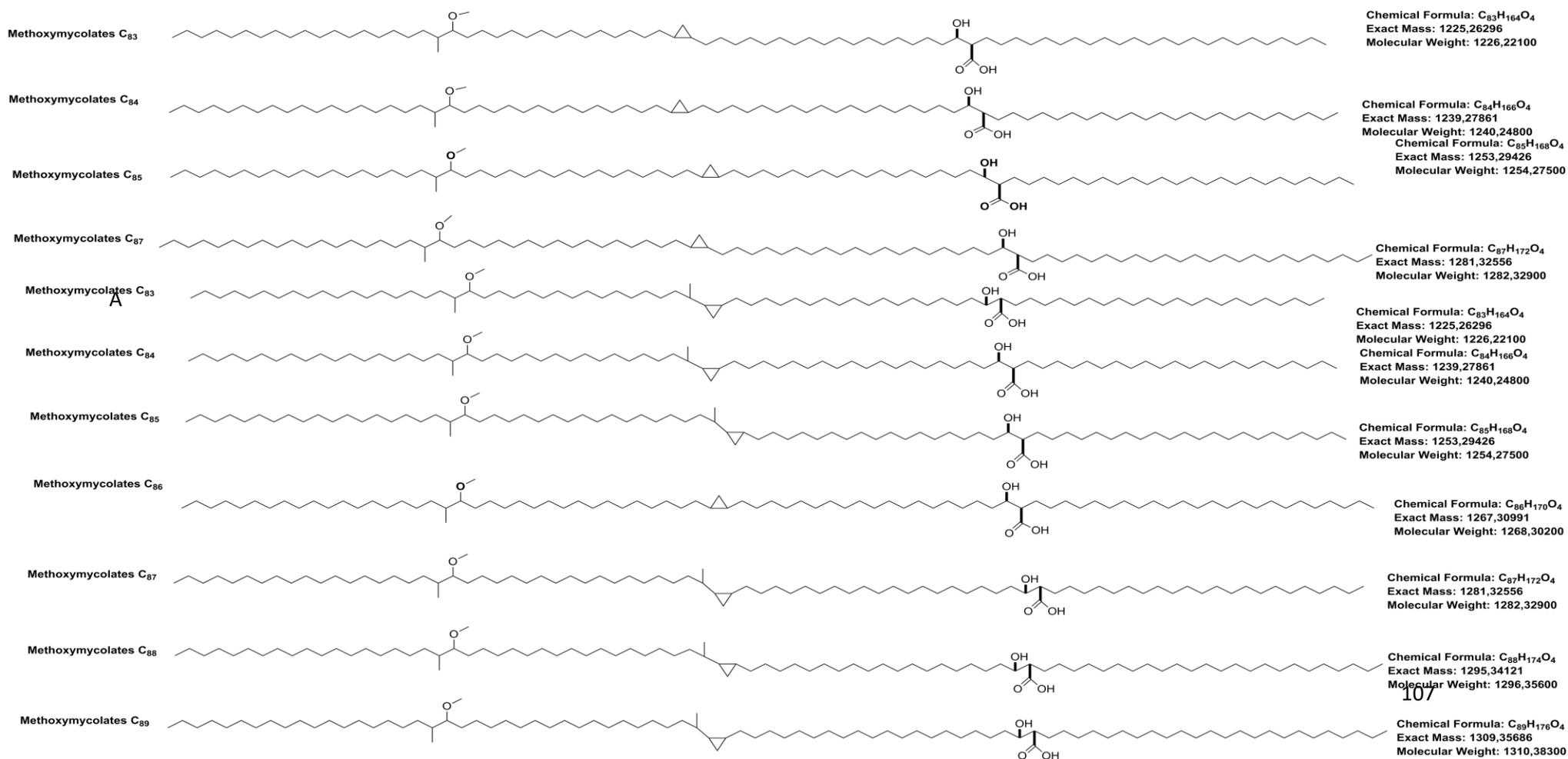
## **9.Anexos**

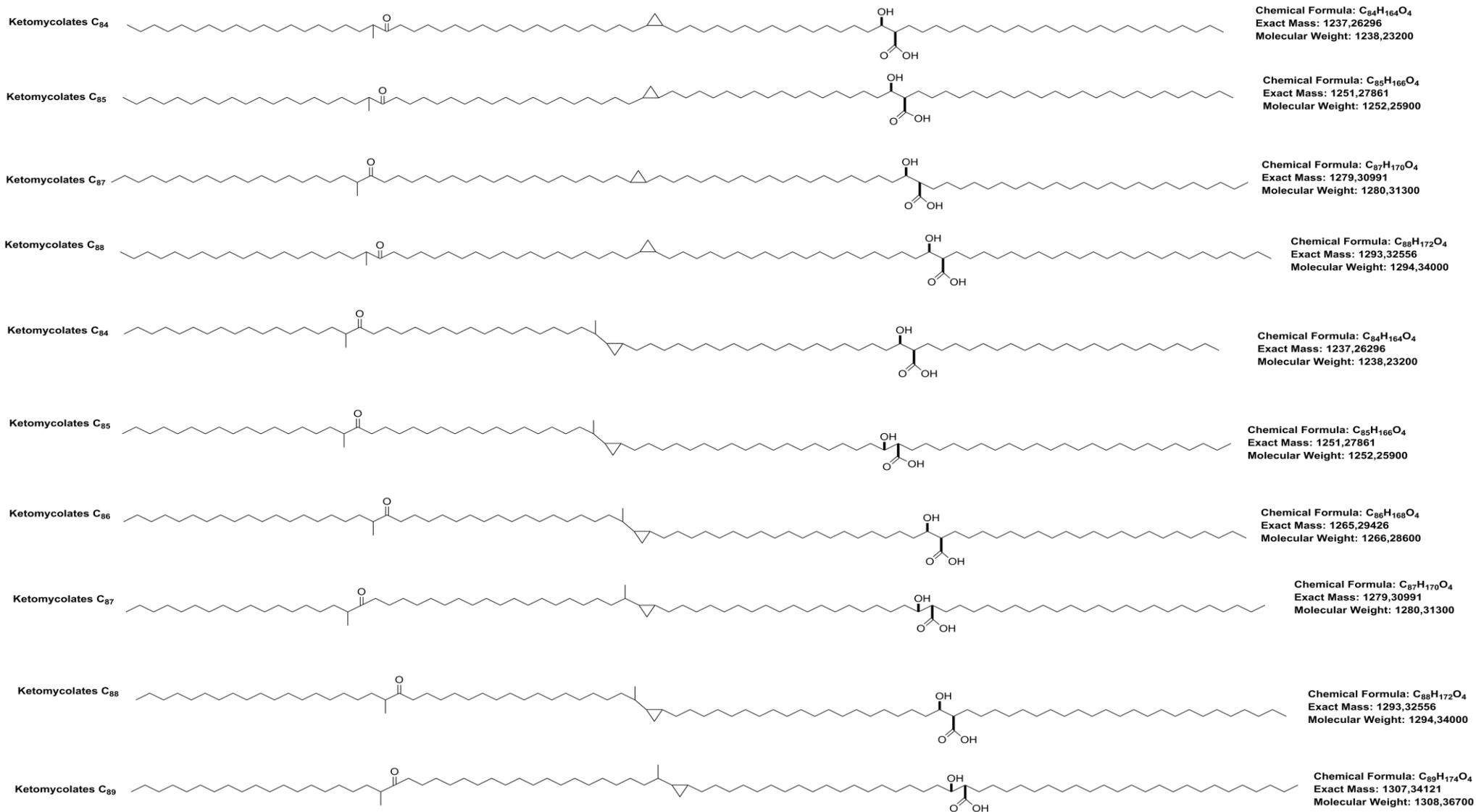
### **Anexo 1: FIGURAS DE LAS CADENAS DE LAS MOLÉCULAS GENERADAS A PARTIR DE LAS FORMULAS EN CHEMDRAW**

**A. Mycolates**



(\*) Alfa C82 y los Alfa-micolatos impares no pudieron ser generados desde la fórmula extraída de Minnikinn et al 2012. La suma máxima de la fórmula genera el alfa-C80.





**Anexo 2: DETECCIONES GENERADAS POR PEAK DETECTION PARA REFERENCIAS BL-EACMYC Y BL-ECTB Y EN LOS PROGRAMAS CROMATOGRÁFICOS DE 35 Y 13.5 MINUTOS.**

**35 Minutos**

row ID	row m/z	row retention time	BL-EACMYC Peak status	BL-TBCG-01 Peak status	BL-TBCG-02 Peak status	BL-CG-03 Peak status	BL-PISA-04 peak status	BL-TBPi8-08 Peak status	BL-TBPi8-11 Peak status
4	112.98	2.727.875	DETECTED	1	0	0	0	0	0
5	117.01	31.564.277.777.777.700	DETECTED	0	1	1	0	0	0
12	125.87	2.901.111.111.111.110	DETECTED	1	0	0	0	1	0
21	132.86	277.765	DETECTED	1	1	1	0	1	1
25	134.86	27.844	DETECTED	1	1	1	0	1	1
31	134.89	28.409.416.666.666.600	DETECTED	0	0	0	0	1	0
33	137.02	17.712.277.777.777.700	DETECTED	0	1	1	0	0	0
36	138.01	17.349.333.333.333.300	DETECTED	0	1	1	0	0	0
47	151.03	2.215.575	DETECTED	1	1	1	0	1	1
48	151.03	21.411.333.333.333.300	DETECTED	0	1	1	0	0	0
53	152.03	21.545.055.555.555.500	DETECTED	0	1	1	0	0	0
54	152.03	2.065.827.777.777.770	DETECTED	0	1	1	0	0	0
58	157.86	2.692.361.111.111.110	DETECTED	0	1	1	0	0	0
64	158.97	26.228.166.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
65	159.85	29.056.499.999.999.900	DETECTED	1	0	0	0	0	0
66	160.84	28.660.666.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
73	161.84	29.029.055.555.555.500	DETECTED	1	1	0	0	0	0
74	161.84	2.605.366.666.666.660	DETECTED	1	0	0	0	0	0
76	162.83	2.861.722.222.222.220	DETECTED	1	0	0	0	0	1

85	163.84	29.090.833.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
87	164.83	28.678.666.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	1
93	164.92	26.412.999.999.999.900	DETECTED	1	0	0	1	0	0
94	166.05	22.571.083.333.333.300	DETECTED	1	0	0	1	1	0
95	166.05	2.276.516.666.666.660	DETECTED	1	0	0	0	1	0
96	166.05	23.078.055.555.555.500	DETECTED	1	0	0	0	1	0
100	167.03	22.813.633.333.333.300	DETECTED	1	0	1	0	1	1
128	173.11	2.258.758.333.333.330	DETECTED	1	1	1	0	1	1
129	173.11	21.655.888.888.888.800	DETECTED	1	1	1	0	1	1
130	173.11	21.976.208.333.333.300	DETECTED	0	1	1	0	0	1
133	174.95	26.344.166.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
134	179.03	15.670.630.555.555.500	DETECTED	1	1	1	0	1	1
145	180.97	2.727.875	DETECTED	1	0	0	0	0	0
147	187.00	13.251.975	DETECTED	0	0	0	0	1	0
149	187.09	186.295	DETECTED	0	0	0	0	1	0
150	187.13	2.378.058.333.333.330	DETECTED	1	1	1	0	1	1
151	187.13	23.049.374.999.999.900	DETECTED	1	1	1	0	0	0
158	191.10	2.409.723.333.333.330	DETECTED	1	1	0	0	1	1
159	191.10	22.893.583.333.333.300	DETECTED	0	0	0	1	1	1
160	193.08	2.318.075	DETECTED	1	1	1	0	1	1
161	193.08	24.395.583.333.333.300	DETECTED	1	1	1	0	1	1
163	193.81	285.935	DETECTED	1	0	0	0	1	1
164	194.08	24.946.233.333.333.300	DETECTED	1	0	1	0	1	1
165	194.08	24.410.416.666.666.600	DETECTED	1	0	1	1	1	1
166	194.08	24.228.499.999.999.900	DETECTED	1	0	0	0	1	1
167	195.13	24.545.166.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
171	195.13	24.613.300.000.000.000	DETECTED	1	0	1	0	1	1
172	195.81	28.634.958.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	1	1

173	196.81	28.672.666.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	1	1
174	197.80	28.634.958.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	1	1
175	198.80	2.868.733.333.333.330	DETECTED	1	0	0	0	1	1
177	199.80	28.634.958.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	1	1
178	201.14	2.363.672.222.222.220	DETECTED	1	1	1	1	1	0
179	201.14	24.893.250.000.000.000	DETECTED	1	0	0	0	1	1
180	201.80	28.591.666.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	1	1
181	205.83	288.925	DETECTED	1	0	0	0	0	0
185	207.83	29.017	DETECTED	1	0	0	0	0	0
186	209.15	2.436.872.222.222.220	DETECTED	0	1	1	0	1	0
187	209.15	23.347.266.666.666.600	DETECTED	1	1	1	0	1	0
193	209.83	28.927.666.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	1	0
194	209.83	2.676.425	DETECTED	0	1	1	1	0	0
195	213.01	21.379.055.555.555.500	DETECTED	0	1	1	0	0	0
196	215.16	262.115	DETECTED	1	0	0	0	0	0
201	221.08	23.546.999.999.999.900	DETECTED	0	1	0	0	1	0
207	221.15	23.863.083.333.333.300	DETECTED	1	1	1	0	1	1
208	221.15	229.475	DETECTED	0	1	1	0	0	0
210	221.85	29.037.666.666.666.600	DETECTED	1	0	0	1	1	0
213	223.84	2.896.183.333.333.330	DETECTED	1	0	0	0	1	0
214	229.06	23.955.222.222.222.200	DETECTED	0	0	1	0	1	0
224	236.10	23.863.083.333.333.300	DETECTED	1	1	1	0	1	1
228	238.93	28.080.111.111.111.100	DETECTED	0	1	1	0	0	0
234	239.06	2.460.172.222.222.220	DETECTED	1	0	0	0	1	0
235	239.12	2.450.588.888.888.880	DETECTED	1	1	0	0	0	0
236	239.12	23.113.611.111.111.100	DETECTED	0	0	1	0	0	1
239	239.12	2.459.975	DETECTED	1	1	1	0	1	1
240	241.14	23.950.083.333.333.300	DETECTED	0	1	0	0	0	0

249	243.16	23.240.999.999.999.900	DETECTED	1	1	1	0	1	1
250	243.16	22.711.833.333.333.300	DETECTED	0	0	0	0	1	0
251	248.96	27.326.416.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
262	251.14	29.927	DETECTED	0	1	0	0	0	0
264	253.14	23.352.933.333.333.300	DETECTED	1	1	1	0	1	0
267	255.03	2.365.664.285.714.280	DETECTED	1	1	1	1	1	1
268	255.03	24.174.933.333.333.300	DETECTED	1	1	0	0	1	1
290	271.09	22.142.666.666.666.600	DETECTED	0	0	1	0	1	0
291	271.09	22.567.916.666.666.600	DETECTED	0	0	0	0	1	0
295	271.19	24.768.944.444.444.400	DETECTED	1	1	1	0	1	1
318	293.17	2.386.422.222.222.220	DETECTED	1	1	1	0	1	1
323	294.17	23.869	DETECTED	1	0	1	0	1	1
324	294.17	22.949.944.444.444.400	DETECTED	0	1	1	0	0	0
327	297.20	24.939.166.666.666.600	DETECTED	0	0	0	0	1	0
333	299.22	27.525.083.333.333.300	DETECTED	0	1	0	0	0	0
347	306.91	27.956.222.222.222.200	DETECTED	0	1	0	0	0	0
349	309.17	24.377.055.555.555.500	DETECTED	1	1	1	0	1	1
350	309.17	2.361.688.888.888.880	DETECTED	0	1	1	0	0	0
355	309.17	23.130.611.111.111.100	DETECTED	0	0	1	0	0	1
357	310.17	24.398.874.999.999.900	DETECTED	1	0	0	0	1	1
362	310.17	23.146.722.222.222.200	DETECTED	0	0	0	1	0	1
375	315.25	26.037.722.222.222.200	DETECTED	1	1	1	0	1	1
376	315.25	241.845	DETECTED	0	0	1	0	1	1
379	316.94	2.727.875	DETECTED	1	0	0	0	0	0
384	317.06	22.816.041.666.666.600	DETECTED	1	0	1	0	1	0
396	326.27	23.424.166.666.666.600	DETECTED	0	0	0	0	0	1
400	329.15	23.849.333.333.333.300	DETECTED	0	1	0	0	0	0
403	331.24	23.480.249.999.999.900	DETECTED	1	1	1	0	1	1

404	331.24	23.677.416.666.666.600	DETECTED	0	1	0	0	0	0
405	333.20	22.444.250.000.000.000	DETECTED	0	0	0	0	1	0
417	340.28	2.900.633.333.333.330	DETECTED	0	0	0	0	0	1
422	346.97	26.370.083.333.333.300	DETECTED	0	1	0	0	0	0
423	351.04	22.576	DETECTED	0	1	0	0	0	0
424	351.04	2.321.466.666.666.660	DETECTED	0	1	0	1	0	0
426	351.04	23.310.666.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	1
454	367.21	25.495.916.666.666.600	DETECTED	0	1	0	0	0	0
462	368.97	25.250.916.666.666.600	DETECTED	1	1	1	0	1	1
464	368.97	24.537.166.666.666.600	DETECTED	0	1	0	0	0	0
474	374.90	28.046	DETECTED	0	1	0	0	0	0
500	384.93	2.727.875	DETECTED	1	0	0	0	0	0
506	387.07	23.463.291.666.666.600	DETECTED	0	1	1	1	0	0
507	387.07	24.068.033.333.333.300	DETECTED	1	0	1	0	1	1
508	387.07	23.099.633.333.333.300	DETECTED	1	0	1	0	1	1
509	387.28	23.427.333.333.333.300	DETECTED	0	1	1	0	0	0
510	387.28	23.727.611.111.111.100	DETECTED	0	1	1	0	0	0
543	401.08	2.193.425	DETECTED	1	1	0	0	0	1
575	412.96	2.562.383.333.333.330	DETECTED	1	0	0	0	0	0
577	412.96	25.294.333.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
582	415.34	24.691.333.333.333.300	DETECTED	0	0	0	0	0	1
604	426.96	23.959.999.999.999.900	DETECTED	0	1	1	0	0	0
605	426.96	24.953.916.666.666.600	DETECTED	0	1	0	0	0	0
614	434.30	27.039	DETECTED	0	0	0	0	1	0
622	439.68	28.610.166.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	1	1
630	441.68	28.651.916.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	1	1
638	442.89	2.798.083.333.333.330	DETECTED	0	1	1	0	0	0
643	443.08	24.072.499.999.999.900	DETECTED	1	0	0	0	0	0

644	443.08	24.406	DETECTED	1	0	0	0	0	0
645	443.08	24.519.916.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
648	443.26	2.256.091.666.666.660	DETECTED	1	0	0	0	0	0
657	446.30	25.364.583.333.333.300	DETECTED	0	0	0	0	1	0
662	446.30	24.032.916.666.666.600	DETECTED	0	0	0	0	1	0
665	449.29	25.101.750.000.000.000	DETECTED	0	0	0	0	1	0
669	452.92	27.231.083.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
677	468.89	2.727.875	DETECTED	1	0	0	0	0	0
684	479.07	2.486.022.222.222.220	DETECTED	0	1	0	1	0	0
685	479.07	24.643.583.333.333.300	DETECTED	0	1	0	0	0	0
686	479.07	25.107.666.666.666.600	DETECTED	1	1	0	0	0	0
689	481.03	25.098.083.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
731	507.10	244.165	DETECTED	1	0	0	0	0	0
732	507.10	24.770.916.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
733	507.10	24.896.916.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
734	507.10	255.915	DETECTED	1	0	0	0	0	0
735	507.10	25.430.500.000.000.000	DETECTED	1	0	0	0	0	0
744	511.09	244.165	DETECTED	1	0	0	0	0	0
745	511.09	2.478.783.333.333.330	DETECTED	1	0	0	0	0	0
746	511.09	24.943.416.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
747	511.09	25.482	DETECTED	1	0	0	0	0	0
748	517.37	24.429.166.666.666.600	DETECTED	0	1	1	0	1	0
749	520.91	27.974.333.333.333.300	DETECTED	0	1	1	0	0	0
751	536.88	2.810.494.444.444.440	DETECTED	0	1	1	0	0	0
756	540.27	26.161.583.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
762	540.27	2.585.725	DETECTED	1	0	0	0	0	0
770	545.04	26.157.583.333.333.300	DETECTED	0	1	0	0	0	0
788	588.89	27.999.055.555.555.500	DETECTED	0	1	1	0	0	0

793	593.13	2.381.004.166.666.660	DETECTED	1	1	0	0	0	1
813	635.12	25.026.083.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
814	635.12	2.546.966.666.666.660	DETECTED	1	0	0	0	0	0
820	639.12	2.506.145.833.333.330	DETECTED	1	1	0	1	0	0
821	639.12	25.522.833.333.333.300	DETECTED	1	1	0	0	0	0
822	639.12	25.671.222.222.222.200	DETECTED	1	1	0	0	0	0
855	693.10	25.339.166.666.666.600	DETECTED	0	1	0	0	0	0
856	693.10	25.83	DETECTED	0	1	0	0	0	0
863	703.13	2.541.027.777.777.770	DETECTED	1	0	0	1	0	0
864	703.13	25.891.166.666.666.600	DETECTED	1	1	0	0	0	0
865	703.13	26.109.583.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
867	703.13	26.930.166.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
880	767.14	257.285	DETECTED	1	0	0	0	0	0
881	767.14	26.205.083.333.333.300	DETECTED	0	1	0	0	0	0
882	767.14	26.523.833.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
892	831.16	2.608.475	DETECTED	1	0	0	0	0	0
894	831.16	2.688.725	DETECTED	1	0	0	0	0	0
904	895.17	27.235.500.000.000.000	DETECTED	1	0	0	0	0	0
905	895.17	26.477.916.666.666.600	DETECTED	1	0	0	0	0	0
910	959.18	27.901.833.333.333.300	DETECTED	1	0	0	0	0	0
TOTAL			179	114	79	61	14	71	55

### 13.5 Minutos

ID	m/z	retention time	BL-ECTB Peak status	BL-TBPISA- 02 Peak status	BL-TBPISA- 03 Peak status	BL-TBPi8- 07 Peak status	BL-TBPi8- 09 Peak status	BL-TBPi8-10 Peak status	BL-TBEOB-03 Peak status	BL-TBEOB- 05 Peak status
2	117.01	26.461.666.666.666.600	1	0	0	1	1	0	0	0
5	121.02	2.745.816.666.666.660	1	0	0	1	1	1	1	1
6	128.03	2.673.895.833.333.330	1	0	0	0	1	0	1	0
12	135.04	27.364	1	0	0	1	0	0	0	0
13	135.04	31.952.777.777.777.700	1	1	0	1	0	0	0	0
15	137.02	2.930.938.095.238.090	1	0	0	1	1	1	1	1
16	137.02	2.677.270.833.333.330	1	0	0	1	1	0	0	0
17	138.01	2.799.395.238.095.230	1	0	0	1	1	1	1	1
23	144.04	2.766.925	1	0	0	1	0	0	0	0
24	144.04	6.430.816.666.666.660	1	1	0	0	0	0	0	0
25	144.04	2.788.641.666.666.660	1	1	0	0	1	1	0	0
26	145.05	26.795	1	0	0	1	1	0	0	1
27	149.01	1.285.697.619.047.610	1	1	0	0	1	1	1	1
28	149.01	0.5489194444444444	1	0	0	0	1	1	1	1
29	149.01	2.263.607.142.857.140	1	1	0	0	1	1	1	1
38	151.03	27.029.611.111.111.100	1	0	0	1	1	0	0	0
39	152.03	27.682.333.333.333.300	1	1	1	0	0	0	0	0
53	165.01	28.500.900.000.000.000	1	0	0	1	1	0	1	1
54	165.01	3.364.844.444.444.440	1	1	1	0	0	0	0	0
55	165.01	27.062.625.000.000.000	1	1	0	0	1	0	1	0
56	165.04	12.857	1	1	0	0	1	1	1	1
57	165.04	2.261.847.222.222.220	1	1	0	0	0	1	1	1
58	165.04	0.5510375000000001	1	1	0	0	1	0	0	1

59	165.05	27.212.111.111.111.100	1	0	0	1	1	0	0	0
61	166.04	12.895.750.000.000.000	1	1	0	0	0	0	1	1
62	166.04	22.632.833.333.333.300	1	1	0	0	0	0	1	1
63	166.04	0.5452750000000001	1	1	0	0	0	0	1	1
64	166.04	5.445.866.666.666.660	1	1	0	0	0	0	0	0
65	167.03	2.700.116.666.666.660	1	0	0	0	1	0	0	0
77	179.03	32.011.583.333.333.300	1	0	0	1	1	0	0	1
78	179.05	2.615.961.111.111.110	1	1	0	0	0	0	0	0
81	181.07	2.609.555.555.555.550	1	0	0	1	1	0	1	1
83	187.09	26.997.611.111.111.100	1	0	0	1	1	1	0	1
86	191.07	28.507.583.333.333.300	1	1	0	0	0	0	0	0
93	207.06	27.405.416.666.666.600	1	1	0	0	0	0	0	0
99	223.02	22.629	1	0	0	0	1	1	1	1
100	223.02	35.978.666.666.666.600	1	1	0	0	0	0	0	0
105	233.15	31.871.583.333.333.300	1	0	0	0	0	1	0	1
108	237.11	278.415	1	0	1	0	0	0	0	0
109	239.06	2.260.278.571.428.570	1	1	0	0	1	1	1	1
110	239.06	3.592.588.888.888.880	1	1	0	0	1	0	0	0
111	239.06	0.0395333333333333	1	0	1	0	1	0	0	1
112	240.05	22.570.875	1	0	0	0	1	1	0	0
113	240.05	3.591.777.777.777.770	1	0	0	0	1	0	0	0
114	250.14	3.405.383.333.333.330	1	1	1	1	1	1	0	1
122	271.22	10.196.809.523.809.500	1	1	0	0	1	1	1	1
123	271.22	475.625	1	0	0	0	0	1	0	0
124	271.22	4.377.002.380.952.380	1	1	0	1	1	1	1	1
125	271.22	0.5872785714285714	1	1	0	0	1	1	1	1
126	271.22	32.561.555.555.555.500	1	0	0	1	1	0	0	0
141	293.17	28.729.666.666.666.600	1	0	0	0	0	1	0	0

145	295.22	3.239.908.333.333.330	1	0	0	1	0	0	0	0
146	295.22	3.571.741.666.666.660	1	1	1	1	0	0	0	0
148	295.22	4.129.858.333.333.330	1	1	0	0	0	0	0	0
150	295.22	4.064.958.333.333.330	1	0	1	0	0	0	0	0
151	297.04	0.5494880952380953	1	1	0	0	1	1	1	1
152	297.04	12.893.466.666.666.600	1	0	0	0	1	1	1	1
154	297.24	3.390.677.777.777.770	1	1	1	1	1	1	0	0
155	297.24	4.737.504.166.666.660	1	0	0	1	1	1	0	0
156	297.24	43.999.555.555.555.500	1	0	0	1	0	1	0	0
159	295.05	27.937.416.666.666.600	1	0	0	1	0	0	0	0
163	299.26	55.990.874.999.999.900	1	0	0	1	1	1	0	0
164	299.26	0.032681249999999995	1	1	1	1	1	1	1	1
165	299.26	0.1430642857142857	1	1	0	1	1	1	1	1
184	313.07	0.5520428571428571	1	1	0	0	1	1	1	1
185	313.07	12.896.785.714.285.700	1	1	0	0	1	1	1	1
220	333.23	0.24830416666666666	1	0	0	0	1	0	1	1
231	339.23	0.21477666666666667	1	1	0	0	0	0	1	1
234	341.11	25.868.083.333.333.300	1	1	0	0	0	0	0	0
237	343.08	2.906.433.333.333.330	1	0	1	0	0	0	0	0
238	343.08	0.07709166666666667	1	0	0	0	0	0	0	1
239	343.08	401.075	1	0	0	1	0	0	0	1
251	355.15	6.586.216.666.666.660	1	0	0	0	1	0	0	0
252	355.15	28.189.583.333.333.300	1	1	0	0	0	0	0	0
253	355.15	28.662.666.666.666.600	1	0	0	0	1	0	0	0
254	355.15	295.665	1	0	0	1	0	0	0	0
269	363.12	28.407.111.111.111.100	1	0	0	0	0	1	1	0
270	364.12	2.835.177.777.777.770	1	0	0	0	0	1	1	0
285	387.11	2.585.375	1	1	0	0	0	0	1	0

292	409.20	39.501.142.857.142.800	1	1	0	1	1	0	1	1
293	409.20	0.41162857142857145	1	1	0	0	1	1	1	1
294	409.20	3.342.486.111.111.110	1	0	0	1	1	1	1	0
295	409.20	3.207.325	1	0	0	0	0	0	0	1
300	415.17	0.15540238095238096	1	1	0	0	1	1	1	1
301	415.17	39.420.375	1	0	0	0	1	1	1	0
302	415.17	27.628.222.222.222.200	1	0	0	1	0	0	0	1
303	416.18	0.1545625	1	0	0	0	0	0	1	1
304	416.18	39.516.416.666.666.600	1	0	0	0	0	0	1	0
305	416.18	0.2831333333333335	1	0	1	1	0	0	0	0
314	443.20	0.9390380952380951	1	1	0	0	1	1	1	1
319	444.21	0.9392666666666667	1	1	0	0	1	0	1	1
322	445.08	0.7993880952380952	1	1	0	0	1	1	1	1
323	445.08	0.16460238095238097	1	1	0	0	1	1	1	1
328	461.11	0.1394000000000002	1	1	0	0	1	1	1	1
329	461.11	0.3242333333333333	1	1	0	0	1	1	1	1
331	461.11	5.394.333.333.333.330	1	0	0	0	1	0	0	0
332	461.11	17.846.428.571.428.500	1	1	0	0	1	1	1	1
333	461.11	23.225.499.999.999.900	1	0	0	0	0	1	0	0
334	461.11	5.442.105.555.555.550	1	0	0	0	1	0	0	1
336	461.11	18.291.333.333.333.300	1	0	0	0	0	1	1	0
337	462.11	0.14076666666666665	1	1	0	0	1	1	1	1
338	462.11	0.32154523809523805	1	1	0	0	1	1	1	1
340	463.11	0.1394000000000002	1	1	0	0	1	1	1	1
341	463.11	0.3269190476190476	1	1	0	0	1	1	1	1
342	464.11	0.1394000000000002	1	1	0	0	1	1	1	1
343	464.11	0.3295428571428572	1	1	0	0	1	1	1	1
353	507.12	0.3255547619047619	1	1	0	0	1	1	1	1

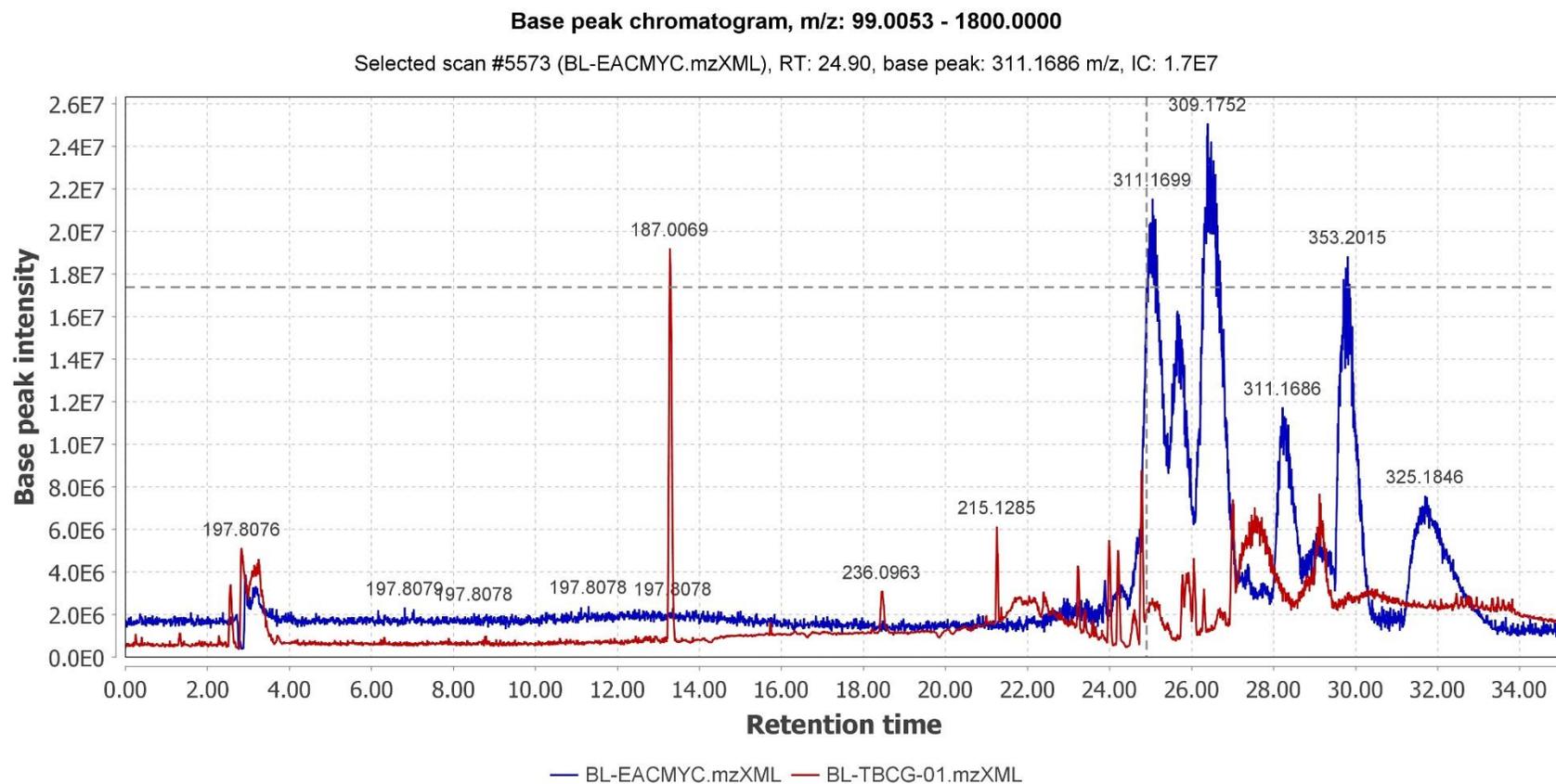
354	507.12	0.1420857142857143	1	1	0	0	1	1	1	1
357	507.12	5.368.225	1	1	0	0	0	0	0	0
358	507.12	18.012.416.666.666.600	1	0	0	0	1	0	0	0
361	508.12	0.32154523809523805	1	1	0	0	1	1	1	1
362	508.12	0.1407190476190476	1	1	0	0	1	1	1	1
363	509.12	0.3255523809523809	1	1	0	0	1	1	1	1
364	509.12	0.14348809523809525	1	1	0	0	1	1	1	1
374	521.08	0.9183928571428571	1	1	0	0	1	1	1	1
375	521.08	0.5138928571428572	1	1	0	0	1	1	1	1
376	521.08	4.124.337.499.999.990	1	1	1	0	1	1	1	1
378	522.08	0.9170261904761904	1	1	0	0	1	1	1	1
379	522.08	0.5152357142857144	1	1	0	0	1	1	1	1
380	522.08	16.145.266.666.666.600	1	0	0	0	1	1	1	0
381	522.08	4.106	1	1	0	0	1	0	0	1
382	523.08	0.9170261904761904	1	1	0	0	1	1	1	1
383	523.08	0.5196428571428571	1	1	0	0	1	1	1	1
384	523.08	16.154.666.666.666.600	1	1	0	0	0	1	0	0
385	523.08	10.635.055.555.555.500	1	0	0	1	0	0	0	0
386	524.08	0.9156	1	1	0	0	1	0	1	1
387	524.08	0.5132666666666666	1	1	0	0	1	0	1	1
388	535.10	16.026.125.000.000.000	1	1	0	1	1	1	1	1
389	535.10	14.528.142.857.142.800	1	1	0	0	1	1	1	1
390	535.10	0.3098404761904762	1	0	1	1	0	1	1	1
391	535.10	0.21724761904761905	1	1	0	0	1	1	1	1
392	536.10	15.987.125.000.000.000	1	1	0	1	1	1	1	1
393	536.10	1.452.452.380.952.380	1	1	0	0	1	1	1	1
394	537.09	16.043.722.222.222.200	1	0	0	1	0	0	1	0
397	567.09	0.9170214285714285	1	1	0	0	1	1	1	1

398	567.09	0.5152238095238095	1	1	0	0	1	1	1	1
399	567.09	0.18976666666666667	1	0	0	0	1	0	0	0
400	568.09	0.9171452380952382	1	1	0	0	1	1	1	1
401	568.09	0.5135333333333334	1	1	0	0	1	1	1	1
402	568.09	10.833.611.111.111.100	1	0	1	0	0	1	0	0
403	569.08	0.9196357142857143	1	1	0	0	1	1	1	1
404	569.08	0.5094976190476191	1	1	0	0	1	1	1	1
406	569.08	10.513.750.000.000.000	1	0	0	1	0	1	0	0
410	593.12	4.104.895.833.333.330	1	1	1	1	1	0	1	1
411	593.12	0.9203222222222224	1	1	0	0	1	0	1	1
412	593.12	16.282.500.000.000.000	1	1	0	0	1	0	1	1
413	593.12	3.922.486.666.666.660	1	1	0	0	1	0	0	1
414	593.12	0.6821374999999998	1	1	1	0	0	0	1	0
415	595.10	0.4765690476190477	1	1	0	0	1	1	1	1
416	595.10	10.354.214.285.714.200	1	1	0	0	1	1	1	1
417	595.10	126.153	1	0	1	0	1	1	0	1
418	595.10	14.540.666.666.666.600	1	1	0	1	1	1	1	1
419	595.10	1.573.335.714.285.710	1	1	0	1	1	1	0	1
420	595.10	5.281.241.666.666.660	1	0	0	0	1	0	0	1
421	595.10	53.747.125	1	0	0	1	1	0	0	0
466	645.13	0.5529194444444445	1	1	0	0	1	0	1	1
467	647.05	29.513.000.000.000.000	1	0	0	0	0	0	0	1
486	671.10	0.8938979166666666	1	1	0	1	1	1	1	1
487	671.10	0.7857285714285714	1	1	0	0	1	1	1	1
488	671.10	14.274.333.333.333.300	1	1	0	0	1	1	1	1
489	671.10	17.388.547.619.047.600	1	1	0	0	1	1	1	1
490	671.10	26.536.666.666.666.600	1	0	0	0	1	0	0	0
491	671.10	26.759.366.666.666.600	1	1	0	0	0	1	1	1

492	672.10	0.89271875	1	1	0	1	1	1	1	1
493	672.10	0.03462	1	1	1	0	0	1	0	1
494	672.10	14.250.642.857.142.800	1	1	0	0	1	1	1	1
495	672.10	0.7884595238095239	1	1	0	0	1	1	1	1
496	672.10	266.969	1	1	0	0	0	1	0	1
497	672.10	17.347.547.619.047.600	1	1	0	0	1	1	1	1
498	672.10	2.705	1	0	0	0	0	0	1	0
500	673.10	0.8915562499999999	1	1	0	1	1	1	1	1
501	673.10	0.7857309523809523	1	1	0	0	1	1	1	1
503	673.10	0.04494166666666666	1	0	1	0	1	0	0	1
504	673.10	14.305.261.904.761.900	1	1	0	0	1	1	1	1
505	673.10	19.341.055.555.555.500	1	0	1	0	1	0	0	0
506	673.10	17.263.100.000.000.000	1	1	0	0	0	0	1	1
509	719.15	12.869.809.523.809.500	1	1	0	0	1	1	1	1
510	720.15	1.282.927.777.777.770	1	0	0	0	0	0	0	1
511	720.15	14.143.083.333.333.300	1	0	0	1	0	0	0	0
512	721.14	12.900.194.444.444.400	1	1	0	0	1	0	1	1
515	731.06	1.763.142.857.142.850	1	1	0	0	1	1	1	1
516	731.06	2.595.266.666.666.660	1	1	0	0	0	0	0	1
517	731.06	26.289.055.555.555.500	1	0	0	0	0	1	1	0
518	732.06	17.627.857.142.857.100	1	1	0	0	1	1	1	1
520	733.06	17.650.062.499.999.900	1	1	0	1	1	1	1	1
521	733.06	2.266.825	1	0	0	0	0	1	0	1
522	733.06	16.295.666.666.666.600	1	0	0	0	1	0	1	1
523	743.14	2.293.269.444.444.440	1	0	0	0	1	1	1	1
524	743.14	35.146.722.222.222.200	1	0	0	0	1	1	1	1
525	743.14	13.450.916.666.666.600	1	0	0	0	1	1	1	1
527	743.14	5.110.166.666.666.660	1	0	0	0	1	1	0	0

528	743.14	4.027.538.888.888.880	1	0	0	0	0	0	1	0
529	743.14	27.401.299.999.999.900	1	0	0	0	1	1	1	1
530	743.14	14.121.583.333.333.300	1	0	0	0	0	1	1	1
531	743.14	1.961.111.111.111.110	1	0	0	0	1	0	0	1
534	803.19	2.262.411.111.111.110	1	0	0	0	1	1	0	0
535	803.19	2.417.975	1	0	0	1	0	0	0	0
TOTAL			197	113	20	49	133	111	116	126

**Anexo 3: GRÁFICOS DE CROMATOGRAMAS DE PEAK BASE PARA CADA MUESTRA CON SU RESPECTIVA REFERENCIA ASOCIADA.**



**Figura 9.1** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBCG-01 en relación a su referencia (BL-EACMYC) con programa cromatográfico de 35 min.

Base peak chromatogram, m/z: 99.0053 - 1800.0000

Selected scan #7387 (BL-TBCG-02.mzXML), RT: 28.28, base peak: 601.2711 m/z, IC: 4.0E7

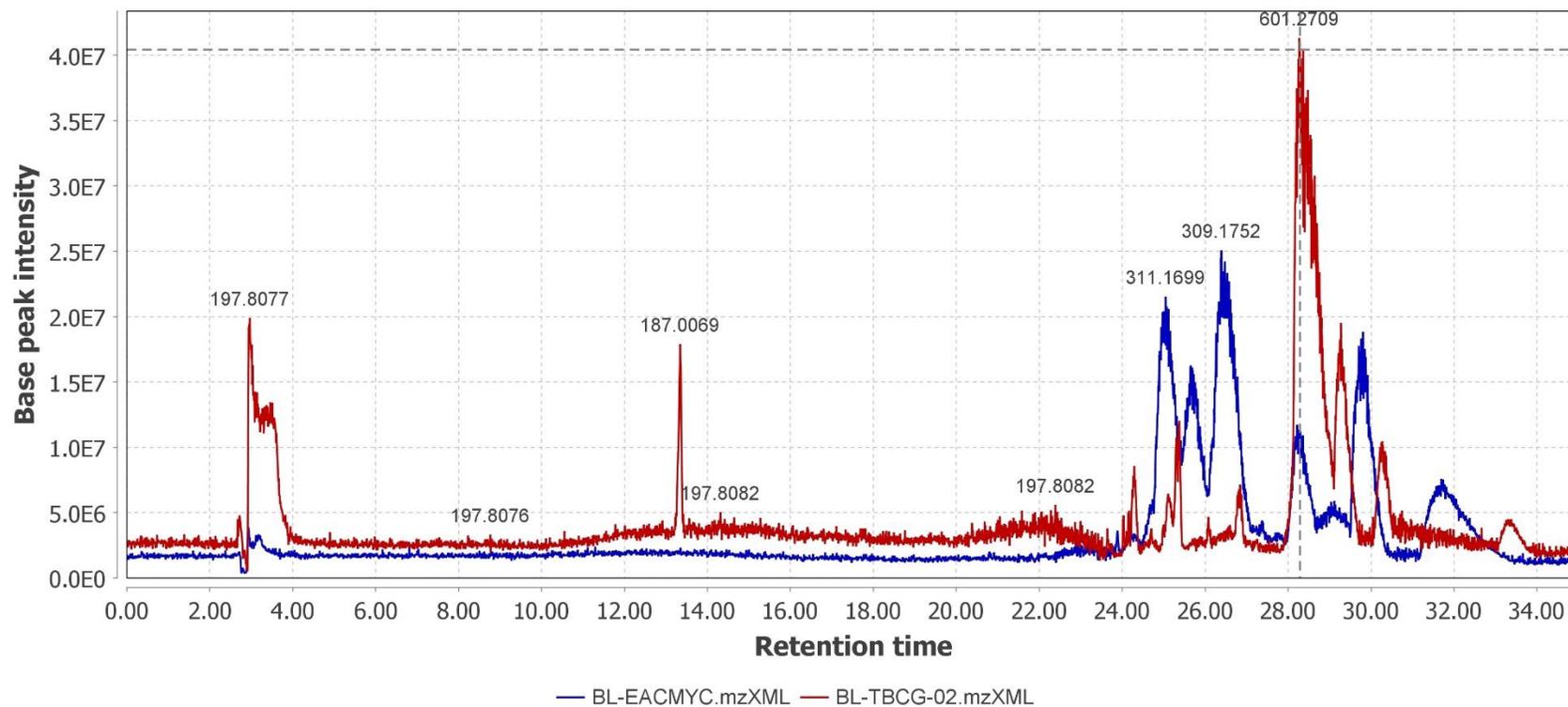
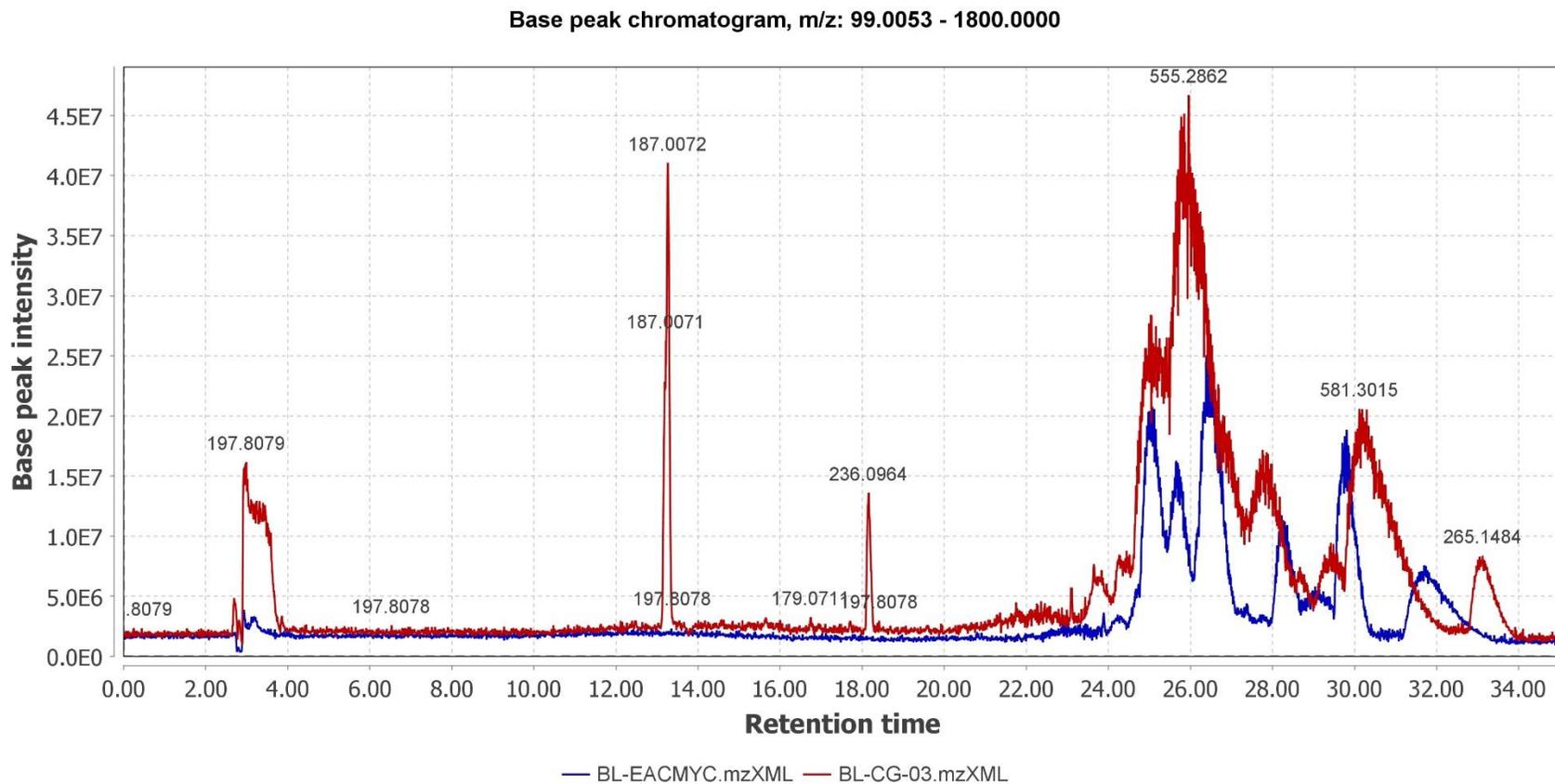
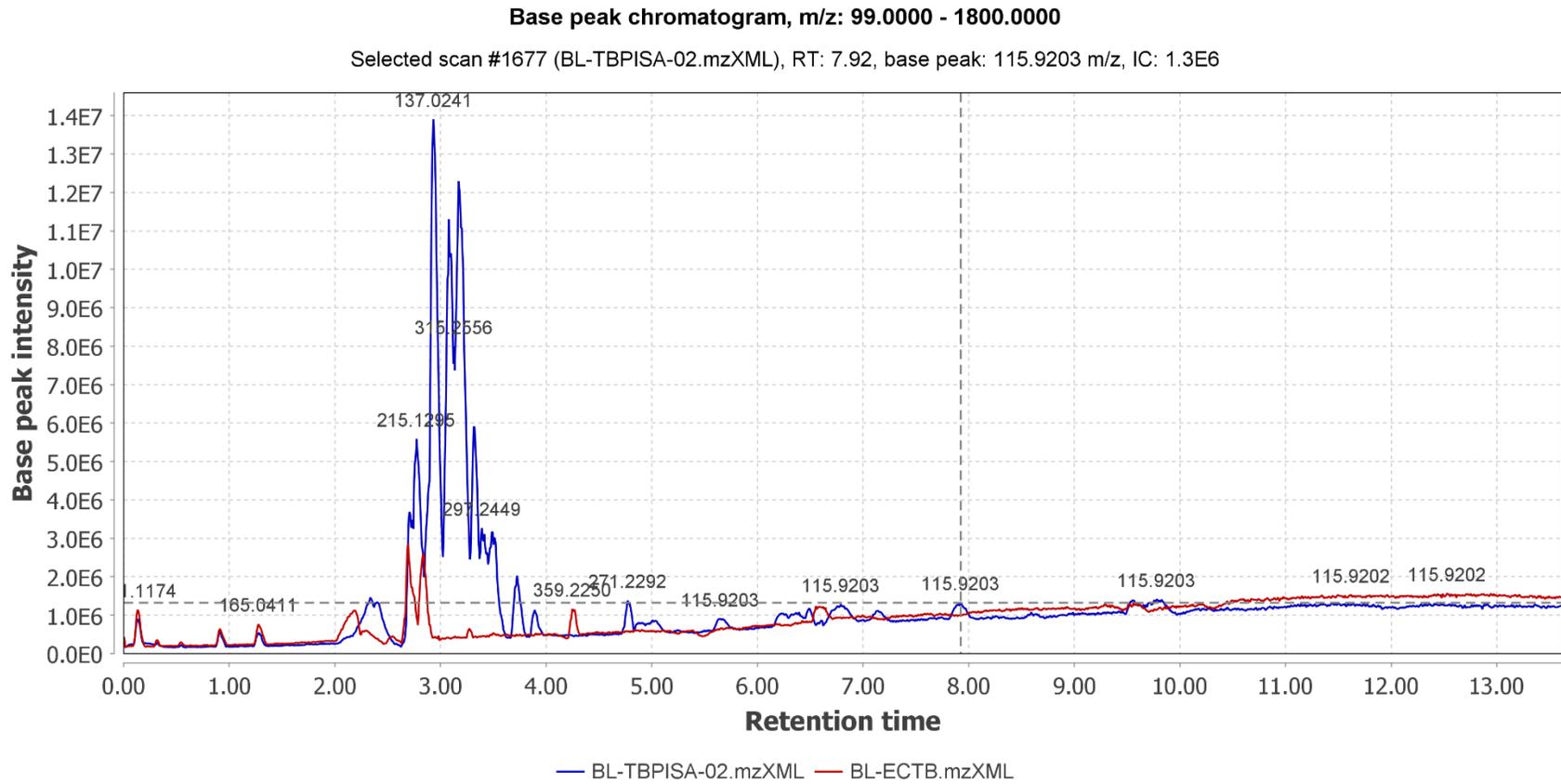


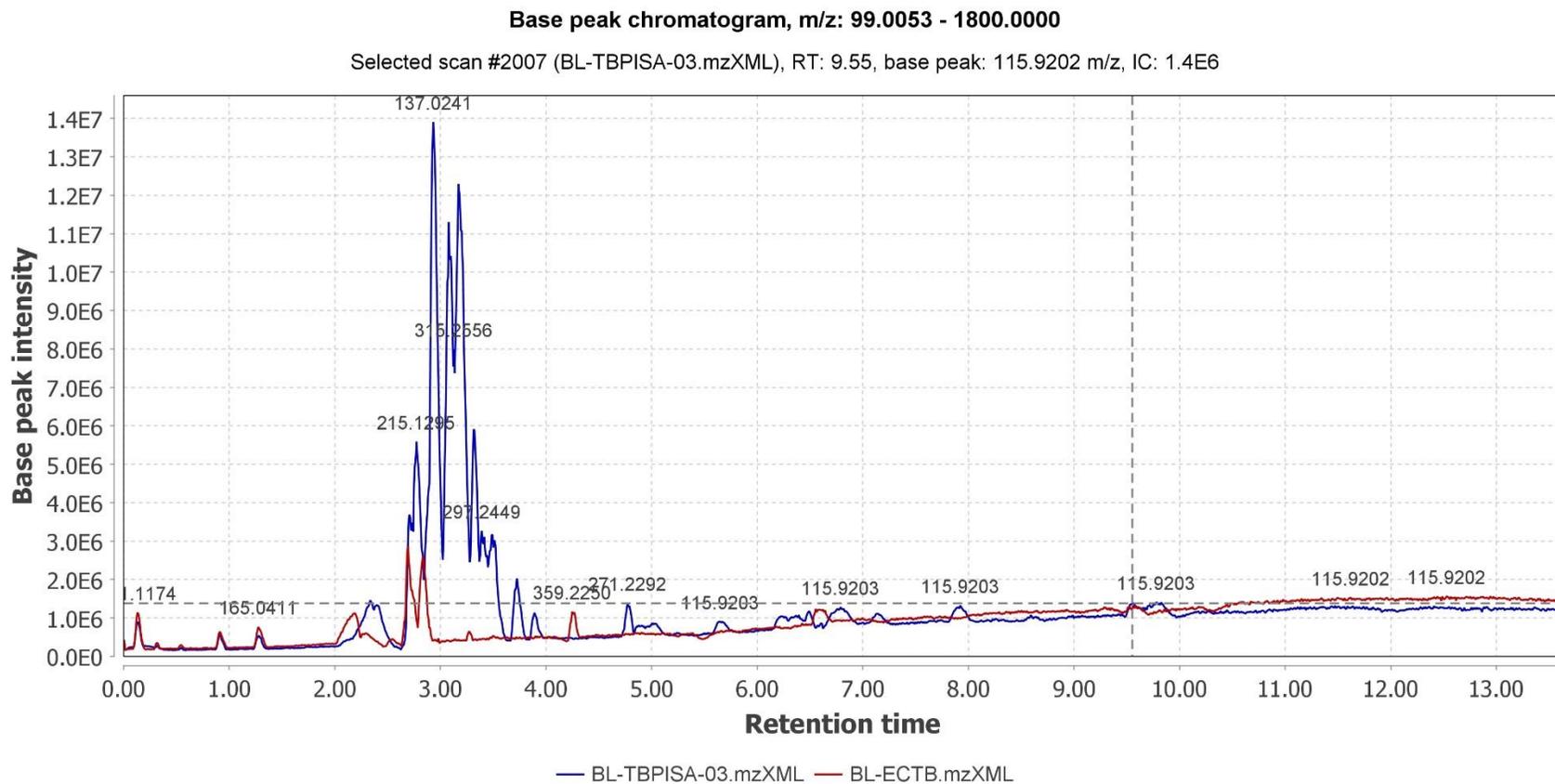
Figura 9.2 Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBCG-02 en relación a su referencia (BL-EACMYC) con programa cromatográfico de 35 min.



**Figura 9.3** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-CG-03 en relación a su referencia (BL-EACMYC) con programa cromatográfico de 35 min.



**Figura 9.4** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBPISA-02 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.



**Figura 9.5** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBPISA-03 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.

Base peak chromatogram, m/z: 99.0053 - 1800.0000

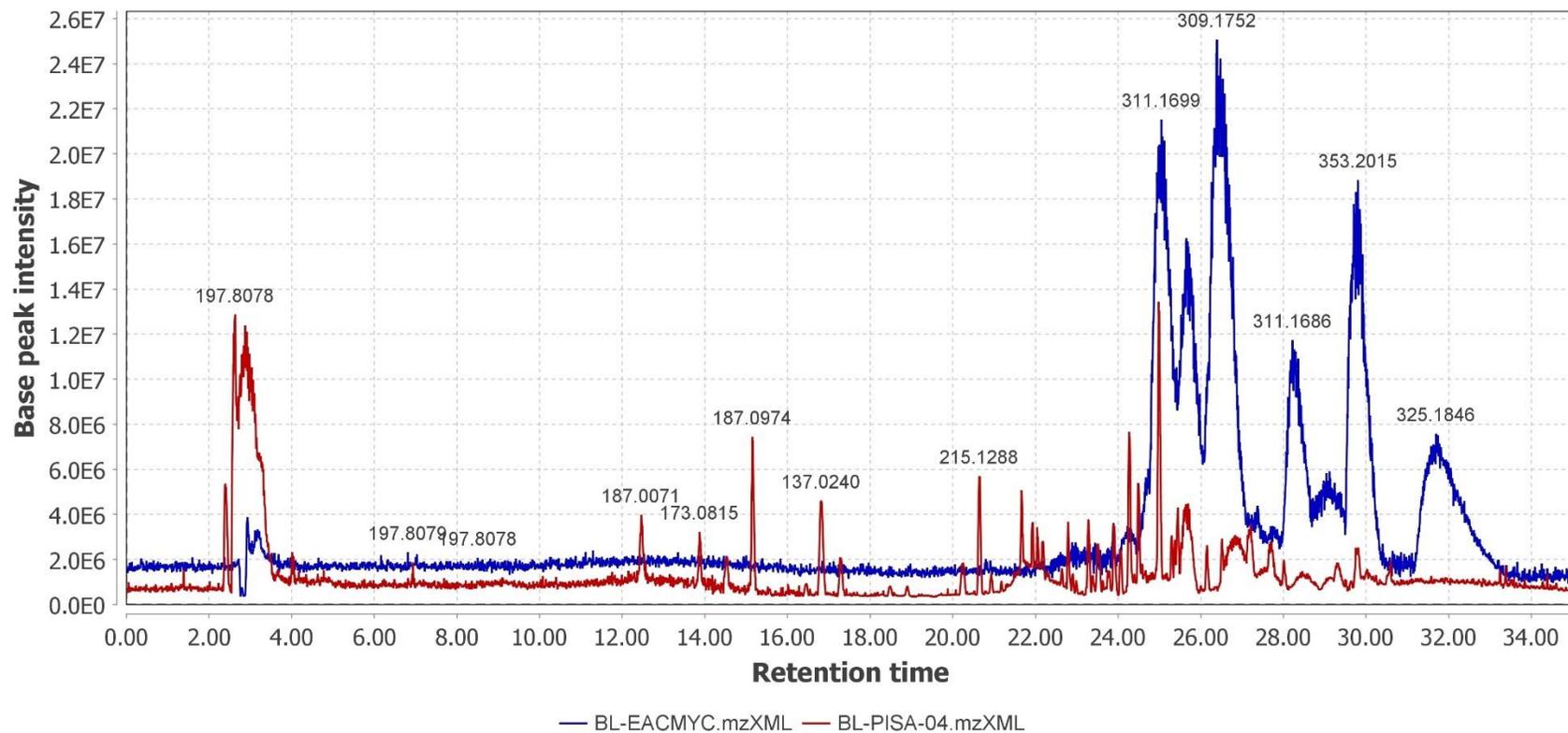
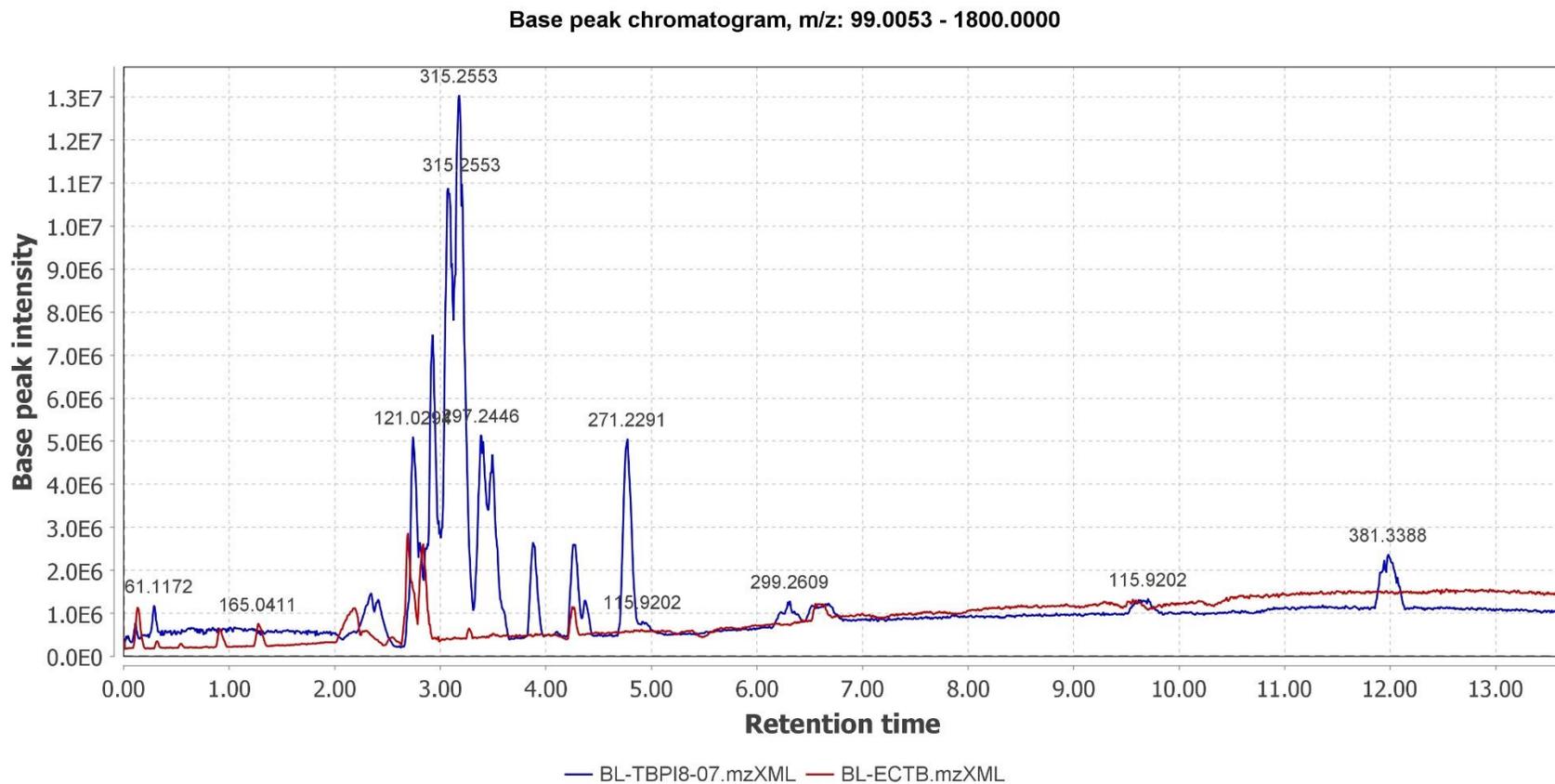
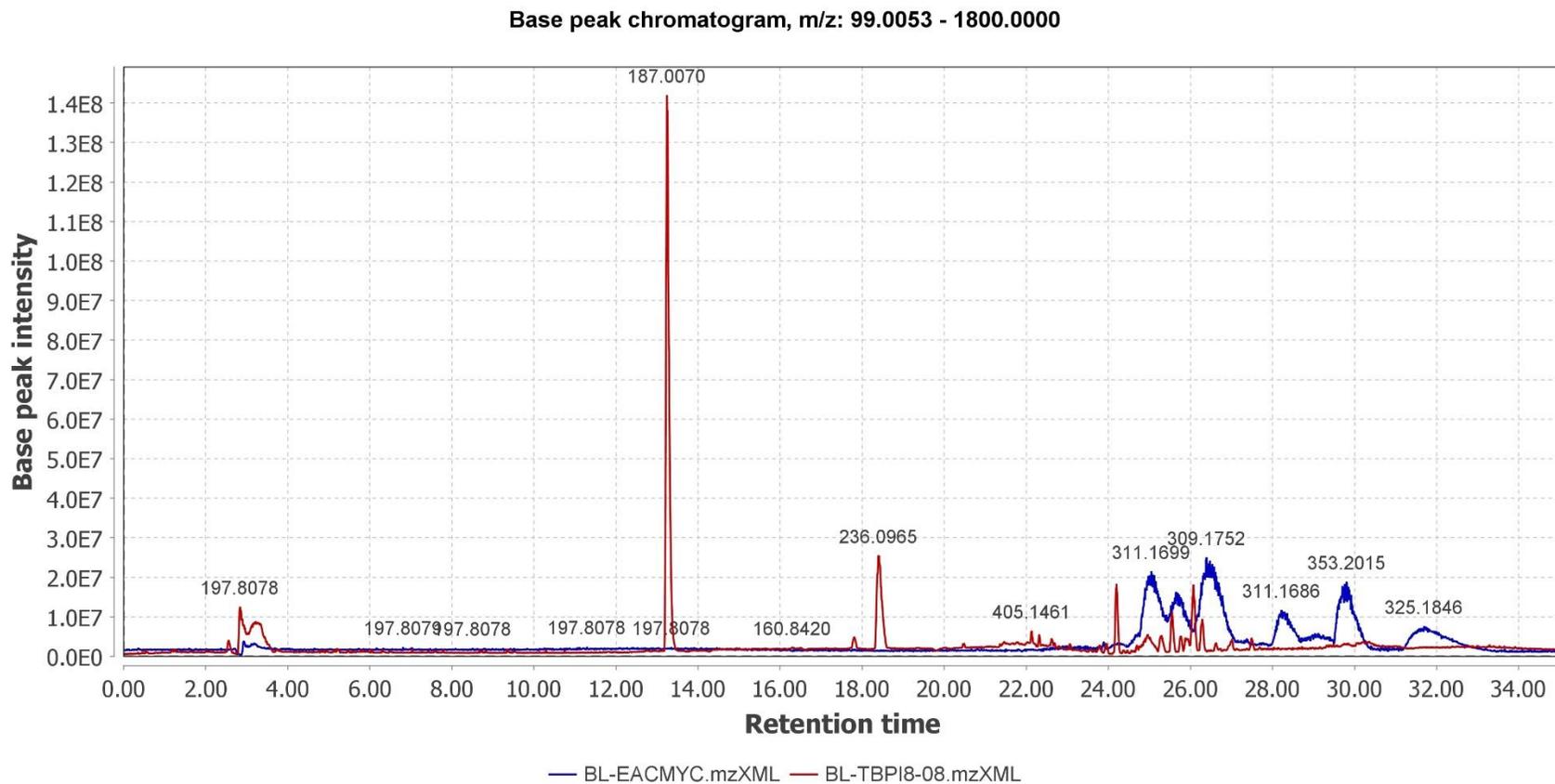


Figura 9.6 Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-PISA-014 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.

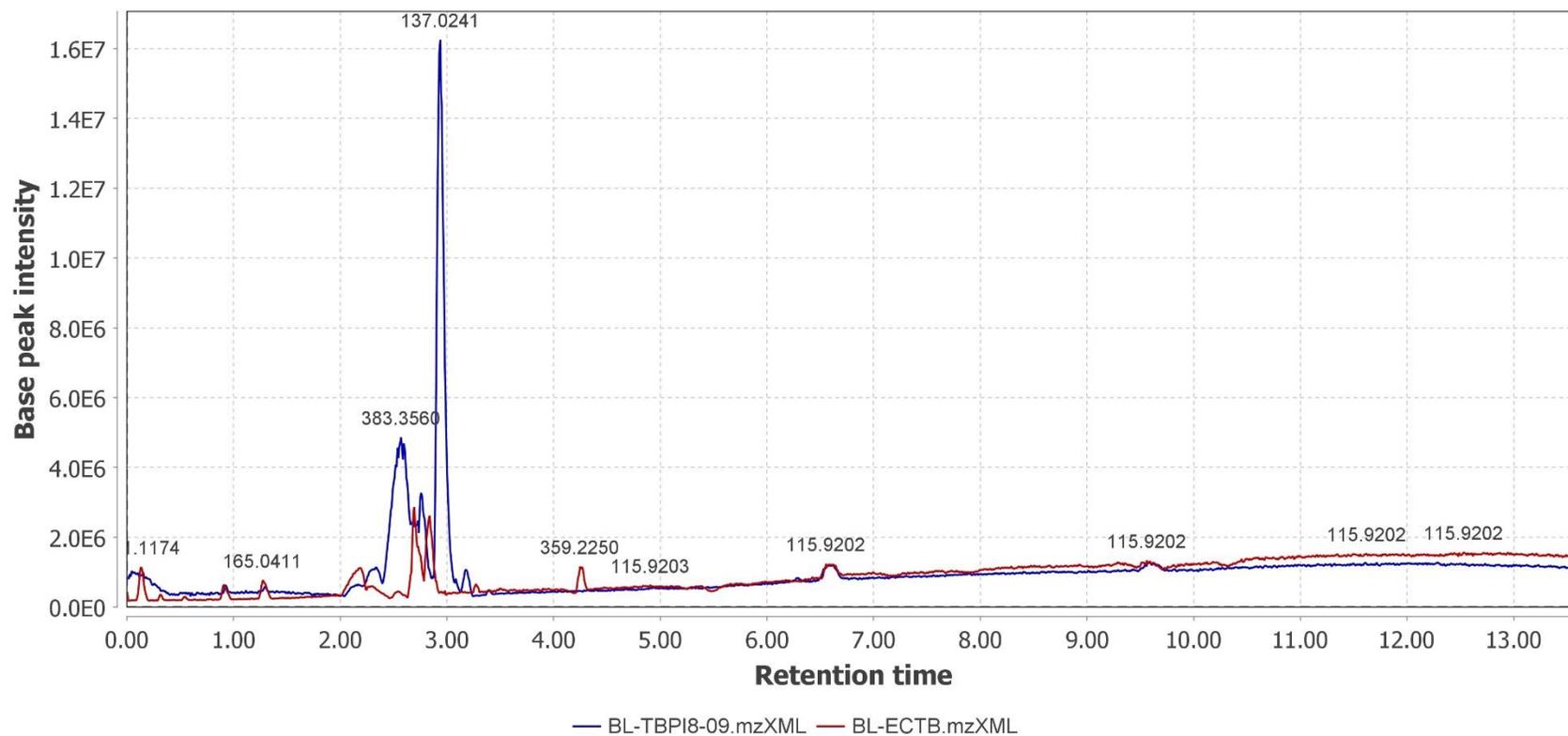


**Figura 9.7** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBPI8-07 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.

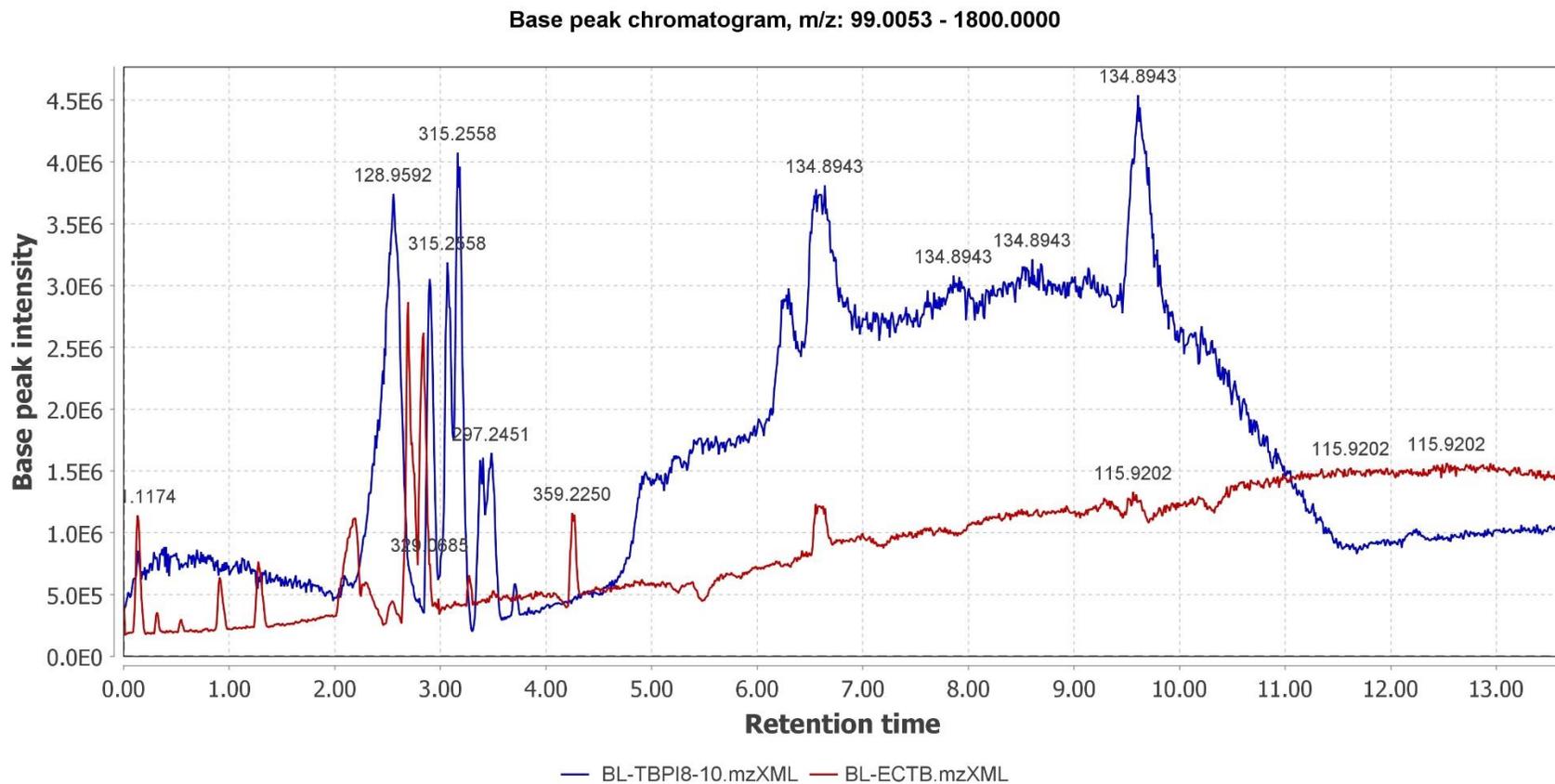


**Figura 9.8** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBPI8-08 en relación a su referencia (BL-EACMYC) con programa cromatográfico de 35 min.

Base peak chromatogram, m/z: 99.0053 - 1800.0000

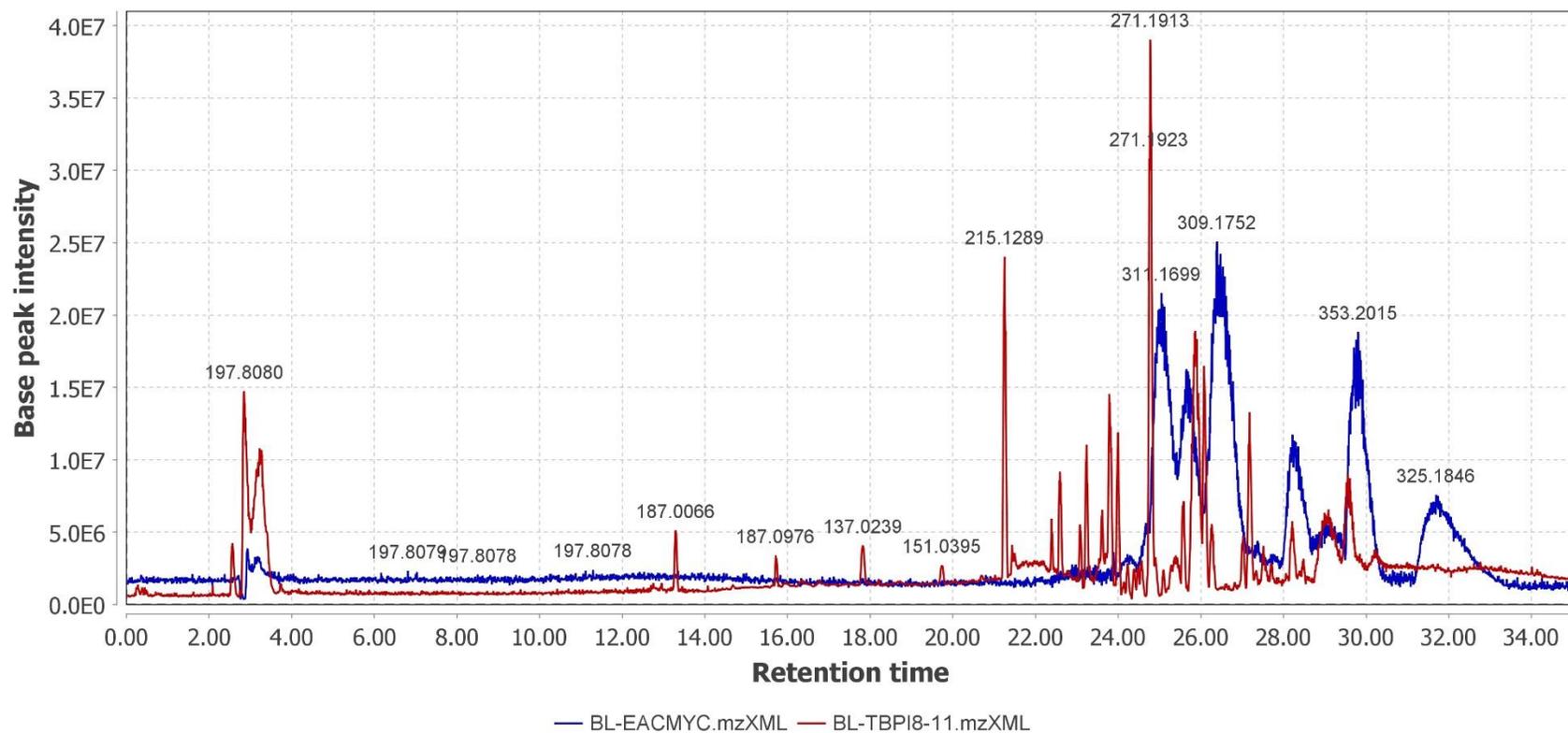


**Figura 9.9** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBPI8-09 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.

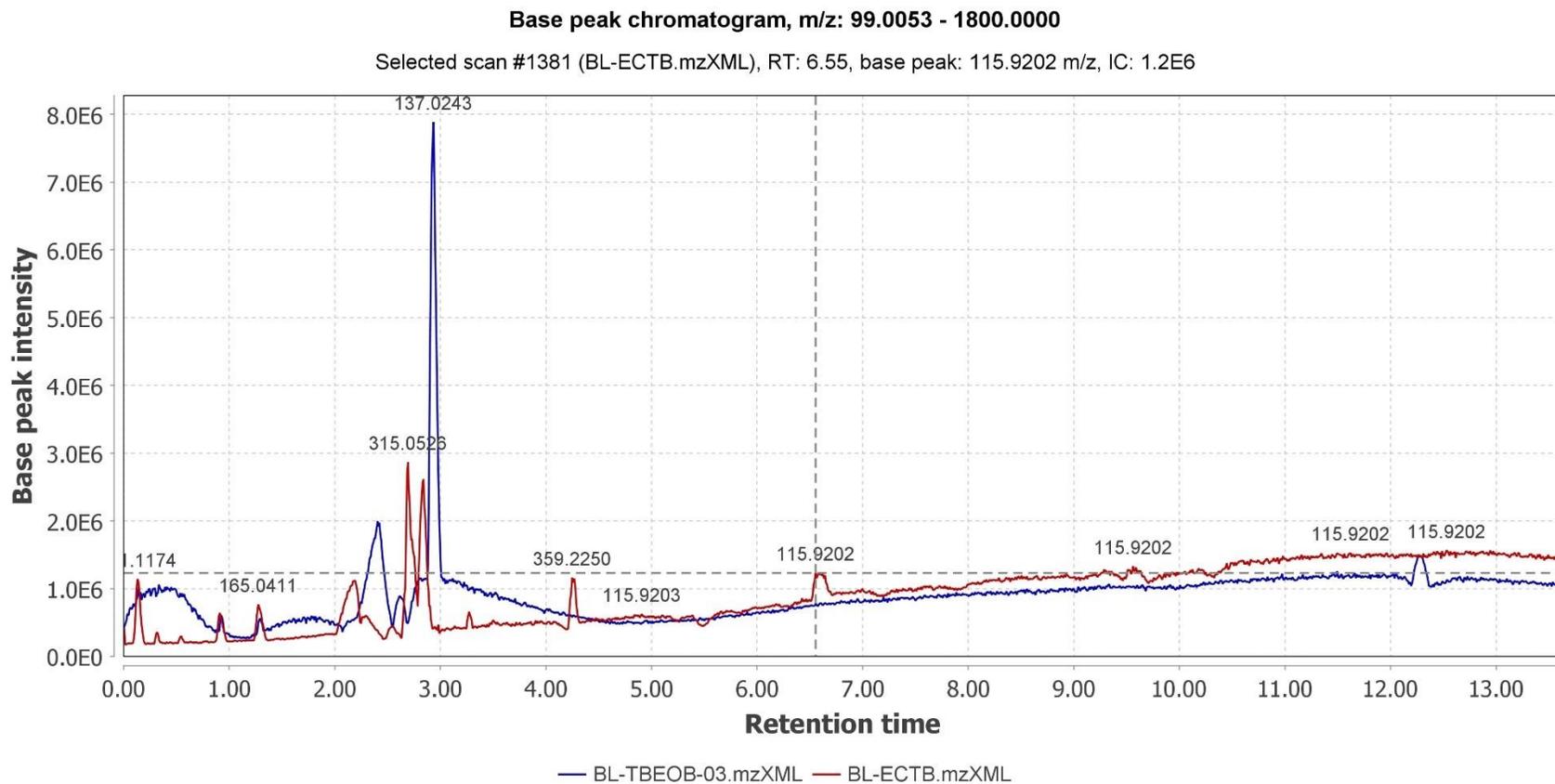


**Figura 9.10** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBPI8-10 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.

Base peak chromatogram, m/z: 99.0053 - 1800.0000



**Figura 9.11** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBPI8-11 en relación a su referencia (BL-EACMYC) con programa cromatográfico de 35 min.



**Figura 9.12** Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBEOB-03 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.

Base peak chromatogram, m/z: 99.0053 - 1800.0000

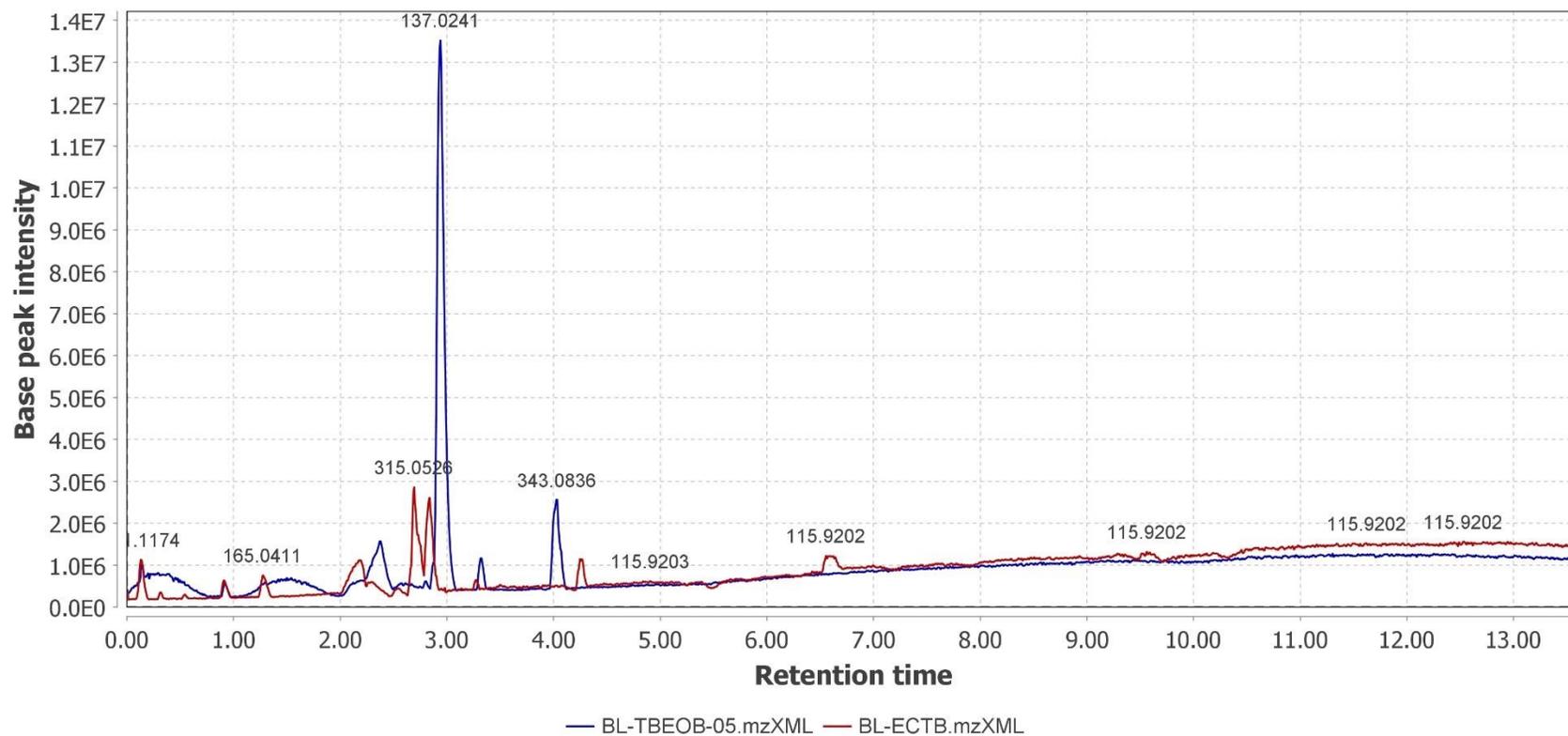


Figura 9.1 Cromatograma de *peak* base de la muestra BL-TBEOB-05 en relación a su referencia (BL-ECTB) con programa cromatográfico de 13.5 min.