



INFORME PRELIMINAR SOBRE LAS INVESTIGACIONES DE LAS CAUSAS DE LA MUERTE DE EL LIBERTADOR SIMÓN BOLÍVAR

Comisión Presidencial para la Planificación y Activación del Proceso de Investigación Científica e Histórica, Sobre los Acontecimientos Relacionados con el Fallecimiento de El Libertador Simón Bolívar y el traslado a la Nación de sus restos mortales.

Caracas, julio de 2012

CONCLUSIONES DE ANATOMÍA PATOLÓGICA FORENSE EN EL ESTUDIO DE LOS RESTOS DE EL LIBERTADOR SIMÓN BOLÍVAR

Elaborado por:

Dra. Yanuacelis Cruz, Jefa de la División de Anatomía Patológica Forense de la Coordinación Nacional de Ciencias Forenses.

Dr. José Monque, Médico Anatomo Patólogo, ex Coordinador de Ciencias Forenses.

En el interior del sarcófago se aprecia un esqueleto humano del sexo masculino articulado y envuelto en una tela de Damasco de color pardo oscuro con flecos negros, los cuales se desprenden fácilmente. La tela presenta dos cortes lineales en su tercio medio izquierdo, producto de la apertura de la urna de plomo con la tijera. El tejido óseo se encuentra barnizado y en buen estado de conservación; dicho barniz se desprendió parcialmente con la manipulación. En las paredes laterales de la urna de plomo y a nivel de los pies se encuentran adosadas dos  pequeñas urnas del mismo material que contienen en su interior polvo óseo, tierra, fragmento de camisa de color claro, restos de pelos, fragmentos de cuero y suela de botas. El cuero presenta un grabado repujado

con la imagen de un triángulo isósceles cuyo vértice está orientado hacia la luz de un transportador.

En la pequeña urna lateral derecha también se encontró adosada al piso de la misma, otra caja de menor tamaño de forma achatada del mismo material, la cual contenía un papel doblado. Ésta fue entregada al ciudadano Vicepresidente de la República Bolivariana de Venezuela Elías Jaua. Posteriormente nos informaron que el escrito es el acta de la preparación del cadáver de S.E. El Libertador Simón Bolívar que realizó el Sabio Doctor José María Vargas en el año de 1843. Este fue entregado por el tribunal actuante al Ciudadano Ministro del Poder Popular para la Cultura Francisco Sesto.

El cadáver se encuentra en buen estado de conservación. Presenta restos blanquecinos de cloruro de cal y de barniz solidificado color neutro. Debido a la ausencia de algunos huesos en las manos y en los pies (falanges) se aprecia una reconstrucción, hecha en su oportunidad, con cera de moldear, la cual se solidificó, encontrándose frágil y quebradiza, faltando en áreas debido al paso del tiempo. El esqueleto fue unido con alambres, resortes, bisagras y una vara de plomo que articula la base del cráneo con todas las vértebras a través del agujero occipital y los agujeros vertebrales hasta el sacrococix. También se aprecia la unión y permanencia en sus sitios anatómicos de los arco costales y el esternón.

CRÁNEO Y CARA: Cráneo del sexo masculino muy bien conservado, sin lesiones traumáticas que describir. Normocefalo. Presenta un corte de sierra horizontal, limpio y preciso sobre la bóveda craneana, con escasa pérdida de tejido óseo. La calota craneal está articulada con el resto del cráneo por medio de cuatro pequeñas bisagras de bronce de color verde amarillento localizadas, dos en las regiones parieto temporales y dos en las regiones parieto occipitales. El maxilar inferior o mandíbula se encuentra desarticulado y fijado, a los huesos maxilar superior y a los parieto temporales derecho e izquierdo por resortes e hilos de bronce lábiles, quebradizos y deteriorados. Las piezas dentales están completas excepto por la ausencia de un molar izquierdo, tal como fué descrito por el Sabio Doctor José María Vargas. Son de color pardo, algunas de ellas con desgaste a nivel de la mordida. La cara presenta franca asimetría entre el lado derecho y el lado izquierdo. Se aprecia hundimiento del surco nasogeniano derecho, siendo el malar izquierdo más prominente. El hueso frontal es amplio. El espacio entre los agujeros nasales y la arcada dental es ancho. Los arcos superciliares son marcadamente prominentes. Hay gracilidad de los arcos cigomáticos en relación con el desarrollo de los huesos malares. Se evidencia pérdida del tejido óseo por socavamiento postmortem de las paredes laterales y del piso de ambas órbitas. Pérdida total postmortem del cóndilo del maxilar inferior izquierdo y parcial del derecho. Ligero abultamiento del cráneo a nivel de las regiones parietooccipitales. Se evidencia asimetría del maxilar

inferior por exostosis en tercio externo derecho a nivel de la unión de la rama horizontal con la vertical. Asimetría de los huesos propios de la nariz, coanas asimétricas, la derecha más descendida que la izquierda. Erosión postmortem de la apófisis mastoidea izquierda. Las apófisis estiloides son completas y fuertes.

Una vez realizado el estudio odontológico por parte de los expertos, se procede a la extracción de seis piezas dentales: Incisivo central superior izquierdo, incisivo lateral izquierdo, canino superior izquierdo, primer premolar superior izquierdo, incisivo central superior derecho, incisivo lateral derecho y canino superior derecho. De todos éstos se extrajo material de la pulpa dental para intentar identificar ADN. Posteriormente fueron regresados intactos a los alvéolos dentales correspondientes.

TORAX: Columna vertebral completa y articulada artificialmente con alambres, resortes y bisagras de bronce. A nivel de la base del cráneo se encuentra atornillada una vara de metal maleable de color gris que se fractura con facilidad y articula las vértebras de la columna desde el agujero occipital del cráneo a través de los agujeros vertebrales. Las vértebras cervicales, dorsales y lumbosacras están completas con los cambios degenerativos propios la edad (45 más o menos dos años) para el momento de la muerte. Se evidencia a nivel de la cuarta y quinta vertebra dorsales en sus carillas articulares un pequeño socavamiento, del cual se toman muestras

para estudio histológico y reacción en cadena de la polimerasa para tratar de identificar ADN de microorganismos. Las tres últimas vértebras lumbares presentan signos de esclerosis por probable traumatismo crónico ocasionado por la monta a caballo. El resto de las vértebras sin lesiones aparentes. La parrilla costal está completa, parcialmente articulada de forma artificial por alambres y resortes. Presenta fracturas postmortem producto de la autopsia practicada por el Dr. Prospero Reverend. Para reconstruir los arcos costales tendrían que retirarse los alambres colocados por el Sabio Doctor José María Vargas y se acordó no modificarlos para preservar el esqueleto. Para reconstruir el tejido faltante por la toma de las muestras para los estudios especiales se utilizó material sintético (vidrio ionomérico) mezclado con polvo óseo.

ESTERNÓN: Presente. Cuerpo y manubrio articulados con alambres y bisagras. Se observa una variante anatómica del tercio medio/inferior que deja un orificio ovoide de 0,4 x 0,2 cm. **CLAVÍCULAS:** Sin evidencia de lesiones. **ESCÁPULAS:** Presentes (la derecha y la izquierda). Sin lesiones traumáticas que describir. Pérdida postmortem de sus cuerpos.

COLUMNA VERTEBRAL LUMBO SACRA: Las tres últimas vértebras lumbares presentan signos de esclerosis por probable traumatismo crónico ocasionado por la monta a caballo. El resto de las vértebras sin lesiones aparentes.

CONJUNTO PELVIANO: Completo. Presenta asimetría entre los dos huesos coxales. Fractura postmortem del borde superior de los mismos. El hueso coxal izquierdo está erosionado con marcada porosidad. En su cara anterior presenta excavamiento y erosión marcada. Se toman muestras para estudio histológico y de reacción en cadena de la polimerasa a fin de determinar ADN de agentes infecciosos. También se toman muestras del mismo tejido para realizar estudios toxicológicos con el fin de determinar la presencia y concentraciones de metales pesados. Se observan fijaciones metálicas en las ramas ileopuvianas y sacro coxígeas de la pelvis que la mantienen articulada.

HUESOS DE LAS EXTREMIDADES: Miembros superiores articulados con alambres y bisagras de metal. Discreta asimetría ya que el hueso humeral derecho presenta mayor robusticidad que el izquierdo, por lo que podemos suponer que se trata de una persona que era diestra. Huesos de las manos parcialmente desarticulados y ausentes con algunas falanges reconstruidas con cera de moldear que posteriormente se solidificó. Las extremidades inferiores se encuentran (fémur, tibia y peroné) articulados con alambres y bisagras de metal. Pérdida postmortem del tejido óseo del tercio superior de ambos perones. Huesos propios de los pies incompletos, algunos de ellos reconstruidos por cera para moldear que se solidificó con el tiempo.

Se toman dos cuñas de tejido óseo de la cabeza humeral derecha para estudio de ADN las cuales se envían al IVIC y a IDEA. Igualmente se toma una cuña de la cabeza de una falange de la mano izquierda para realizar estudio de ADN a solicitud de IDEA.

Todos los sitios de donde se tomaron las muestras fueron reconstruidos con un material moldeable, fotocurable de uso odontológico (vidrio ionomérico) de color hueso el cual se mezcló con polvo de tejido óseo del mismo cadáver con la finalidad de quedar reconstruido.

Es de hacer notar que todas las muestras fueron obtenidas utilizando los métodos más conservadoras posibles.

Se toma radiología simple del cráneo, tórax, columna vertebral, pelvis ósea, húmeros y fémures derecho e izquierdo.

Las muestras obtenidas del tejido óseo para determinar el ADN fueron tomadas antes de practicar los estudios radiológicos con el fin de evitar cualquier tipo de alteración en el ADN.

Se toma tomografía axial computarizada en un tomógrafo Siemens de 64 cortes para reconstrucción facial tridimensional.

ESTUDIO MICROSCÓPICO: Los cortes histológicos muestran tejido óseo conservado con presencia de

escasas trabéculas lamelares y tejido fibroconectivo. También se realizaron coloraciones especiales para determinar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes y hongos, las cuales fueron negativas.

CORRELACIÓN CLINICO-PATOLÓGICA **(EPICRISIS)**

Se practicaron estudios para la determinación por biología molecular de diferentes agentes microbiológicos patógenos, tales como **Mycobacterium tuberculosis**, **Mycobacterium bovis**, **Treponema pallidum**, **Brucellas sp.**, **Paracoccidioides brasiliensis**, **Plasmodium sp.** **Leishmania donovani** y **cutánea**, siendo todos negativos.

Queda pendiente por realizar la investigación para determinar la posibilidad de una infección por **Histoplasma capsulatum**. Está proceso de elaboración el primer que permitirá comparar y determinar la existencia de ese patrón en la muestra de ADN antiguo. Este hongo es el causante de la histoplasmosis pulmonar crónica, donde se pueden encontrar adenomegalias y calcificaciones diseminadas en los pulmones, ganglios hiliares y el bazo. Esta enfermedad presenta síntomas y signos muy parecidos a los de la tuberculosis pulmonar crónica con cavitaciones. Es más común en hombres de mediana edad, ancianos y pacientes inmunodeficientes, evolucionando durante meses o años, con lapsos de inactividad y a veces curación

espontánea; o conducir a la muerte si no es tratada adecuadamente.

Los análisis químicos practicados para la determinación de arsénico (As) no fueron concluyentes; aún cuando no hay evidencia clínica de intoxicación por este elemento, si es un hecho que los boletines emitidos por el médico tratante de El Libertador Dr. Alejandro Próspero Reverend, describen el tratamiento que recibió con medicamentos contentivos de arsénico.

La administración de polvo de cantárida, obtenido por medio de la desecación de un coleóptero perteneciente a la familia Cantáridas (especie *Lytta vesicatoria*) administrado a El Libertador en dosis elevadas y aplicado en forma de vejigatorios, es un veneno enérgico que produce vesículas en la piel, en el sitio de la administración y actúa sobre el sistema genitourinario. La intoxicación por cantaridina presenta los síntomas siguientes: disuria, polaquiuria y hematuria, alteraciones que van progresando hasta llegar a la anuria y por ende a la insuficiencia renal aguda, siendo éste el desencadenante final de la muerte de El Libertador.

Estas manifestaciones clínicas, agregadas a las de la enfermedad broncopulmonar crónica reagudizada, evidenciada por dificultad respiratoria, dolor torácico más intenso en el lado derecho, tos con expectoración mucopurulenta y fiebre, llevaron a El Libertador a una hipoxia marcada con disminución de la tensión de

oxígeno y trastornos hidro-electrolíticos, la cual se manifiesta con más intensidad a nivel del encéfalo, trayendo como consecuencia trastornos de la conciencia, aumento de la permeabilidad capilar, salida de líquido del espacio intracelular e intravascular al espacio intersticial, con el consiguiente edema cerebral, que se acentúa a medida que aumenta la hipoxia, hasta llegar al enclavamiento de las amígdalas cerebelosas y compresión del bulbo raquídeo donde están ubicados el centro de la respiración y del funcionamiento cardíaco, conduciendo a un paro cardio-respiratorio y por consiguiente la muerte.



Dr. José A. Monque Ballesteros
Médico Anatomopatólogo
Sub Comisión Científica



Dra. Yanuacelis Cruz Calcaño
Médica Anatomopatóloga
Coordinación Nacional
Ciencias Forenses
C.I.C.P.C

GLOSARIO DE TERMINOLOGÍA MÉDICA DEL INFORME DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

Disuria: ardor para orinar

Polaquiuria: aumento de la frecuencia de la micción con escasa producción de orina.

Hematuria: Sangre en las orinas.

Anuria: ausencia de producción de Orinas.

Hipoxia: Disminución del Oxígeno que llega a el Sistema Nervioso central y a todos los órganos, siendo el primer Sistema afectado el Nervoso Central.

Micobacterium Tuberculosis: agente productor de la tuberculosis, sea esta pulmonar o sistémica.

Micobacterium Bovis: agente productor de tuberculosis en bovinos.

Treponema Pallidum sífilis: agente productor de la sífilis.

Brucillas sp.: agente productor de la enfermedad brucelosis (enfermedad respiratoria)

Paracoccidioides brasiliensis: agente productor de la enfermedad paracoccidioidomicosis.

Plasmodium sp.: agente productor de la enfermedad paludismo,

Leishmania donovani y cutánea: agentes productores de la Leshmaniasis.

**Informe del Dr. Howard Takiff sobre las experticias realizadas en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para determinar las Causas de la Muerte de El Libertador, Simón Bolívar
Caracas, 19 de julio de 2012**

Elaborado por:

Howard Takiff, Jefe del Laboratorio de Genética Molecular del IVIC.

En el laboratorio de la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (UEGF) del IVIC no se había realizado previamente una experticia que buscara evidencia de tuberculosis en huesos. Consulté como referencia artículos de otros investigadores que han encontrado evidencia de tuberculosis en huesos antiguos.

El trabajo fue realizado principalmente por los científicos Gerson Caraballo y Mary Acosta. Se aisló el DNA de una muestra de hueso y se utilizó la técnica de PCR para buscar DNA de una secuencia repetida en el cromosoma de la bacteria *Micobacterium tuberculosis*, agente causante de la tuberculosis.

No se encontraron resultados positivos: no se pudo encontrar evidencia de la presencia de ADN de *M. tuberculosis*.

Sin embargo, al ser esta la primera vez que en el IVIC se buscaba tuberculosis en huesos viejos, se quiso evitar que los resultados pudieran ser

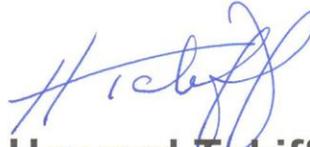
cuestionados, y que no pudieran ser tomados en cuenta como definitivos o contundentes.

Por ello, contacté a uno de los autores de los artículos de referencia consultados, que había encontrado evidencia de tuberculosis en otros huesos antiguos: el Dr. George Michael Taylor, actualmente en la Universidad de Surrey en Inglaterra. Recomendé a la Comisión Presidencial que le solicitara si pudiera realizar experticias a muestras de la osamenta que se le pudieran enviar.

Cumpliendo todos los procedimientos legales, el Dr. Taylor recibió de la Comisión Presidencial unos pequeños fragmentos de hueso. De ellos, aisló ADN para realizar la misma prueba que hicimos en el IVIC, y además utilizó otras técnicas más sofisticadas y sensibles. No encontró evidencia de tuberculosis, y tampoco evidencia de Malaria, ni evidencia de *Paracoccidiosis brasiliensis*, el hongo sugerido por el Dr. Paul Auwaerter como la posible causa de la afección pulmonar y de la muerte de El Libertador.

Dentro de la ciencia, la ausencia de evidencia no es un criterio 100% confiable de que la causa de la muerte no haya sido la tuberculosis, pero son los mejores resultados que hemos podido obtener hasta ahora. No hay que descartar que en 5 o 10 años existan mejores

métodos científicos o tecnologías más sensibles que permitan tener resultados más certeros.



Dr. Howard Takiff

C.I. 82.125.477

Jefe del Laboratorio de Genética
Molecular del IVIC

**Informe sobre los análisis biomoleculares
llevados a cabo sobre una muestra de los restos
mortales del Libertador Simón Bolívar en la
Universidad de Surrey, Guildford, Reino Unido.**

G.M. Taylor, División of Ciencias Microbiales, Facultad
de Salud y Ciencias Médicas, Edificio AX, Stag Hill
Campus, Guildford, Surrey, GU2 7TX, UK.

Objetivos:

Muestras tomadas de los restos de Simón Bolívar en el Panteón Nacional, después de la exhumación realizada en Caracas en julio de 2010, y transportadas al Reino Unido el 22 de agosto de 2011 por el Dr. Ángel L. Vilorio (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas), fueron objeto de la presente investigación. Los exámenes realizados en la Universidad de Surrey se enfocaron en intentos para detectar ADN antiguo (aADN) indicativo de infección con bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), y subsecuentemente en intentos para detectar otros patógenos, los cuales han sido objeto de especulación como causa de muerte del Libertador Simón Bolívar en 1830, a la edad de 47 años (Auwaerter *et al*, 2011).

Medidas tomadas para evitar contaminación.

Desde el comienzo de este estudio se tomaron medidas de seguridad para evitar contaminación del material traído al laboratorio con ADN moderno (reciente) o productos de PCR de experimentos anteriores. Se llevó a cabo una estrategia de tres laboratorios y cuatro estaciones de trabajo. Ésta

consistió en la separación física de las etapas pre y post-PCR. La extracción del ADN y la preparación de la PCR fueron realizados en un laboratorio que no había sido utilizado previamente para trabajo con tuberculosis u otros patógenos bacterianos. La amplificación por PCR fue realizada en un laboratorio separado físicamente, cerrado, y localizado a distancia del “laboratorio limpio”, con fuente y extractores de aire separados. El análisis post-PCR, incluyendo electroforesis de geles, fue realizado en un tercer laboratorio preparado específicamente para este fin. Las áreas pre y post-PCR tenían distintos equipos, reactivos, material desechable y facilidades para guardar material en neveras y congeladores. Las medidas detalladas tomadas para evitar la contaminación han sido publicadas previamente (Taylor *et al.*, 2006).

Extracción del ADN

Detalles de las muestras recibidas por el autor el 23 de agosto en la Sección Consular de la Embajada de la República Bolivariana de Venezuela en Londres, se muestran en la Tabla 1. Las muestras fueron abiertas en una campana de flujo categoría 2 dentro de las edificaciones de la División de Ciencias Microbianas de la Universidad de Surrey, Reino Unido. No se encontró ninguna muestra visible dentro el papel de aluminio en la placa de Petri (Muestra 005-D). Esta última supuestamente debía haber contenido dentina, cementum y pulpa extraídos del diente canino superior. La muestra fue devuelta a su bolsa. En su lugar, se realizaron extracciones de los materiales

asociados con esta muestra: los cepillos y papeles absorbentes incluidos dentro de tubos cónicos de centrifugación de 15 ml. Esto se hizo junto con la extracción en las muestras 008-A y 008-D.

Los fragmentos de hueso de las muestras mencionadas fueron pulverizados en morteros estériles de cerámica y los polvos transferidos a tubos limpios de 15 ml. Se añadieron 9 ml de un buffer basado en Guanidino a cada uno de los tubos, los cuales entonces fueron procesados utilizando el estuche de extracción de ADN “NucliSensTM”, según las instrucciones del fabricante, pero con modificaciones menores (bioMérieux Ltd., Boxtel, Holanda). En este procedimiento, el buffer de lisis, suplementado con agitación vigorosa y tres ciclos de congelación – descongelación, fue utilizado para extraer fragmentos de ADN que estuvieran atrapados sobre las partículas de sílica en un proceso “batch”. Después de lavar la sílica con 2 ml de buffer de lavado suministrado con el estuche (x2), se hizo un lavado con etanol 70% (2ml x 3) y acetona (2ml x 1). El residuo en la sílica fue eluído, secado al aire con 100 ml de agua grado HPLC, a 55⁰ C, sobre un bloque caliente. Después de la centrifugación, los eluatos fueron almacenados a menos 20⁰ C, hasta su posterior análisis.

Los ensayos de PCR aplicados.

Los estudios iniciales se enfocaron en la tuberculosis como una posible causa de muerte, según los reportes del *post mortem* realizado al cuerpo del Libertador

Simón Bolívar por el médico francés Dr. Alexandre Prospere Révérend (Auwaerteret *al.*, 2011). Los primeros PCRs aplicados fueron para la detección de la secuencia de inserción IS1081, presente en 6 copias en casi todas las especies y aislados del complejo micobacteriano de MTB. Dos versiones del ensayo fueron empleadas. El primero amplificó una región de 135 pb (pares de bases) y el segundo, un fragmento más pequeño de 79 pb, el cual ha demostrado ser útil en casos donde el ADN está extremadamente degradado. Una sonda dualmente marcada fue utilizada para monitorear la formación de producto en una plataforma de PCR en tiempo real (StratageneMxPro 3005P, Agilent Technologies). Los métodos con IS1081 son extremadamente sensibles y detectarían menos del equivalente a un solo genoma (Taylor *et al.*, 2005).

Se utilizó un segundo blanco para buscar organismos del complejo MTB. Éste fue la secuencia de inserción IS6110 (Thierry *et al.*, 1991), utilizada mucho en los primeros estudios de aADN y es un método que ha resistido la prueba del tiempo. Se utilizaron primers (cebadores) para un amplicon de 123 pb. Tanto el método del IS1081 como el de IS6110 detectarían los dos patógenos humanos más probables del complejo MTB, *M. tuberculosis* y *M. bovis*; así como las especies menos probables, como *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, y *M. microti* etc. Adicionalmente, a los loci blancos dentro del complejo micobacteriano MTB, se emplearon métodos de PCR adicionales para probar los extractos de ADN como evidencia de otros

patógenos, específicamente: paludismo, meloidosis, sífilis, brucelosis, leishmaniasis y paracoccidioidomycosis. La Tabla 2 contiene la lista de las enfermedades probadas y el loci de blanco de PCR dentro los genomas patógenos.

Evidencia de la sobrevivencia de ADN humano en extractos de hueso.

Dos métodos de PCR fueron utilizados para buscar evidencia de ADN humano. Los extractos fueron probados utilizando primers que amplifican una región de 116 pb del ADN mitocondrial humano de la región hipervariable I (HVR-1). Las secuencias de los primers fueron:

Delantera	(L15997)	5'-
CCACCATTAGCACCCAAAGCTA-3' y		
Reversa	(H16071)	5'-
ATACATAGCGGTTGTTGATGGGT-3'		

Las secuencias de los primers fueron modificadas levemente de aquellas recomendadas por el Dr. Carlos Álvarez, del Departamento de Medicina Forense de la Universidad de Granada, España. Se aplicó también un PCR para determinar género, basado en polimorfismos en el gen de amelogenina. En este método, los hombres se identifican por dos productos de PCR, uno de 105 pb del cromosoma Y, y otro de 290 pb del cromosoma X (Waldron *et al.*, 1997).

Secuenciación de DNA.

Productos de la PCR del ADN mitocondrial (mtADN) fueron separados en agarosa de bajo punto de fusión al 3% (peso/vol) (Invitrogen) y las bandas fueron cortadas con un bisturí estéril y purificadas con un dispositivo para aislar ADN GENE CLEAN III (Fisher LifeSciences, UK). Las plantillas (templates) fueron secuenciadas empleando los primers delantero y reverso de BeckmanCoulterGenomics, Takeley, Essex, Reino Unido.

Resultados y Discusión

No se encontró evidencia de aADN del complejo de MTB en los extractos de hueso preparados de las muestras 008-A o 008-D empleando cualquiera de los dos marcadores de TB (*IS1081* & *IS6110*), ni tampoco en los extractos preparados de 005-D (cepillos o tiras de papel) probado con el marcador *IS1081* solo (Tabla 2). Las figuras 1a y 1b muestran los resultados de uno de los ensayos RT-PCR (PCR en tiempo real) empleando el elemento *IS1081* para 135 y 79 pbamplicones, respectivamente. Los resultados del PCR con el elemento *IS6110* aplicado a las muestras de hueso se muestran en la Figura 2. Todos fueron negativos. De igual manera, los extractos no mostraron evidencia de ADN remanente de otros posibles patógenos, algunos de los cuales han sido objeto de especulación en este caso (Auwaerter *et al.*, 2011). Controles positivos para las PCRs de tuberculosis y *Brucella*, corridos después del trabajo con los extractos del Libertador Simón Bolívar, confirmaron que estos ensayos estuvieron funcionando

como se esperaba (resultados no mostrados). Los primers para detectar *Paracoccidiomycosis brasiliensis* fueron diseñados específicamente para este estudio y no hubo control positivo disponible. Se ha demostrado previamente que los otros primers son capaces de detectar el ADN de los patógenos para los cuales han sido diseñados.

Para ayudar con la interpretación de estos hallazgos negativos, se intentó verificar la recuperación del ADN humano en las mismas muestras. Las dos muestras de hueso mostraron evidencia clara de la preservación de ADN mitocondrial (mtADN). La banda amplificada del mtADN de 116 pb del extracto del hueso del húmero (008-A, Tabla 3) fue purificada a partir de agarosa 3% y secuenciada con los primers delantero y reverso. Con los dos primers se obtuvo una secuencia de consenso. Esta secuencia no mostró ninguna desviación de la secuencia Anderson para la región HVR-1 (Anderson *et al.*, 1981). La secuencia obtenida a partir de 008-A se muestra a continuación.

5'-

```
CCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAA  
ACTATTCTCTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTTG  
GGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAAC  
CGCTATGTAT-3'.
```

Adicionalmente, como se demuestra en las Figuras 3a y 3b, la muestra de hueso tomada del húmero resultó positiva utilizando la PCR de amelogenina, mostrando sendas bandas para los cromosomas X y Y. Las otras

muestras, incluyendo la de los extractos preparados de los cepillos y tiras de papel, resultaron negativas (Figura 4), y esto probablemente indica ADN humano menos preservado. La evaluación del ADN del huésped es útil en dos maneras. Primero, muestra que las condiciones favorecieron la sobrevivencia del ADN tanto en 008-A como en 008-D. También muestra que fragmentos de por lo menos 290 pb debían haber estado presentes en la muestra 008-A. En segundo lugar, bajo las condiciones del ensayo utilizado, la inhibición de la PCR no puede ser la explicación para el fallo en detectar DNA del complejo MTB o del otro patógeno.

Varias publicaciones sobre tuberculosis en la literatura arqueológica atestiguan sobre amplificación de ADN de micobacterias a partir de cuerpos ya enterrados, aún cuando la recuperación de ADN humano se ha encontrado comprometida. La naturaleza duradera de la pared micobacteriana (Takade *et al.*, 2003) ha sido propuesta para explicar esta observación (Donoghue *et al.*, 2004) pero las razones exactas aun son desconocidas. El ADN del complejo MTB también puede encontrarse en restos humanos sin evidencia de lesiones del esqueleto (Faerman *et al.*, 1997; Konomi *et al.*, 2002; Mayset *et al.*, 2002; Zink *et al.*, 2003; Donoghue, 2011).

Existe menos evidencia de sobrevivencia de aADN de otros patógenos buscados en el presente estudio. El ADN de plasmodium, parásito que causa el paludismo, se ha demostrado que sobrevive en esqueletos del

^sSigloV en Italia (Sallares & Gomzi, 2001). Evidencia de brucelosis ha sido reportada en un individuo de la Edad de Hierro del Sur de Siberia (Taylor *et al.*, 2007; Donoghue, 2008), y más recientemente en restos humanos fechados en los siglos XI-XIII y excavados del sitio de Butrint en Albania (Mutolo *et al.*, 2011). A pesar de reportes tempranos sobre la factibilidad de amplificar ADN de treponema (agente causante de sífilis) de casos históricos de sífilis (Kolman *et al.*, 1999), la experiencia de la mayoría de los investigadores de aADN ha sido que el ADN de este patógeno no persiste o no es apto para identificar casos de expedientes arqueológicos (Bouwman & Brown, 2004). Es posible que se deba a que el patógeno ya está ausente o presente en pequeño número cuando las lesiones distintivas del esqueleto son aparentes y por ende hacen que los restos llamen la atención.

Zink y colegas (2003) han amplificado ADN de *Leishmania* a partir de restos enterrados tanto de Egipto como de Nubia de hace aproximadamente 4000 años. El mismo blanco de kineoplastido fue escogido para el estudio presente y con sólo unas modificaciones menores en los primers oligonucleotídicos. No existe evidencia sobre la recuperación de ADN a partir de *Burkholderia pseudomallei* *P. brasiliensis* provenientes de fuentes arqueológicas, para evaluar la factibilidad de estudios de aADN sobre estos patógenos.

Conclusiones.

No se encontró ninguna evidencia de la presencia de ADN del complejo MTB en el material disponible para estudio. Se pudiera argumentar que los fragmentos óseos tomados del húmero e ileo no son los más apropiados para proveer evidencia de la tuberculosis pulmonar. Esto constituye una posible explicación para los hallazgos negativos. Sin embargo, nosotros y otros investigadores hemos encontrado la presencia de ADN del complejo MTB en componentes del esqueleto en casos donde la tuberculosis pulmonar era probable. Lo mismo es cierto también para el ADN de la otra micobacteria, *Mycobacterium leprae*, que se puede detectar a cierta distancia de las lesiones del esqueleto en casos de la lepra lepromatosa. La sobrevivencia de ADN humano y la falta de inhibición del PCR indican que estas muestras se encontraban aptas para estudios de aDNA. En vista de las PCRs altamente sensibles y los blancos multi-copias que se utilizaron, es probable que cualquier ADN remanente del complejo MTB existente en nuestras muestras se hubiera podido detectar. Aunque no se puede excluir la tuberculosis como causa de muerte, parece ahora una causa menos probable que lo que se había concluido previamente en los informes del examen *post mortem* realizado en 1830.

Bibliografía

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG.

Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature***290**(5806): 457-465, 1981.

Auwaerter PG, Dove J, Mackowiak PA. Simon Bolivar's Medical Labyrinth: An Infectious Diseases Conundrum. *Clinical Infectious Diseases***52**(1): 78–85, 2011.

Bouwman AS, Brown TA. The limits of biomolecular palaeopathology: ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis. *Journal of Archaeological Science***32**: 703-713, 2005.

Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infectious Diseases***4**: 584-592, 2004.

Donoghue HD. Molecular palaeopathology of human infectious diseases. Chapter 8 in "Advances in Human Palaeopathology" pp 147-176. Editors Ron Pinhasi and Simon Mays John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK, 2008.

Donoghue HD. Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clinical and Microbiological Infection***17**: 821-829, 2011.

Faerman M, Jankauskas R, Gorski A, Bercovier H, Greenblatt CL. Prevalence of human tuberculosis in a medieval population of Lithuania studied by ancient DNA analysis. *Ancient Biomolecules***1**: 205–214, 1997.

Kolman CJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA, Owsley DW, Tuross N. Identification of *Treponemapallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen. *Journal of Infectious Diseases* **180**:2060-2063,1999.

Konomi N, Lebwohl E, Mowbray K, Tattersall I, Zhang D. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. *Journal of Clinical Microbiology***40**: 4738–4740, 2002.

Mays S, Fysh E, Taylor GM. Periostitic rib lesions – a sign of pulmonary tuberculosis? *American Journal of Physical Anthropology*, **119**: 27-36, 2002.

Mutolo MJ, Jenny LL, Fenton TW, Foran DR. Osteological and Molecular Identification of Brucellosis in Ancient Butrint, Albania. *American Journal of Physical Anthropology*, 2011 in press.

Sallares R, Gomzi S. Biomolecular archaeology of malaria. *Ancient Biomolecules* **3**: 195-213, 2001.

Supaprom C, Wang D, Leelayuwat C, Thaewpia W, SUSAENG R, Koh V, EngEongOoi EE, Lertmemongkolchai G, Liu Y. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderiapseudomallei* in clinical blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology***45**: 2894-2901, 2007.

Takade A, Umeda A, Matsuoka M, Yoshida S-I, Nakamura M, Amako K: **Comparative studies on the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique.** *Microbiology and Immunology* **47**: 265-270, 2003.

Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research* **3**:12, 2007.

Taylor GM, Watson CL, Lockwood DNJ, Mays SA. Variable nucleotide tandem repeat (vntr) typing of two cases of lepromatous leprosy from the archaeological record. *Journal of Archaeological Science* **33**: 1569-1579, 2006.

Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland PC, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in archaeological human remains. *Microbiology* **153**: 1243-1249, 2007.

Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Research*, **18**: 1990

Waldron, HA, Taylor GM, Rudling, DR. Sexing of Romano-British baby burials from the Beddingham Roman villa, East Sussex. *Sussex Archaeological Collections*, **137**: 71-79, 1999.

Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular study on human tuberculosis in three

geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiology and Infection* **130**: 239–249, 2003.

Traducido por Angel Vilorio y Howard Takiff.

Tablas.

Tabla 1. Muestras de los restos del Libertador Simón Bolívar examinado en el presente estudio.

No. Muestra	Bolsa Sellada No.	Descripción	Comentarios
008-A	00367649	Fragmento de la cabeza del húmero	Dentro de un tubo cónico de 15ml de centrifugación
008-D	00367694	Fragmento de iliac crest	Como arriba
005-D	00367617	Cemento y dentina del interior del canino central superior	Paquete de papel aluminio en una placa Petri (roto) y encerrado en película plástica. Aparece vacío
005-D	Como arriba	6 pequeños cepillos	Dentro de un tubo cónico de centrifugación de 15ml
005-D	Como arriba	5 tiritas de papel absorbente	Dentro de tubos separados cónicos de centrifugación de 15ml

Tabla 2. Métodos de PCR de patógenos utilizados para examinar muestras de hueso de SB

Patógeno	Enfermedad	Método	Amplification size (bp)	PCR tipo	Ciclos	Reportero
MTB complejo	Tuberculosis	<i>IS1081</i>	135	RT-PCR	41	Sonda
MTB complejo	Tuberculosis	<i>IS1081</i>	79	RT-PCR	41	Sonda
MTB complejo	Tuberculosis	<i>IS6110</i>	123	cPCR	41	Agarose gel
<i>Brucella spp.</i>	Brucellosis	<i>IS711</i>	108	RT-PCR	41	EVA Verde
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	<i>15-KDa lipoptoteína</i>	120	RT-PCR	41	EVA Verde
<i>P. brasiliensis</i>	Paracoccidioidomycosis	<i>Gp43</i>	118	RT-PCR	41	EVA Verde
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidosis	Cromosoma 2	81	RT-PCR ¹	41	EVA Verde / sonda
<i>Leishmania major</i>	Leishmaniasis	Minicirculo kinetoplast	116	RT-PCR	41	EVA Verde
<i>Falciparum spp.</i>	Malaria	18S rRNA gen	135-138	RT-PCR	41	EVA Verde

cPCR = conventional PCR; RT-PCR = PCR en tiempo real; ¹Suprom et al, 2007.

Figuras.

Figura1a. Gráfica de la amplificación de PCR en tiempo-real del ensayo IS1081 (135 pb) aplicado a muestras 008-A y 008-D.

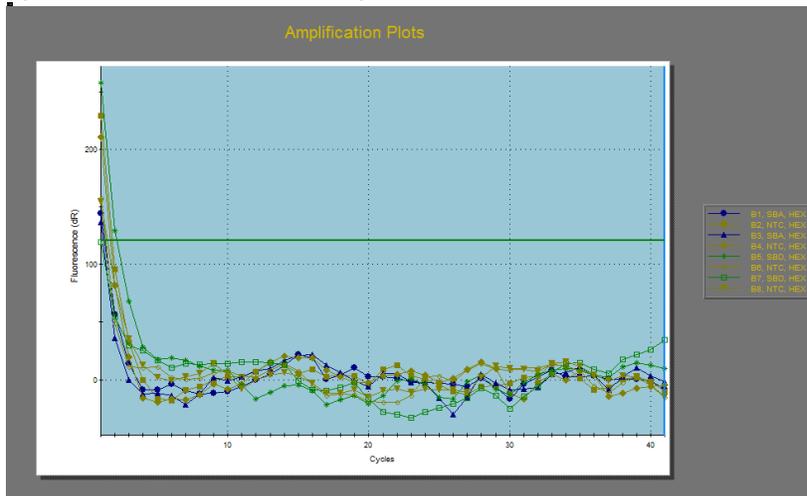


Figura 1b. Gráfica de la amplificación de PCR en tiempo-real del ensayo IS1081 (79 pb) aplicado a muestras 008-A y 008-D.

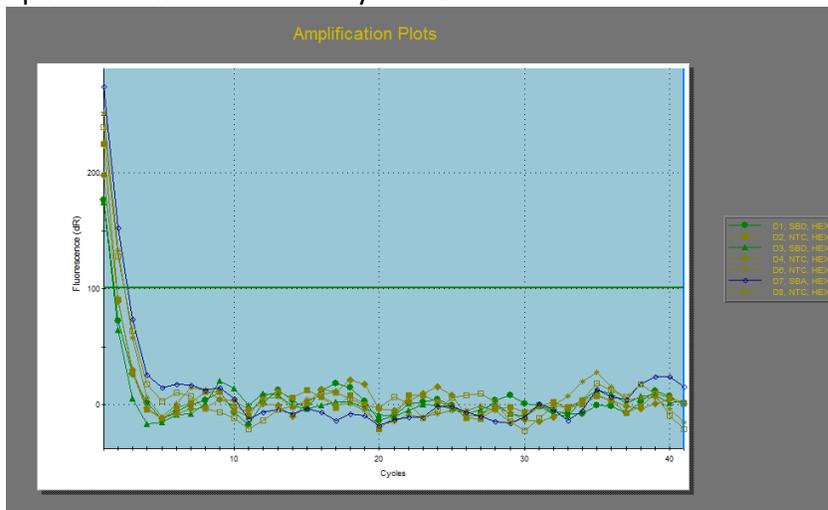


Figura 2. IS6110cPCR (123 pb) aplicada a muestras 008-A y 008-D. Canal 1 = 50 pb DNA escalera
Canales 2 & 3 = muestra 008-D. Canales 6 & 7 = controles con agua.

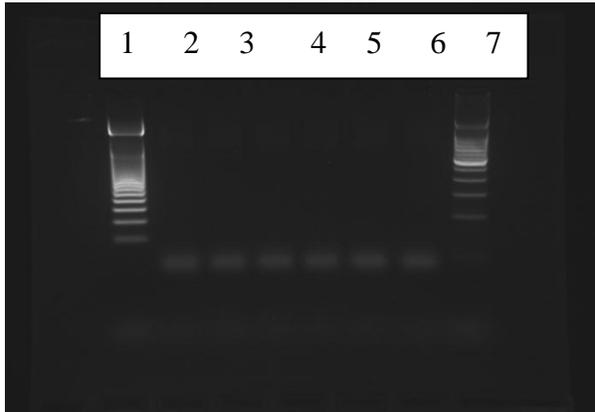


Figura 3a. Perfil de amplificación de amelogenina por PCR de muestras de SB 008-A, 008-D, y 005-A. Solo 008-A muestra algún producto de amplificación.

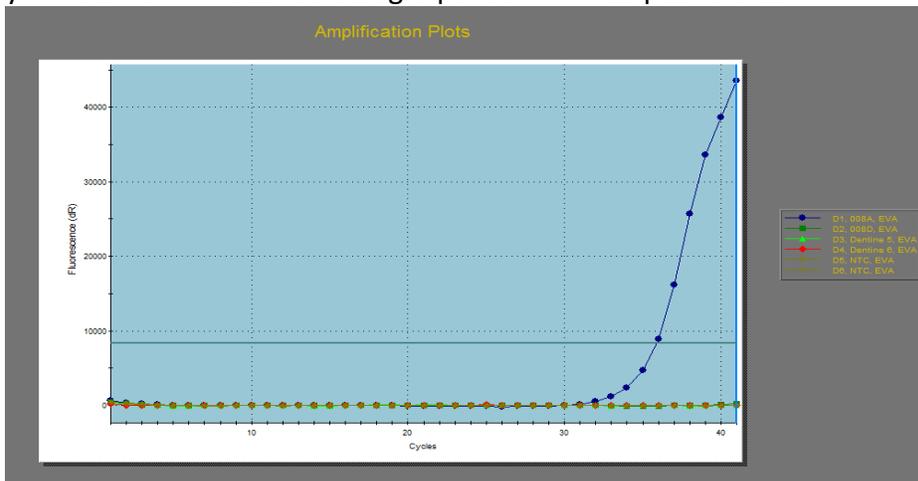


Figura 3b. Perfil de disociación de PCR de amelogenin (curva de derretimiento). La única muestra positiva es SB 008-A.

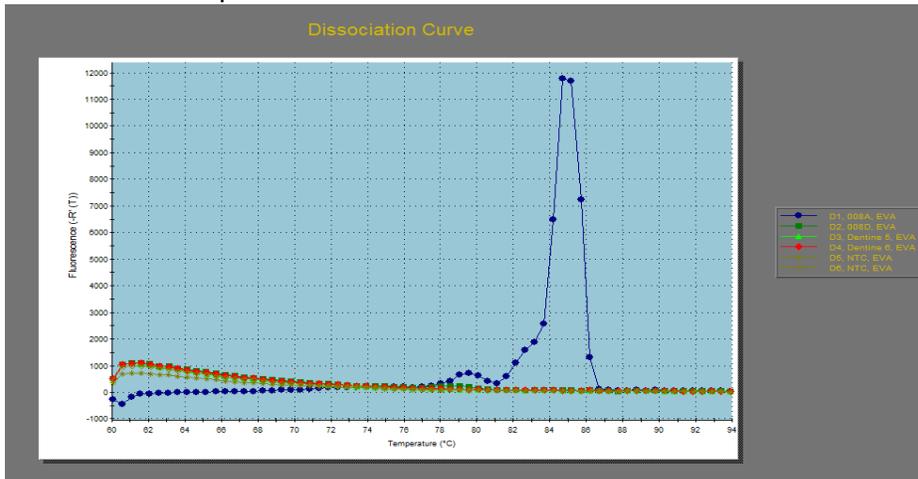


Figura 4. Productos de PCR de amelogenina analizados en un gel de 3% agarosa.

Canal 1 = marcadores de tamaño de DNA.

Canal 2 = muestra 008-A. Estagenero dos productos de 290 y 105 pb los cuales indican el genero masculino. Canal 3 = 008-D. Canal 4 = 005-D (cepillos). Canal 5 = 005-D (tiritas de papel). Canal 6 = NTC (control sin templado).

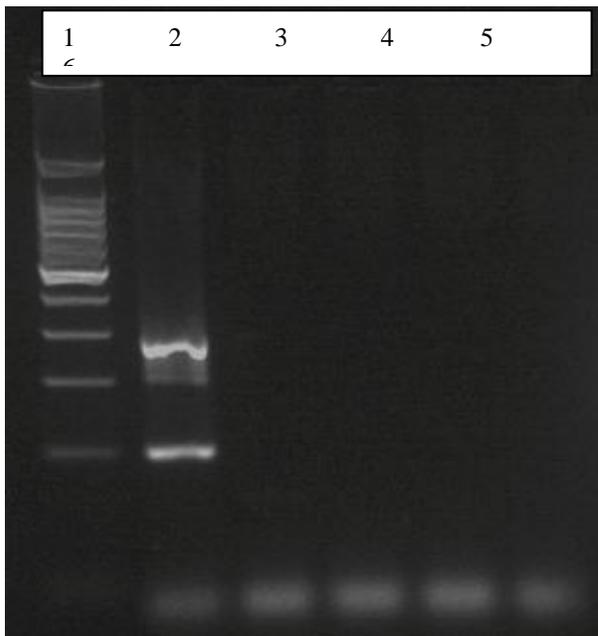


Tabla3. Resultados de PCR de las investigaciones parapatógenos y aDNA humano.

Muestra	DNA Humano		Tuberculosis			Paracoccidio mycosis	Malaria	Meliodosis	Sífilis	Leishmania	Brucellosis
	Mt DNA	Amelogenin	IS10 81 (135)	IS10 81 (113)	IS6110						
008-A	++	+ M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
008-D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
005-D Cepillos	-	-	-	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	
005-D tiritas de papel	-	-	-	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	

Índice

	Página
Conclusiones de Anatomía Patológica Forense en el Estudio de los Restos de El Libertador Simón Bolívar.....	02
Glosario de Terminología Médica del Informe de Anatomía Patológica.....	11
Informe del Dr. Howard Takiff sobre las experticias realizadas en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para determinar las Causas de la Muerte de El Libertador, Simón Bolívar.....	13
Informe sobre los análisis biomoleculares llevados a cabo sobre una muestra de los restos mortales de El Libertador Simón Bolívar en la Universidad de Surrey, Guildford, Reino Unido. G.M. Taylor, División of Ciencias Microbiales, Facultad de Salud y Ciencias Médicas, Edificio AX, Stag Hill Campus, Guildford, Surrey, GU2 7TX, UK	16