



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tuberculose em populações do passado:

A importância das coleções osteológicas identificadas

Sumário pormenorizado da Lição Síntese
Provas de Agregação em Antropologia,
especialização em Antropologia Biológica

Ana Luísa Santos

Departamento de Ciências da Vida
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra

Março 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

*Tuberculose em populações do passado:
A importância das coleções osteológicas identificadas*

Sumário pormenorizado da Lição síntese apresentada à Universidade de Coimbra para prestação de Provas de Agregação, na especialidade Antropologia, elaborado nos termos do decreto-lei n.º 239/87 de 19 de junho e do artigo 49 dos Estatutos da Universidade de Coimbra (Regulamento n.º 344/2010) homologados pelo Despacho Normativo n.º 43/2008 (2ª série).

Ana Luísa Santos

Março 2020

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS	v
1. CARACTERIZAÇÃO DA TUBERCULOSE	1
1.1 O que é a tuberculose?	1
1.2 Quem (e como) fica doente? Quais os fatores de risco?	1
1.3 Como se previne?	2
1.4 Como se diagnostica?	3
1.5 É curável?	3
2. QUANDO É QUE A TUBERCULOSE COMEÇOU A AFETAR OS SERES HUMANOS?	5
3. O QUE SÃO COLEÇÕES OSTEOLÓGICAS IDENTIFICADAS?	9
4. QUAL O CONTRIBUTO DAS COLEÇÕES OSTEOLÓGICAS IDENTIFICADAS PARA O DIAGNÓSTICO DA PALEOTUBERCULOSE?	11
4.1 O que revelaram os estudos realizados no hospedeiro?	11
4.1.1 Tuberculose óssea	11
4.1.2 Tuberculose nos tecidos moles	17
4.1.3 Abordagem probabilística às lesões esqueléticas	20
4.1.4 Manifestações colaterais	21
4.2 O que revelaram os estudos realizados ao agente patogénico?	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
BIBLIOGRAFIA	29

CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

A eleição da lição síntese *Tuberculose em populações do passado: A importância das coleções osteológicas identificadas* resulta do facto de integrar a temática *Patologia infecciosa* lecionada na unidade curricular *Paleopatologia das Populações Humanas* (ver *Relatório da unidade curricular*).

O estudo da tuberculose em populações do passado, ou paleotuberculose, é um tema seminal da paleopatologia que, no entanto, não se esgotou precisamente pelas abordagens e técnicas mais recentes aplicadas tanto a indivíduos provenientes de contextos arqueológicos como em esqueletos de pessoas cujos dados biográficos, como a causa de morte, estão documentados.

Esta lição de síntese articula a paleopatologia atual com a história da antropologia, tanto a nível nacional como internacionalmente, prestando reverência às denominadas coleções osteológicas identificadas, património pelo qual a Universidade de Coimbra é mundialmente (re)conhecida no seio da antropologia física/biológica, da bioarqueologia e da antropologia forense.

Os objetivos desta lição são: 1. dar a conhecer o panorama da tuberculose na atualidade; 2. revelar as pesquisas efetuadas nos últimos anos acerca da origem e evolução da doença e debater as possíveis vias de dispersão pelos continentes; 3. divulgar as coleções osteológicas identificadas e demonstrar o seu potencial; 4. indicar os critérios e cuidados do diagnóstico paleopatológico bem como as diferentes abordagens técnicas e metodológicas; e 5. motivar os estudantes para esta linha de investigação. As aprendizagens serão consolidadas com a componente prática.

1. CARACTERIZAÇÃO DA TUBERCULOSE

1.1 O que é a tuberculose?

A tuberculose é uma doença infecciosa de notificação obrigatória (Direção Geral da Saúde[DGS], 2018), causada por (mico)bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC, *Mycobacterium tuberculosis* complex) - *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* - pelo que afeta uma grande variedade de animais domésticos e selvagens que, potencialmente, podem transmitir o bacilo aos seres humanos (Brosch *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2009). A bactéria *M. tuberculosis* foi identificada por Robert Koch em 1882, daí a denominação bacilo de Koch, e em 1998 Cole e co-autores sequenciaram o seu genoma.

É uma infeção aguda ou crónica que pode ser precedida por um longo período de latência em que o agente infeccioso é controlado pelo sistema imunitário do hospedeiro (Brites e Gagneux, 2012). Pode afetar qualquer órgão ou tecido embora seja mais frequente no pulmão (Burke, 2001; Ponnuswamy, 2014).

O crescente número de casos em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considerar, em 1993, a tuberculose como uma emergência global. De acordo com a OMS (WHO, 2019), a tuberculose está no top 10 das causas de morte a nível mundial, com 1,5 milhões de mortos, dos quais 251.000 eram doentes com VIH. Em 2018 surgiram 10 milhões de novos casos, 5,7 milhões em homens, 3,2 milhões em mulheres e 1,1 milhão em crianças (WHO, 2019). Em Portugal, a incidência da tuberculose cifra-se abaixo dos 20/100.000 habitantes com idade média de 50,2 anos e 64% dos casos em indivíduos do sexo masculino (DGS, 2018).

1.2 Quem (e como) fica doente? Quais os fatores de risco?

A forma mais comum de contágio é por via aérea em que um indivíduo com tuberculose pulmonar ativa liberta o bacilo quando fala, tosse ou espirra (Mousa, 2007; DGS, 2018). No entanto, apenas 10% das pessoas expostas por inalação desenvolvem a doença, aumentando o risco de contágio em indivíduos imunodeprimidos, com VIH, ou alvo de terapias

imunossupressoras, ou crianças (DGS, 2018). Nos restantes, a imunidade natural consegue evitar ou abortar a infeção (Sable *et al.*, 2019).

Os pulmões são o órgão mais afetado mas a bactéria pode disseminar-se por via hematológica ou linfática, sendo menos frequente a infeção pelo consumo de produtos de origem animal contaminados (Mousa, 2007). Para além destes fatores, há aspetos sociais como habitações sobrelotadas, ausência de saneamento, fome ou malnutrição, migrações, sistemas imunitários comprometidos devido à quimioterapia, velhice, *diabetes mellitus*, alcoolismo e abuso de drogas que concorrem para o maior risco de desenvolver a doença ou para a reincidência por baixa adesão à medicação (Wilbur e Buikstra, 2006; Lönnroth *et al.*, 2009; Esteves *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, no prelo). A tuberculose, ao ter sido associada a condições de pobreza e pela memória do isolamento dos doentes, causou, e continua a causar, estigma tanto por parte dos doentes como por parte de familiares ou amigos (Martins, 2012; Veiga, 2016).

Na atualidade a tuberculose ocorre maioritariamente entre os idosos (DGS, 2018) enquanto até meados do século XX as crianças e os adultos jovens eram os mais atingidos (Santos, 2015).

1.3 Como se previne?

Uma das formas de prevenção da tuberculose é por vacinação com a BCG (Bacilo Calmette-Guérin, *M. bovis*) através de injeção intradérmica nos recém-nascidos (DGS, 2018). Esta vacina surgiu em 1921 e a sua aplicação em Portugal generalizou-se na década de 1950 (Araújo, 1994). A vacinação reduziu significativamente o número de casos, nomeadamente as formas severas e a tuberculose extrapulmonar (Sable *et al.*, 2019). Estes autores referem ensaios clínicos em curso de mais de uma dúzia de potenciais vacinas para prevenir a infeção, a progressão clínica e a recorrência.

Existe também tratamento preventivo que pode ser administrado a pessoas que estiveram em contacto com um doente, antes do diagnóstico e respetivo tratamento serem iniciados, cujos planos de administração de antibacilares variam de 3 a 9 meses (DGS, 2018).

Para além das abordagens biomédicas, a melhoria das condições de habitação, higiene, alimentação e exposição solar, com conseqüente produção de vitamina D (na realidade uma

hormona esteróide), são fatores que auxiliam na prevenção, não só pela diminuição do risco de contágio como, também, pelo reforço do sistema imunitário (Talat *et al.*, 2010).

1.4 Como se diagnostica?

Na suspeita da doença, pela existência de tosse crónica, dor no peito, cansaço, falta de apetite, perda de peso, febre e suores noturnos, são realizadas análises laboratoriais, designadamente na expetoração ou em biópsia, com vista à deteção do *M. tuberculosis* (Wallis *et al.*, 2010; DGS, 2018). Ainda de acordo com a DGS, outros meios de diagnóstico utilizados são a radiografia pulmonar, o teste tuberculínico e/ou o teste de libertação de interferão gama (IGRA, *Interferon Gamma Release Assay*).

1.5 É curável?

A elevada mortalidade causada pela tuberculose até meados do século XX fomentou a ideia de que era incurável e, por isso, os doentes não eram hospitalizados (Santos, 2000; Matos e Santos, 2013; Silva e Marques, 2019). Em meados do século XIX surgiram unidades hospitalares especializadas no tratamento, e na prevenção, da tuberculose: os sanatórios de montanha, para os doentes com tuberculose pulmonar, e os marítimos, para a tuberculose óssea. As terapêuticas consistiam essencialmente na denominada “tríade higiénica” - bom ar, boa alimentação e bom descanso - e na helioterapia (Santos, 2000; Matos e Santos, 2013). No decurso do século XX, tanto os sanatórios como os hospitais, que começaram a disponibilizar enfermarias para doenças infectocontagiosas, tornaram-se menos paliativos e mais medicalizados, tendo-se intensificado as abordagens cirúrgicas (Porter, 1996; Matos e Santos, 2013; Burke, 2011). A partir de 1943, com o surgimento da estreptomicina (Porter, 1996), iniciou-se uma nova era terapêutica pelo contínuo desenvolvimento de antibióticos pelo que os sanatórios começaram a encerrar (Matos e Santos, 2013; Roberts e Bernard, 2015).

Atualmente, a identificação da estirpe de *M. tuberculosis* e da respetiva suscetibilidade aos antibacilares permite a seleção da terapêutica mais eficiente (DGS, 2018). No entanto, a tuberculose continua a ser considerada uma doença reemergente e uma ameaça global devido ao desenvolvimento de estirpes resistentes aos antibióticos (DGS, 2018; Nelson *et al.*, no prelo). Este fenómeno não é recente, pois foi reportado nos anos seguintes ao

desenvolvimento dos antibióticos, no entanto, ao longo das últimas décadas, intensificou-se, sobretudo, pela não adesão dos doentes à terapêutica. A implementação da Toma de Observação Direta (TOD, ou DOTS, *Directly Observed Therapy Short course*) deu frutos no combate à resistência aos antibióticos (Esteves *et al.*, 2017) e a OMS (WHO, 2019) propôs como meta para a estratégia “*End TB*” a redução, até 2035, de 90 a 95% do número de casos e de mortes associadas.

O tratamento atual inclui fármacos de primeira linha (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol), com duração de dois meses, seguido duma fase de manutenção (isoniazida e rifampicina) por cerca de quatro meses (DGS, 2018). Ainda segundo a DGS, a tuberculose multirresistente (MDR-TB, *multidrug-resistant tuberculosis*) e extensivamente resistente (XDR-TB, *extensively drug resistant tuberculosis*) implicam planos mais longos e com mais fármacos pois, neste último caso, é resistente aos mesmos antibióticos que a MDR-TB (pelo menos à isoniazida e à rifampicina em simultâneo) e a qualquer das fluoroquinolonas e, pelo menos, a uma das três drogas injetáveis de segunda linha (capreomicina, canamicina, e amicacina). Apesar de não serem termos consensualizados pela OMS alguns estudos referem doentes com tuberculose extremamente resistente (XXDR-TB, *extremely drug resistant*) e totalmente resistente (TDR-TB, *totally drug resistant tuberculosis*), ou seja, surgiram assim casos incuráveis frequentemente associados à pandemia do VIH/SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) (Dheda e Migliori, 2012). Para alguns investigadores, como Brites e Gagneux (2012), as pressões seletivas sobre a micobactéria intensificaram-se nas últimas décadas e terão consequências na sua genética futura.

Acrescente-se que se, por um lado, a quimioterapia nunca foi sinónimo de cura, por outro, os doentes podem superar a tuberculose sem intervenção terapêutica graças à imunidade natural (Sable *et al.*, 2019) como acontecia anteriormente ao desenvolvimento dos antibióticos (Matos e Santos, 2015).

2. QUANDO É QUE A TUBERCULOSE COMEÇOU A AFETAR OS SERES HUMANOS?

Até ao momento, a tuberculose foi diagnosticada em esqueletos que datam do Neolítico coincidindo, assim, com a sedentarização das populações e a domesticação de animais o que terá facilitado a transmissão da doença, tanto por via aérea como pelo consumo de carne e leite de animais contaminados. São conhecidos casos em locais que atualmente são território de Itália (p. ex. Formicola, 1987; Canci *et al.*, 1996; Sparacello *et al.*, 2017), Alemanha (Nicklisch *et al.*, 2012), Hungria (Spekker *et al.*, 2012; Masson *et al.*, 2015) e Polónia (Gladykowska-Rzeczycka, 1999; Borowska-Strugiń *et al.*, 2014). Apesar do número reduzido de casos identificados até ao momento, estes achados mostram que a tuberculose existe em várias regiões europeias desde há cerca de 6000 anos. Evidências mais antigas são controversas como acontece com os vestígios submersos de Atlit-Yam (costa de Israel) datados de 9000 anos (Hershkovitz *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015) ou do sítio arqueológico pré-domesticação no atual território da Síria (Baker *et al.*, 2015). Em Portugal, o possível caso mais antigo data do período Romano como relatado na síntese apresentada por Santos e Matos (2019).

Durante muito tempo foi aventado que a tuberculose bovina teria começado a afetar os seres humanos e daí a barreira cronológica da neolitização. Contudo, alguns estudos genéticos sugeriram que o MTC saiu de África com os humanos durante as migrações do Pleistoceno, com o ancestral comum mais recente (MRCA, *most recent common ancestor*) estimado em 70 mil anos (Comas *et al.*, 2013). Outras investigações apontam uma antiguidade de cerca de 6 mil anos para o MRCA apoiando assim a difusão da doença no Holoceno (Bos *et al.*, 2014).

As dúvidas sobre o aparecimento e a dispersão da tuberculose existem igualmente noutras regiões do globo. Durante muitos anos, os investigadores consideravam que a tuberculose, tal como a lepra, teria chegado à América após o ano de 1492. De facto, a caracterização molecular das estirpes atuais de MTBC mostra que a linhagem europeia (L4) domina no continente americano pelo que terá sido introduzida pós-contacto (Gagneux *et al.*, 2006, Nelson *et al.*, no prelo). No entanto, Allison e co-autores (1973; 1981) identificaram macro e microscopicamente lesões causadas por tuberculose em múmias encontradas no deserto de Atacama, datadas do primeiro milénio da era comum (EC). Posteriormente, Salo e co-autores (1994) identificaram ADN (ácido desoxirribonucleico) da micobactéria em nódulos

pulmonares e linfáticos de uma mulher (ca. 1000-1300 EC), mumificada naturalmente nos Andes. Para além destas evidências de tuberculose pré-Colombiana, muitas outras se seguiram cujos diagnósticos foram realizados por exames macro e microscópico, por análises biomoleculares de ADN (Roberts and Buikstra, 2003; Nelson *et al.*, no prelo) e ácidos micólicos (Luna *et al.*, 2018).

Se a chegada pré-Colombiana da tuberculose é agora consensual, a polémica persiste quanto à origem e antiguidade. Análises genómicas recentes indicam que as focas e os leões marinhos são a fonte de tuberculose no continente (sul)americano (Bos *et al.*, 2014). Os projetos de investigação em curso, que analisam amostras retiradas de esqueletos e de múmias, cuja preservação é excecional, pelas condições ambientais andinas, devem, num futuro próximo, revelar novos dados acerca do surgimento da tuberculose na América.

Outro continente onde a pesquisa da paleotuberculose se tem intensificado nos últimos anos é a Ásia. Até ao momento, o caso mais antigo foi encontrado por Pechenkina e coautores (2007) na China e data de 2500 a 2000 AEC (antes da era comum). As restantes evidências são mais recentes, entre 454 AEC e 124 EC no Japão (Suzuki e Inoue, 2007), 400 AEC e 400 EC na Sibéria (Murphy *et al.*, 2009), 300 AEC e 500 EC na Tailândia (Tayles e Buckley, 2004) e no primeiro século AEC na Coreia do Sul (Suzuki *et al.*, 2008).

Em África, as referências à tuberculose datam essencialmente do período colonial, em particular dos séculos XIX-XX (Santos, 2004; Campbell, 2019). A inexistência de indícios mais antigos pode ser explicada pelas populações terem sido essencialmente nómadas, pelas condições ambientais que dificultam a preservação dos esqueletos e porque as escavações e análises paleopatológicas são menos comuns e recentes (Santos e Matos, 2019), à excepção do Egipto onde há evidências datadas de 4500 AEC (Roberts e Buikstra, 2003; Ortner e Frohlich, 2008).

A presença de tuberculose antes do contacto recente com os Europeus foi reportada no Hawaii (Tremblay, 1997), Nova Zelândia (Buckley *et al.*, 2010), Papua Nova Guiné e, possivelmente, Tonga e Ilhas Salomão (comunicação pessoal de Pietruwesky *in* Stone *et al.*, 2009).

Considerando a documentação existente, designadamente para o último milénio na Europa, o panorama revelado pelos esqueletos é assaz diferente do que se pressupõe ter ocorrido. Esta discrepância pode ser justificada pela conjugação de vários fatores: i) em casos agudos, as pessoas infetadas podem ter morrido rapidamente pelo que apenas os tecidos

moles foram afetados e, quando estes não se preservaram, a tuberculose não pode ser detetada macroscopicamente; ii) apenas 3-5% dos indivíduos doentes desenvolvem lesões ósseas que, todavia, não são patognomónicas (Resnick e Niwayama, 1995; Ortner, 2003); e, iii) as lesões descritas na literatura clínica atual não coincidem com as geralmente observadas em populações do passado (Santos, 2000).

O conhecimento das lesões originadas pela tuberculose advém essencialmente de publicações médicas que descrevem casos clínicos ocorridos antes da vacinação e dos antibióticos. Alguns trabalhos relatam, inclusivamente, os órgãos mais afetados e as prevalências da doença por sexo e por idade dos pacientes. Estes documentos são de extrema importância mas devem ser interpretados com cautela devido às limitações do conhecimento médico, ao desconhecimento de eventuais fatores socioculturais que possam ter introduzido erros ou vieses na identificação, ou no registo, de determinada causa de morte.

Se por um lado, as manifestações descritas nessa literatura são, muito provavelmente, idênticas às respostas do sistema imunitário do hospedeiro nos séculos ou milénios anteriores não é de descartar, contudo, que tanto os seres humanos como os organismos do MTC tenham sofrido alterações genéticas, designadamente, durante a sua dispersão por vários ambientes no decurso do Holoceno.

A observação macroscópica e radiológica das lesões deixadas em esqueletos e múmias, ou seja no hospedeiro, constitui a forma mais comum e rápida de sinalização da tuberculose mas, como vimos, está sujeita a limitações. Assim, na década de 1980 começaram as pesquisas que envolvem análises genéticas que procuram identificar os agentes patogénicos (ver pf 4.2). Estas metodologias, apesar de terem melhorado consideravelmente, especificamente depois da técnica de sequenciamento de nova geração, ou sequenciamento de próxima geração (conhecida pela sigla NGS, *Next-Generation Sequencing*), também não são infalíveis pois dependem da preservação do ADN, são dispendiosas em tempo e custos, carecem de laboratórios altamente especializados, são destrutivas e não informam sobre o estado da tuberculose, latente, ativa ou curada. Portanto, o diagnóstico da paleotuberculose depende, em grande parte, do reconhecimento das lesões ósseas, da sua distribuição e frequência no esqueleto. Neste sentido, as coleções osteológicas identificadas são essenciais para o conhecimento das manifestações ósseas, especialmente se formadas por indivíduos que padeceram de tuberculose antes do surgimento dos antibióticos.

3. O QUE SÃO COLEÇÕES OSTEOLÓGICAS IDENTIFICADAS?

As coleções osteológicas identificadas, também denominadas coleções de referência ou documentadas, são conjuntos de crânios e/ou esqueletos de pessoas das quais se conhecem dados biográficos. A quantidade de informação disponível em cada coleção depende de como, e com que objetivos, foi constituída e pode incluir a naturalidade, o sexo, a idade à morte, estatura, estado civil, local e causa de morte, profissão, nome, filiação e local de inumação ou de proveniência (Quigley, 2001; Santos, 2000; Ubelaker, 2014). O conhecimento desses dados biográficos permite a pesquisa de informações complementares sobre os indivíduos, no entanto, por questões éticas, os resultados são apresentados sob anonimato (Santos, 2020).

Estas coleções, criadas essencialmente a partir do século XVIII, no seio da História Natural e do estudo das “raças” (Quigley, 2001; Umbelino e Santos, 2011), permitem uma grande variedade de estudos no campo do desenvolvimento de métodos para estimar o sexo e a idade à morte em contextos arqueológicos ou forenses e, mais recentemente, mostraram-se bastante úteis na aferição dos denominados indicadores de atividade profissional, para a história da medicina e, claro, para a paleopatologia (Rocha, 1995; Quigley, 2001; Ardagna *et al.*, 2006; Cunha e Wasterlain, 2007; Henderson e Alves-Cardoso, 2018). O reconhecimento da proficuidade dos esqueletos identificados conduz à contínua constituição de coleções à escala global (Cunha *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2020; Santos, 2020; Cardoso *et al.*, 2020) estimando-se um número superior a sessenta.

Convém, todavia, alertar que as coleções não são isentas de problemas porque, mesmo quando formadas por centenas ou milhares de esqueletos, não representam a população da qual derivam; frequentemente, são compostas por indivíduos de condição socioeconómica baixa, falecidos em hospitais ou em instituições assistenciais, ou provêm da necessária exumação em cemitérios municipais; foram constituídos para o ensino e, por isso, são formadas por casos patológicos; outros resultam da doação de cadáveres, para indicar alguns exemplos (Cunha, 1995; de la Cova, 2011; Santos, 2020).

No que diz respeito às causas de morte registadas, a fiabilidade pode ser questionada atendendo ao conhecimento médico e aos meios de diagnóstico existentes aquando do falecimento e, por outro lado, algumas denominações usadas são atualmente impercetíveis. Alguns indivíduos mostram lesões compatíveis com as causas de morte mas o inverso também

ocorre, ou seja, alguns esqueletos não manifestam lesões macroscópicas expectáveis para determinada causa de morte. Podem também mostrar sinais relativos a múltiplas patologias sofridas ao longo da vida e no momento da morte, apesar de não estarem inscritas nos registos hospitalares (quando existem) ou no óbito, pois foi indicada a causa do falecimento e não as doenças intercorrentes ou coexistentes (Umbelino *et al.*, 2012).

Apesar dos potenciais vieses - onde se podem incluir, igualmente, a distribuição, muitas vezes não equitativa, por sexo e idade dos indivíduos e a baixa integridade dos esqueletos, - são de enorme valor para a investigação e a qualidade e quantidade de trabalhos deriva da representatividade dos indivíduos e da documentação associada (Ubelaker, 2014).

A Universidade de Coimbra tem o privilégio de possuir um legado único, iniciado no século XIX, período primordial da investigação e ensino da Antropologia a nível mundial (Rocha, 1995; Umbelino e Santos, 2011; Santos, 2018a;b), constituído por três coleções identificadas: Coleção de Crânios Escolas Médicas (n=585), Coleção de Crânios Trocas Internacionais (n=1144) e Coleção de Esqueletos identificados (n=505). Estas coleções funcionam como laboratório e permitem viajar no tempo pois pertenceram a pessoas que morreram entre 1895 e 1937 ou seja antes da produção de antibióticos mas num período em que o conhecimento médico (p. ex., descoberta dos raios-x) e a proximidade a instituições de saúde como os Hospitais da Universidade de Coimbra, o Sanatório de Celas, o Sanatório dos Covões e o Hospital da Ordem Terceira conferem credibilidade às causas de morte registadas. Para alguns destes indivíduos foi possível conhecer melhor a sua condição de saúde e comorbilidade(s) através dos dados de internamento (Santos, 1999; 2000; Lopes, 2014). Mais recentemente, foi constituída outra coleção identificada com esqueletos de pessoas falecidas, maioritariamente, no século XXI (Ferreira *et al.*, 2014).

4|Qual o contributo das coleções osteológicas identificadas para o diagnóstico da paleotuberculose?

4. QUAL O CONTRIBUTO DAS COLEÇÕES OSTEOLÓGICAS IDENTIFICADAS PARA O DIAGNÓSTICO DA PALEOTUBERCULOSE?

A tuberculose não possui uma inequívoca assinatura óssea pelo que para o seu diagnóstico é necessário conhecer o leque de lesões e as respetivas localizações e distribuição no esqueleto humano, sendo de particular relevância a observação de indivíduos que faleceram antes do desenvolvimento dos antibióticos. Muitas coleções osteológicas identificadas possuem indivíduos que viveram e morreram antes de 1943, coincidindo com o período em que a tuberculose era endémica em muitos países. Nestas osteotecas estão muitos esqueletos de pessoas que estiveram em contacto com a doença, padeceram ou morreram sem qualquer quimioterapia o que confere uma importância crucial às coleções. Por um lado, os médicos estavam familiarizados com a tuberculose e, por outro, para os falecidos, após a descoberta do bacilo já era sabido que as anteriores denominações, - tísica correspondia à tuberculose pulmonar, *lupus vulgaris* à cutânea, alguns tumores à articular, Mal de Pott à tuberculose vertebral, entre outras -, não eram mais do que manifestações da mesma doença, dependendo do tecido ou órgão atingido, já que em comum tinham a micobactéria cujo diagnóstico microbiológico era então possível. Além disso, nas coleções osteológicas identificadas da Universidade de Coimbra, existem, para alguns indivíduos, registos hospitalares que atestam os diagnósticos processados no *Laboratório de Microbiologia e Química Biológica* da Universidade de Coimbra (Santos, 1999; 2000; Silva e Marques, 2019).

A apresentação dos resultados auferidos em estudos executados a nível mundial em coleções osteológicas identificadas será efetuada de seguida considerando primeiro as pesquisas realizadas sobre o hospedeiro (4.1), ou seja sobre os vestígios humanos, seguida das análises biomoleculares ao agente patogénico (4.2).

4.1 O que revelaram os estudos realizados no hospedeiro?

4.1.1 Tuberculose óssea

O diagnóstico da tuberculose óssea em paleopatologia é difícil e incomum porque as lesões ocorrem em menos de 5% dos casos, sendo mais frequentes nas vértebras (Roberts e Buikstra, 2003; Holloway *et al.*, 2011; Holloway *et al.*, 2013).

A coluna vertebral pode ser infetada por via hematológica ou por dispersão das bactérias das vísceras adjacentes, causando lesões osteolíticas na parte anterior dos corpos vertebrais torácicos e lombares, - frequentemente de forma circular com contornos arredondados que, ao penetrarem no osso cortical, expõem o tecido trabecular -, enquanto os arcos neurais e os processos posteriores permanecem, usualmente, intactos (Christensen *et al.*, 2011; Roberts e Buikstra, 2019). O número de corpos vertebrais afetados varia (mais comum entre dois e quatro), a destruição aumenta progressivamente de tamanho, podendo envolver todo o corpo da(s) vértebra(s), conduzindo ao colapso e à cifose angular e à fusão que pode inclusive ocasionar paralisia dos membros inferiores (Aufderheide *et al.*, 1998; Roberts e Buikstra, 2019). Esta manifestação da tuberculose vertebral é denominada **espondilite tuberculosa**, tuberculose da coluna ou **Mal de Pott** em homenagem a Sir Percival Pott (1713-1788), cirurgião do St. Bartholomew's Hospital em Londres que, em 1779, descreveu a doença/lesões (Roberts e Buikstra, 2003). Apesar das características macromorfológicas descritas terá de haver sempre um diagnóstico diferencial pois doenças como a brucelose, neoplasias e outras infeções podem provocar lesões idênticas (Roberts e Buikstra, 2019). Mesmo na clínica, a confirmação da etiologia das lesões imagiológicas carece de identificação do bacilo de Koch (Esteves *et al.*, 2017).

A maioria dos diagnósticos de paleotuberculose assenta neste tipo de lesão (Halloway *et al.*, 2011) que durante décadas foi usada quase em exclusividade nas análises dos esqueletos até porque era considerado comum o contágio por *M. bovis* - pelo consumo de carne e leite de animais contaminados, com posterior disseminação da bactéria do trato gastrointestinal para outros locais do organismo -, e porque seria uma zoonose que sofreu alterações e originou *M. tuberculosis* nos seres humanos. No entanto, pela pesquisa de Brosch e coautores (2002) é agora sabido que a espécie *M. bovis* não precedeu *M. tuberculosis* e que *M. tuberculosis* e/ou *M. canettii* estão mais intimamente relacionados com o ancestral comum dos bacilos tuberculosos. Independentemente do cenário evolutivo, a transmissão de uma doença bovina, ou doutra doença zoonótica de MTC, para os humanos e vice-versa, pode ter ocorrido em qualquer momento, tal como acontece atualmente (Roberts e Buikstra, 2019). Na mesma direção apontam os estudos realizados em coleções osteológicas identificadas que exibem baixa frequência de Mal de Pott, mesmo em períodos e regiões com elevada prevalência de tuberculose bovina. Em Portugal, estima-se que no início do século XX, 30 a 40% das vacas teriam tuberculose (Lepierre, 1909), mas o Mal de Pott apenas surge como

4|Qual o contributo das coleções osteológicas identificadas para o diagnóstico da paleotuberculose?

causa de morte de quatro indivíduos da Coleção de Crânios Trocas Internacionais da Universidade de Coimbra. Por seu turno, na Coleção de Esqueletos Identificados, um jovem de 16 anos e uma mulher de 47 anos, apresentam lesões compatíveis com este diagnóstico apesar das causas de morte indicarem, respetivamente, enterite tuberculosa e bronquite crónica.

Na tentativa de obter uma visão mais ampla da doença, foi efetuado um estudo nas estatísticas nosológicas dos Hospitais da Universidade de Coimbra e, entre 1919 e 1928, o Mal de Pott foi responsável por 4,7% (n=98) dos internamentos e 1,1% (n=4) das mortes (Santos, 2015). Considerando a hipótese de que muitos doentes possam ter perecido fora do hospital, foram analisados os livros dos enterramentos do Cemitério Municipal da Conchada, na cidade de Coimbra e, também nesta fonte, o Mal de Pott surge como responsável minoritário (0,7%, n=8) das mortes por tuberculose. Estes dados aventam uma de duas possibilidades: a espondilite tuberculosa não era de todo frequente (apoando os registos hospitalares e o baixo número de casos identificados) ou não foi considerada como causa de morte.

Se a primeira hipótese parece mais plausível, se atentarmos à maioria dos resultados de pesquisas realizadas noutras coleções identificadas, e que se indicam em seguida, a investigação de Steyn *et al.* (2013) apresenta dados diferentes. As autoras estudaram indivíduos com tuberculose registada como causa de morte da Coleção de Ossos de Pretoria (Universidade de Pretoria) e da Coleção Raymond A. Dart (Universidade de Witwatersrand) e concluíram que a frequência de lesões aumentou ao longo do tempo: os indivíduos falecidos antes de 1950 possuem menos lesões (21,1%) do que os que morreram entre 1950 e 1985 (38,2%) ou depois de 1985 (41%), após a emergência da co-infecção por VIH e da resistência aos antibióticos. Não foi unicamente a frequência de lesões que mudou mas também a localização, diminuíram as lesões vertebrais que dominavam no grupo pré-antibiótico. Estes resultados assemelham-se ao decréscimo, estatisticamente significativo, de casos de tuberculose na coluna, encontrada por Holloway e coautores (2011) numa revisão sistemática da literatura paleopatológica. Parece que, em períodos mais recentes, a tuberculose manifesta-se preferencialmente em ossos longos, articulações, mãos, pés (Holloway *et al.*, 2011) e costelas (Steyn *et al.*, 2013). De igual modo, na Coleção Galler, alojada no Museu de História Natural de Basileia e na Universidade de Zurique, as manifestações ósseas em 29 indivíduos (42%, entre os 69 com diagnóstico médico de tuberculose) foram diferentes dependendo da data de falecimento considerada: antes de 1946, entre 1946 e 1950 e depois

de 1950 (Holloway *et al.*, 2013). Estes autores verificaram que a fusão anterior e posterior das vértebras e a deposição de osso, a que denominaram processo de cicatrização (*healing*), ocorreram naturalmente, ou seja antes de 1946, tendo aumentado após a intervenção farmacológica.

Na Coleção Hamman-Todd do Museu de História Natural em Cleveland (Ohio) 0,9% (4/445) dos indivíduos que faleceram com tuberculose sofreram de Mal de Pott (Kelley e Micozzi, 1984). Na Coleção Certosa, existente na Universidade de Bolonha, uma mulher e um homem (3,2%, 2/62) mostram lesões compatíveis e causa de morte por Mal de Pott (Mariotti *et al.*, 2015). Na Coleção Terry, do Instituto Smithsonian, em Washington D.C., há análises parcelares. Pálfi e coautores (2012), num estudo realizado em 1728 indivíduos, salientam três jovens (com idades entre os 17 e 19 anos) com causa de morte por tuberculose e com manifestações ósseas multifocais, osteolíticas e osteoblásticas (coluna, costelas, crânio, entre outras). Num dos esqueletos reportaram *foramina* nos corpos vertebrais, relacionando-os com hipervascularização, mas posteriormente Mariotti e coautores (2015) verificaram, na Coleção de Certosa, estarem associados à tuberculose.

Num estudo mais recente, na Coleção Terry, foram estudados três indivíduos (distintos dos apresentados por Pálfi *et al.* em 2012) com lesões vertebrais e envolvimento extrarraquidiano que, na ausência de dados sobre a causa de morte, seriam de improvável associação à tuberculose (Spekker *et al.*, 2018). De uma forma menos sistemática, decorrente também dos esqueletos não estarem completos, Pearlstein (2015) referiu lesões osteolíticas em vértebras de indivíduos, com causa de morte tuberculose, da Coleção Anatômica de Esqueletos Huntington (1893-1921), do Museu de História Natural (Smithsonian Institution) em Washington D.C.. Na Coleção Galler, constituída por um patologista, possui, por isso, um número elevado de indivíduos com lesões ósseas, quatro dos quais intervencionados cirurgicamente para induzir fusão posterior das vértebras o que facilitou o processo de cicatrização (Holloway *et al.*, 2013).

Como se pode verificar por esta síntese, a tuberculose na coluna vertebral não parece ter sido comum. Em contracorrente, está o estudo de Giacomini e Carrara (2014) nos indivíduos com causa de morte tuberculose da Coleção Tedeschi, do Museu de Antropologia da Universidade de Pádua, em que 14 das 17 (82,4%) colunas vertebrais possuem sinais atribuíveis a essa doença. Comparativamente aos trabalhos supracitados, esta frequência é bastante elevada e

4|Qual o contributo das coleções osteológicas identificadas para o diagnóstico da paleotuberculose?

os autores não descrevem detalhadamente a que lesões se referem pelo que é aconselhada prudência na aceitação deste resultado.

Recentemente, na Coleção de Esqueletos Identificados de Lisboa, também conhecida por Coleção Luís Lopes ou do Museu Bocage, pertença do Museu Nacional de História Natural e da Ciência da Universidade de Lisboa, foi realizado um estudo no esqueleto de uma menina que faleceu, em 1940, com 9 anos, com causa de morte tuberculose pulmonar. O exame macroscópico e imagiológico revelou severas lesões líticas em quatro vértebras torácicas que provocaram enorme cifose e escoliose compatível com Mal de Pott (Gooderham *et al.*, [em revisão]). Este esqueleto mostra um conjunto de lesões adicionais, como seja formação de osso novo numa costela, problemas de crescimento com fusão prematura da cabeça femoral esquerda e do grande trocanter, osteopenia e baixa estatura (correspondente, à época, sensivelmente a uma criança de 7 anos) causados, muito provavelmente, por ter permanecido acamada por um longo período de tempo. Esta hipótese é suportada pela pesquisa realizada nos registos de internamento entre 1904 e 1953 no Sanatório de Sant'Ana, na Parede, em que as meninas falecidas de tuberculose óssea eram consistentemente mais baixas do que as sobreviventes, sendo a sobrevivência fortemente associada também a maior peso na admissão (Spake e Cardoso, 2019). Conforme referido por Gooderham e coautores ([em revisão]), o conhecimento deste leque de lesões e o prognóstico de uma doença prolongada com desfecho fatal são dados relevantes para o diagnóstico da tuberculose em esqueletos de contextos arqueológicos.

Para além do Mal de Pott, têm sido reconhecidas **outras lesões vertebrais** associadas à hipervascularização e que se caracterizam por pequenos orifícios, ou *foramina*, de forma irregular localizados na margem ventral dos corpos. Por serem lesões relativamente comuns, especialmente em indivíduos não adultos, não foi atribuída particular relevância como pista para o diagnóstico de tuberculose tendo sido considerada consequência do crescimento (Santos, 2000). No entanto, em 2015, Mariotti e co-autores registaram sistematicamente estes orifícios, classificando-os em três tipos: *foramina* aumentado (diâmetro entre 3 e 5 mm), erosões e outros *foramina* (cavidades de várias formas com dimensões inferiores a 3 mm). Este último tipo é mais frequente (com diferença estatisticamente significativa) no grupo de indivíduos que tiveram registada causa de morte tuberculose (presente em 23,7% dos indivíduos) quando comparado com os outros grupos de causa de morte. As vértebras também possuem cavidades internas visíveis em tomografia computadorizada e invisíveis a olho

nu. Esta técnica imagiológica, não sendo de aplicação corrente pelos custos inerentes, permitiu descrever uma nova pista para o diagnóstico da doença.

A tuberculose óssea pode manifestar-se doutras formas como sejam **artrites articulares** ombro, cotovelo, anca, joelho ou tornozelo - e **osteomielite** (Roberts e Buikstra, 2019). As artrites sépticas ocorrem quando as bactérias, ou outros microrganismos patogénicos, se propagam pela corrente sanguínea ou por uma ferida acidental ou cirúrgica até à articulação (Goldenberg, 1998). O bacilo afeta o osso trabecular, preferencialmente a metáfise de ossos longos (Aufderheide *et al.*, 1998; Ortner, 2003), regiões com maior irrigação sanguínea e onde as células fagocíticas são mais escassas (Berney *et al.*, 1972, *in* Hopewell, 1994).

Na Coleção de Esqueletos Identificados da Universidade de Coimbra existem dois indivíduos não adultos com infeção no joelho (lesões osteoblásticas e osteolíticas) e no tornozelo, ambos com perda de massa óssea (Santos, 2000; Santos e Roberts, 2001). Baixas frequências foram também registadas na Coleção Certosa (Mariotti *et al.*, 2015), apesar da tuberculose nas articulações que suportam o peso, como a bacia e o joelho, estarem descritas como localizações frequentes no esqueleto (Aufderheide *et al.*, 1998; Ortner, 2003). Na Coleção Galler, encontram-se dois indivíduos masculinos, um adolescente e um adulto, com destruição das superfícies articulares da anca e um outro afetado no pé, neste último a doença terá surgido na juventude, cerca de 20 anos antes da sua morte aos 36 anos (Holloway *et al.*, 2013).

A **spina ventosa** ou **dactilite** (por afetar usualmente ossos das mãos e dos pés) são denominações para a osteomielite tuberculosa na qual ocorre, simultaneamente, destruição óssea, reações periosteais proliferativas e expansão fusiforme do osso que, radiologicamente, se mostra como cavidades líticas com ampliação da diáfise (Teo e Peh, 2004). São mais frequentes em crianças, atingindo múltiplos ossos, enquanto nos adultos estão confinadas a um osso (Roberts e Buikstra, 2003; Teo e Peh, 2004). Na Coleção Terry, Pálfi e coautores (2012) descreveram engrossamento da diáfise devido a osteomielite tuberculosa na ulna esquerda, com cloaca, num indivíduo com 17 anos que possuía também osteíte tuberculosa no íliaco direito. Como referido nestes trabalhos, estas manifestações são incomuns.

Para além destas localizações, e como referido anteriormente, a tuberculose pode afetar qualquer osso. Mariotti e co-autores (2015) indicaram ainda uma possível associação entre tuberculose e lesões líticas em esternos, tanto no manúbrio como no corpo, mas que deverá ser confirmada noutras amostras com maior número de indivíduos.

4.1.2 Tuberculose nos tecidos moles

Depois de se discorrer sobre a expressão da tuberculose óssea, é momento de se discutirem as lesões que podem indicar que a doença alvejou tecidos percíveis como, por exemplo, as **lesões endocranianas** mencionadas ocasionalmente na literatura, conforme descrito em compêndios como os de Aufderheide e coautores (1998) ou Ortner (2003). A sua formação pode estar relacionada com a meningite tuberculosa, que atinge principalmente crianças com idade inferior a 10 anos, manifestando-se através da formação de lâminas de osso novo de 0,5 a 1 cm que, nalguns casos, afetam também os ossos faciais, como o maxilar (Roberts e Buikstra, 2003). No entanto, há poucos estudos sistemáticos em crânios de indivíduos identificados. Na Coleção Osteológica Tedeschi foram estudados 59 indivíduos de ambos os sexos com causa de morte tuberculose (Giacon e Carrara, 2011). Um indivíduo adulto (1,6%) possui formação de osso no endocrânio assinalada, pelos autores, como compatível com tuberculose, sendo que a literatura refere frequências entre 0,1 a 2% (Ortner, 2003; Giacom e Carrara, 2011). O estudo de Steyn e Buskes (2016), em indivíduos da África do Sul, pré e pós-antibióticos, da Coleção da Universidade de Pretoria, Coleção Raymond A. Dart e da Coleção Kirsten (Universidade de Stellenbosch) mostrou um aumento de lesões cranianas no último grupo, mesmo em indivíduos que não tiveram meningite tuberculose como causa de morte. Na Coleção de Esqueletos Identificados da Universidade de Coimbra, os indivíduos com causa de morte meningite tuberculosa não possuem lesões endocranianas (Santos, 2000). Contudo, persiste a hipótese de eventual destruição por processos tafonómicos e/ou durante a limpeza dos crânios. Na Coleção Terry são descritas lesões endocranianas em dois jovens atribuídas, por Pálfi e coautores (2012), à meningite tuberculosa. Num destes indivíduos é visível no endocrânio um serpenteado cuja aparência foi denominada *Serpens Endocrania Symmetrica* (SES) por Hershkovitz e coautores (2002). Num trabalho realizado em crânios da Coleção Hamann-Todd do Museu de História Natural de Cleveland, a SES é mais comum em indivíduos com causa de morte tuberculose. Cortes histológicos mostraram que o processo está limitado à parte superficial do endocrânio, portanto, sem envolvimento do diploe ou da tábua externa. Este tema foi revisitado por Spekker (2018) na Coleção Terry, que ao considerar diferentes tipos de impressões, concluiu que não são patognomónicas da

meningite tuberculosa referindo, contudo, que as impressões granulares são bons indicadores desta doença.

Outra forma de diagnóstico incomum é a tuberculose cutânea ou *lupus vulgaris* em esqueletos, tendo sido sugerida em três indivíduos da coleção da Universidade de Pádua (Giacon e Carrara, 2011).

Em seguida exibem-se os estudos sobre **tuberculose pulmonar**, atualmente a forma mais frequente da doença como, provavelmente, terá sido no passado, atendendo à facilidade de transmissão do bacilo de Koch por via aérea. Por exemplo, entre 1919 e 1928, 43,7% (904 em 2067) dos internamentos por tuberculose nos Hospitais da Universidade de Coimbra foram devidos à forma pulmonar (Santos, 2015). Valores superiores foram verificados por Roberts e Bernard (2015) no Sanatório de Stannington onde, entre 1936 e 1954, 60% das admissões entre os 6 e 13 anos eram por tuberculose pulmonar. Por lesar tecidos moles, os investigadores consideraram que a sua identificação seria apenas possível em múmias. Por outro lado, era afirmado que sem tratamento adequado os doentes não sobreviveriam tempo suficiente para a infeção pulmonar trespassar a pleura e lesionar as costelas. Todavia vários estudos determinaram longos períodos de internamento, e de sobrevivência, antes da quimioterapia.

Um trabalho de revisão, tendo por base 21 publicações que relatam pacientes com tuberculose entre 1905 e 1970, mostrou que a duração da tuberculose, desde o início até a cura ou morte, era de aproximadamente 3 anos (Tiemersma *et al.*, 2011). Outros estudos apontam para internamentos mais longos. No Hospital da Ordem Terceira em Coimbra dos 23 doentes internados, entre 1885 e 1944, 16 (69,6%) faleceram entre um dia e 20 anos após a admissão hospitalar, com valor médio de 716,26 dias (Silva e Marques, 2019). Por seu turno, o estudo de Matos e Santos (2015), nos registos clínicos do Sanatório Vasconcelos Porto, revelou que não existem diferenças significativas no tempo médio de hospitalização nos pacientes internados entre 1931 e 1944 (350,32 dias), ou seja antes da administração de antibióticos, e entre 1955 e 1961 (371,80 dias). O mesmo é válido para a extensão dos internamentos, respetivamente 2509 (6,87 anos) e 2147 dias (5,9 anos). Na realidade, só após a poliquimioterapia é que o tratamento se tornou verdadeiramente efetivo. Também a pesquisa de Roberts e Bernard (2015) nos registos clínicos do Sanatório infantil de Stannington revelou que a implementação da quimioterapia (estreptomina) em 1946 e a fundação do

4|Qual o contributo das coleções osteológicas identificadas para o diagnóstico da paleotuberculose?

Serviço Nacional de Saúde (1948) não tiveram grande efeito no perfil biossocial de crianças internadas.

O ceticismo acerca da possibilidade da identificação paleopatológica da tuberculose pulmonar era também justificado pelo facto de esqueletos de indivíduos com outras causas de morte possuírem, de igual modo, lesões nas costelas. Para além de que, a clínica não corroborava estes achados pois a formação de osso novo na superfície visceral da grelha costal não é facilmente visível em radiografias tomadas em posição ântero-posterior e, efetivamente, não são necessárias para o diagnóstico dos doentes (Santos e Roberts, 2001; Santos e Suby, 2012). Entretanto, o progresso técnico da imagiologia revelou que nas doenças pulmonares crónicas, sendo mais comum na tuberculose, podem existir reações periosteais proliferativas sobre o tecido cortical da superfície visceral das costelas dos pacientes causadas por inflamação da pleura com eventual produção de pus (p. ex., Eyster *et al.*, 1996; Guttentag e Salwen, 1999; Kass *et al.*, 2007). A paleopatologia procura suporte na medicina para os seus diagnósticos e, curiosamente, em 2019 Brazão e coautores utilizaram resultados de estudos em esqueletos identificados para apoiar um diagnóstico clínico.

Os estudos sobre esta temática em coleções osteológicas identificadas, iniciados na década de 1980 na Hamann-Todd, revelaram que a formação de osso novo na superfície visceral das costelas é mais frequente (8,8%) em indivíduos que tiveram tuberculose como causa de morte (Kelley e Micozzi, 1984). Esta associação mostrou-se ainda mais consistente na Coleção Terry, onde 61,6% dos indivíduos com tuberculose apresentavam este tipo de lesões (Roberts *et al.*, 1994). As tendências da associação de formação de osso novo com a tuberculose pulmonar foram confirmadas posteriormente nos trabalhos realizados na Coleção de Esqueletos Identificados da Universidade de Coimbra onde se reportaram em 86,5% dos não adultos (Santos e Roberts, 2001) e em 85,7% dos adultos com tuberculose (Santos e Roberts, 2006). Resultados idênticos (90,5%) foram obtidos na Coleção de Esqueletos Identificados de Lisboa (Matos e Santos, 2006) e, mais recentemente, em cerca 58,8% dos adolescentes e adultos da Coleção de Certosa (Mariotti *et al.*, 2015).

Por último, menciona-se o testemunho das vítimas da ditadura franquista falecidos com tuberculose pulmonar no Sanatório-penal de San Cristóbal de Pamplona e exumados do *Cementerio de las Botellas* assim denominado porque em cada sepultura era colocada uma garrafa com a identificação do jazente (Etxeberria e Pla, 2014). Não sendo uma coleção identificada, estes esqueletos possuem, entre outras lesões, osso novo nas costelas.

Estas pesquisas mostraram que o registo detalhado das características do osso novo, da sua localização ao longo da costela (mais comum na extremidade vertebral) e da posição na caixa torácica (normalmente entre as 4ª e 8ª costelas), são elementos importantes para o diagnóstico diferencial de doenças que afetam o trato respiratório inferior (Santos e Roberts, 2001; 2006; Matos e Santos, 2006; Mariotti *et al.*, 2015). Nesse sentido, e porque os indivíduos provenientes de contextos arqueológicos estão frequentemente incompletos, Davies-Barret e coautores (2019) propuseram um método que tem o mérito de registar o estado de preservação das costelas e a distribuição das lesões. Contudo, ao não distinguirem na grelha de observação a extremidade esternal da costela dificultam o diagnóstico diferencial de outras condições o trato respiratório inferior de etiologia não tuberculosa.

Este tópico de investigação tem grande potencial de desenvolvimento, não só para confirmação das tendências sugeridas pelos trabalhos supracitados, como para averiguar que outras doenças causam lesões nas costelas e se se podem distinguir (Santos, 2000; Santos e Roberts, 2006; Santos, 2015). Para tal, é essencial o estudo sistemático doutras coleções e não apenas a indicação das frequências como apontado por Giacon e Carrara (2014).

Numa tentativa de verificar se o osso novo com aparência macroscópica idêntica formado na superfície visceral das costelas de indivíduos com diferentes causas de morte (tuberculose, outras doenças pulmonares e extrapulmonares não tuberculosa) possui diferenças na sua histomorfologia, amostras de indivíduos da Coleção de Lisboa foram observadas com microscópio de luz polarizada (Assis, 2013; Assis e Keenleyside, 2019). As autoras concluíram que a microestrutura óssea também não permite identificar a causa de morte mas distingue situações agudas, de longa duração ou crónicas.

4.1.3 Abordagem probabilística às lesões esqueléticas

Conforme os estudos apresentados anteriormente comprovam, existe um conjunto de lesões esqueléticas que, não sendo patognomónicas, surgem em indivíduos que tiveram tuberculose óssea e/ou pulmonar. De igual modo ficou claro que há localizações preferenciais para o surgimento dessas pistas. Assim, aplicando os conceitos de sensibilidade e especificidade, Pedersen e coautores (2019) usaram uma abordagem probabilística a um conjunto de 18 lesões - em costelas, vértebras, úmeros, rádios, ulnas, ilíacos, fémures e tíbias - associadas à tuberculose. Para tal, estudaram 240 indivíduos da Coleção Terry com causa de

4|Qual o contributo das coleções osteológicas identificadas para o diagnóstico da paleotuberculose?

morte tuberculose, - ambos os sexos e idade à morte superior a 15 anos - e, como controlo, 240 indivíduos da Coleção Doador William M. Bass (Universidade do Tennessee) - com perfil etário e sexual aproximados e sem registo de tuberculose - falecidos depois de 1980.

Os resultados revelaram um conjunto de lesões cuja presença em indivíduos com tuberculose é estatisticamente significativa: reações proliferativas na superfície visceral das costelas ou lesões líticas (> 5 mm de diâmetro); proliferação óssea na superfície ventral das vértebras torácicas ou lombares; orifícios (>3 mm ou numa área > 10 mm) no processo oleocraniano da ulna; três ou mais cavidades (> 3 mm) com formato circular e bordos arredondadas, ou abscesso, na parte lateral do corpo do *ilium* ou proliferação óssea (*woven*) em pelo menos 50% da superfície; duas ou mais cavidades (>3 mm ou cobrindo mais de 50% da área) na fossa acetabular do íliaco, de bordos (*woven*) com trabécula densa; e, por último, orifícios (> 3 mm, ou numa área > 10 mm) na superfície auricular do íliaco.

Tal como outras investigações referidas nesta lição, também as tendências observadas nestes resultados deverão ser testados noutras coleções identificadas, tanto em indivíduos que tiveram tuberculose como causa de morte como nos falecidos devido a outras doenças.

4.1.4 Manifestações colaterais

Depois de se indicarem as lesões que possibilitam o diagnóstico da tuberculose no esqueleto, enunciam-se outras pistas aqui denominadas como manifestações colaterais.

Na infeção pulmonar crónica por tuberculose pode ocorrer **calcificação da pleura** sendo essencial que o/as antropólogo/as que trabalham em escavações estejam alertados para a possibilidade de sua preservação. A confirmação da etiologia destas estruturas pode fazer-se por análise espectrométrica, por microscopia eletrónica de varrimento (Fernandes *et al.*, 2014) ou biomolecular (Donoghue *et al.*, 1998).

Outro indicador da tuberculose pulmonar é a reação periosteal proliferativa, quando ocorre simetricamente em ossos tubulares e sem deposição endosteal, característica da **osteoartrópia hipertrófica**, uma síndrome de etiologia desconhecida que provoca artrite e inflamação das articulações das mãos, cotovelos, bacia e joelhos (Martínez-Lavín *et al.*, 1993; Resnick e Kransdorf, 2005; Yap *et al.*, 2017). Apesar de ser considerada um indicador não específico, uma vez que pode surgir por doença traumática, cardíaca ou neoplasia, tem forte associação à tuberculose (Santos, 2000; Ortner, 2003; Weston, 2012; Yap *et al.*, 2017). Em

1998, Rothschild e Rothschild procuraram caracterizá-la em indivíduos identificados das Coleções Hamman-Todd, Terry e Grant (Universidade de Toronto, Canadá). Alguns anos mais tarde, na Coleção de Esqueletos Identificados da Universidade de Coimbra, verificou-se que as lesões compatíveis com a osteoartropatia hipertrófica são estatisticamente significativas em indivíduos de ambos os sexos, com tuberculose pulmonar como causa de morte, sendo o risco de desenvolverem esta condição 3,41 vezes superior quando comparados com os falecidos de outras doenças pulmonares ou extrapulmonares de etiologia não tuberculosa (Assis *et al.*, 2011). Nesse estudo, os ossos mais afetados no membro superior são o rádio e a ulna e no inferior a tíbia, o fémur e a fíbula. Na Coleção de Certosa apenas três indivíduos mostram lesões compatíveis com osteoartropatia hipertrófica (Mariotti *et al.*, 2015) ao passo que na Coleção Anatômica de Esqueletos Huntington existem vários esqueletos (Pearlstein, 2015). Não tendo sido objetivo específico deste trabalho a análise de lesões em indivíduos com causa de morte tuberculose, esta coleção aparenta ter potencial de estudo neste tópico. Por último, refere-se o estudo macroscópico, radiológico e histológico de um indivíduo da Coleção de Esqueletos Identificados de Évora (Universidade de Évora) com lesões compatíveis com osteoartropatia hipertrófica e causa de morte desconhecida (Anselmo *et al.*, 2016).

De referir que, em contextos arqueológicos, indivíduos com reações periosteais proliferativas obtiveram resultados positivos para o MTC (Nicklisch *et al.*, 2012). Não obstante, desconhecer-se a sua etiologia e o valor para o diagnóstico da tuberculose, devem ser procuradas e registadas estas camadas finas de osso novo na superfície dos ossos (Assis *et al.*, 2011), na medida em que já em 1915, Locke publicou uma extensa revisão de casos clínicos, tendo concluído que a osteoartropatia hipertrófica é uma condição secundária, sendo a tuberculose pulmonar provavelmente a doença primária mais importante. De realçar ainda o risco de subestimação da sua frequência pela facilidade com que se soltam ou destroem durante a remoção do solo que encobre os ossos e no manuseamento, tal como acontece também nas costelas (Santos e Suby, 2012).

Outra abordagem à doença foi realizada na Coleção Identificada do Museu Finlandês de História Natural em Helsínquia, em indivíduos que morreram entre 1915 e 1937 (Mansukoski e Sparecello, 2018). Estes investigadores quantificaram a **área transversal total** (obtidas após digitalização a laser 3D), de úmeros, fémures e tíbias de indivíduos masculinos com e sem tuberculose como causa de morte tendo verificado que os indivíduos falecidos por tuberculose tinham, quando padronizados para o tamanho do corpo, áreas dos úmeros e dos

4|Qual o contributo das coleções osteológicas identificadas para o diagnóstico da paleotuberculose?

fémures significativamente menores. Consideraram ainda como subjacente a esta relação, uma combinação de fatores com a “fragilidade” biológica do indivíduo (conforme discutido no paradoxo osteológico por Wood e coautores em 1992) em termos de suscetibilidade à infecção, a reduzida atividade durante a infância e/ou a deficiência de vitamina D que, possivelmente, influenciaram tanto o desenvolvimento subperiosteal durante a adolescência como, posteriormente, a maior vulnerabilidade para morrer devido à tuberculose, supondo que a doença crónica teria tido início antes da obtenção do pico de massa óssea na adolescência. Esta possibilidade existe, por exemplo, nos dados clínicos do Sanatório Infantil de Stannington, em Inglaterra, em que a idade de admissão das crianças com tuberculose óssea era geralmente inferior à das que tinham tuberculose pulmonar (Roberts e Bernard, 2015). Atualmente sabe-se que a deficiência da vitamina D está associada tanto a uma maior suscetibilidade à infecção por tuberculose como a um prognóstico mais negativo (Chandra *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Coussens *et al.*, 2012) e que a dieta influencia a expressão da doença porque o ferro e as proteínas são importantes para o funcionamento do sistema imunitário (Wilbur *et al.*, 2008).

O estudo de Mansukoski e Sparecello (2018) abre caminho para análises das propriedades estruturais dos ossos longos noutros indivíduos tais como na Coleção de Esqueletos Identificados da Universidade de Coimbra.

4.2 O que revelaram os estudos realizados ao agente patogénico?

Cerca de 95% dos indivíduos que tiveram tuberculose não apresentam alterações esqueléticas, em particular na fase inicial da doença, ou, caso possuam, podem não ser conclusivas porque não são patognomónicas (Roberts e Buikstra, 2003), daí a importância de se encontrar outras formas de identificar a doença. Para contornar esta situação as pesquisas, para além de incidirem sobre os hospedeiros, começaram a procurar o agente patogénico.

Na década de 1980, a paleopatologia ganhou uma nova ferramenta de diagnóstico pela identificação de **ADNa** (ADN antigo ou aDNA, *ancient deoxyribonucleic acid*) dos agentes patogénicos: a reação em cadeia de polimerase, conhecida pela sigla PCR (*polimerase chain reaction*) e, já no século XXI, começou o NGS. Outra abordagem para identificar o bacilo foi iniciada na década de 1990 e consiste na pesquisa por cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) de **ácidos micólicos** do envelope celular micobacteriano (Redman *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2015).

A tuberculose tem sido uma das doenças mais pesquisadas por análises biomoleculares na tentativa de verificar se os organismos do MTC estão presentes em esqueletos com lesões como as indicadas anteriormente procurando, assim, dar sustentabilidade aos diagnósticos macroscópicos. Convém, no entanto, enfatizar que a ausência de ADN dos micro-organismos, ou seja um resultado negativo, não implica que a pessoa não tenha sido afetada durante a sua vida pois, simplesmente, pode não ter sido preservado. Tal como na observação macroscópica, a ausência de evidência não é evidência de ausência. Por outro lado, um resultado positivo não informa se essa pessoa teve tuberculose latente, ativa ou curada. Outro problema, principalmente nos estudos iniciais com PCR, era o controlo da contaminação com ADN moderno e o facto da sequência usada para identificar o bacilo (p. ex., IS6110, *Insertion Sequence* ou *primer*) não ser específica da tuberculose humana e existir também em micobactérias do solo.

No que diz respeito a indivíduos com causa de morte registada, os estudos são reduzidos pela decisão dos curadores em manter a integridade dos esqueletos não autorizando técnicas destrutivas. Ainda assim foram realizados alguns trabalhos que se indicam em seguida.

Na década de 1990 foram executados testes com amostras de indivíduos da Coleção de Esqueletos Identificados da Universidade de Coimbra no sentido de investigar a eventual presença do ADNa e de ácidos micólicos do *M. tuberculosis*. Das 49 amostras analisadas, 24 eram de indivíduos com causa de morte tuberculose e destas em 22 (91,7%) foram identificados ácidos micólicos. Nos 25 indivíduos que constituíam o grupo de controlo, ou seja falecidos de doenças de origem não tuberculosa, 11 (44%) também obtiveram resultados positivos (Redman *et al.*, 2009). Esta pesquisa mostrou uma associação de 72% entre a presença de ácidos micólicos e a causa de morte, deixando a dúvida se alguns indivíduos teriam tuberculose, apesar de não registada. Em seis destes indivíduos foi pesquisado também ADNa, tendo havido coincidência de resultados apenas em três amostras (duas positivas e uma negativa). Nas restantes, duas foram negativas para o ADNa e positivas para os ácidos micólicos enquanto na terceira ocorreu o oposto.

Num estudo realizado em três indivíduos da Coleção Weisbach (Museu de História Natural de Viena), com causa de morte tuberculose e lesões inespecíficas, foram obtidos resultados positivos para a sequência de inserção IS6110, confirmando, assim, as suspeitas da

4|Qual o contributo das coleções osteológicas identificadas para o diagnóstico da paleotuberculose?

doença (Bachmann *et al.*, 2008). Mais recentemente, Giacon e Carrara (2014) testaram seis indivíduos da Coleção Tedeschi, quatro dos quais com ADN da micobactéria.

As análises de ADNa de *M. tuberculosis* não se efetuam somente no osso. Pela primeira vez a bactéria foi identificada no tártaro dentário de indivíduos da Coleção Anatômica de Esqueletos Huntington, dois dos quais não tinham lesões ou causa de morte tuberculose, demonstrando que este substrato é um bom reservatório (Young, 2017). Este trabalho apesar de inovador não permite saber se os indivíduos estariam doentes ou com infecção latente.

Por último, refere-se a investigação num indivíduo identificado, apesar de não integrar uma coleção esquelética. O corpo de Private William Braine, falecido, em 1846, durante a malograda expedição de John Franklin ao Ártico foi preservado no gelo durante 139 anos (Forst e Brown, 2017). Na autópsia foi sugerido tuberculose como causa de morte. No entanto, a pesquisa por NGS não identificou *M. tuberculosis* nem *Streptococcus pneumoniae* havendo, contudo, a considerar, como referem os autores, a hipótese de degradação do ADN nos vários locais em que esteve em estudo e armazenamento.

As análises paleomicrobiológicas estão a dar os primeiros passos na era NSG pelo que se prevê que futuramente possam esclarecer dúvidas relacionadas com os genes relacionados com a virulência das estirpes, determinem comorbilidades e coadjuvem no entendimento das migrações no passado (Donoghue, 2017).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta lição síntese dá a conhecer a tuberculose ao realizar um balanço dos conhecimentos obtidos em coleções osteológicas identificadas. Esses estudos confirmam que não existem lesões patognomónicas mas que há um conjunto de manifestações ósseas significativamente mais comuns em indivíduos com causa de morte tuberculose, designadamente na forma pulmonar.

No campo das análises biomoleculares, a possibilidade de pesquisa genética dos agentes patogénicos é um grande avanço metodológico que permitirá compreender a dispersão da doença pelo mundo e, certamente, trará novas informações difíceis de antecipar. Da parte do hospedeiro, poderá incluir o conhecimento sobre a dinâmica evolutiva dos genes responsáveis pela suscetibilidade à doença.

Apesar das limitações destas osteotecas, o seu potencial é enorme, havendo muitos campos de investigação a desenvolver e indivíduos e coleções por estudar, para que se conheça o percurso desta fascinante doença que acompanha a humanidade nas suas deambulações milenares pelos continentes.

BIBLIOGRAFIA

- Allison, M. J.; Gerzten, E.; Munizaga, J. H.; Santoro, C.; Mendoza, D. 1981. Tuberculosis in pre-Columbian Andean populations. *In: Buikstra, J. E. (Ed.). Prehistoric tuberculosis in the Americas.* Evanston, Northwestern University Archeological Program, p. 49-62.
- Allison, M. J.; Mendoza, D.; Pezzia, A. 1973. Documentation of a case of tuberculosis in pre-Columbian America. *American Review of Respiratory Diseases*, 107: 985-991.
- Anselmo, D.; Silva, F. C.; Fernandes, T. 2016. Characterization of hypertrophic osteoarthropathy in an identified skeleton from Évora, Portugal, using combined and comparative morphology and microscopy. *International Journal of Paleopathology*, 12: 11-16.
- Araújo, A. T. 1994. Origem e desenvolvimento da Pneumologia Portuguesa. *In: Araújo, A. T.; Freitas, M. G.; Pina, J. (Eds.). História da Pneumologia Portuguesa.* Lisboa, Sociedade Portuguesa de Pneumologia, p. 9-96.
- Ardagna, Y.; Bizot, B.; Boëtsch, G.; Delestre, X. (Eds.). 2006. *Les collections ostéologiques humaines: gestion, valorisation et perspectives.* Aix-en-Provence, Association Provence Archéologie.
- Assis, S. 2013. *Beyond the visible world: bridging macroscopic and paleohistopathological techniques in the study of periosteal new bone formation in human skeletal remains.* PhD Thesis. Coimbra, University of Coimbra.
- Assis, S.; 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.
- Assis, S.; Santos, A. L.; Roberts, C. 2011. Evidence of hypertrophic osteoarthropathy in individuals from the Coimbra Skeletal Identified Collection (Portugal). *International Journal of Paleopathology*, 1: 155-163.
- Aufderheide, A. C.; Rodríguez-Martín, C.; Langsjoen, O. 1998. *The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology.* Cambridge, Cambridge University Press.
- Bachmann, L.; Däubel, B.; Lindqvist, C.; Kruckenhauser, L.; Teschler-Nicola, M.; Haring, E. 2008. PCR diagnostics of *Mycobacterium tuberculosis* in historic human long bone remains from 18th century burials in Kaiserebersdorf, Austria. *BMC Research Notes*, 1: 83.
- Baker, O.; Lee, O. Y. C.; [...]; Dutour, O. 2015. Human tuberculosis predates domestication in ancient Syria. *Tuberculosis*, 95: S4–S12.
- Borowska-Strugiń, B.; Druszczyńska, M.; Lorkiewicz, W.; Szewczyk, R.; Ządzińska, E. 2014. Mycolic acids as markers of osseous tuberculosis in the Neolithic skeleton from Kujawy region (central Poland). *Anthropological Review*, 77: 137–149.
- Bos, K. I.; Harkins, K. M.; [...]; Krause, J. 2014. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*, 514: 494–497.

- Brazão, S. G.; Costa, R.; Albano, M. N.; Jesus, N.; Carvalho, A. 2019. Breast lump: A rare presentation of tuberculosis in an elderly man. *European Journal of Case Reports in Internal Medicine*, 6: [s.num.].
- Brites, D.; Gagneux, S. 2012 Old and new selective pressures on *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 678-685.
- Brosch, R.; Gordon, S.V.; Marmiesse, M.; Brodin, P.; Buchrieser, C.; Eiglmeier, K.; Garnier, T.; Gutierrez, C.; Hewinson, G.; Kremer, K.; Parsons, L. M. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 3684-3689.
- Buckley, H. R.; Tayles, N.; Halcrow, S. E.; Robb, K.; Fyfe, R. 2010. The people of Wairau Bar: a re-examination. *Journal of Pacific Archaeology*, 1: 1-20.
- Burke, S. D. A. 2011. Tuberculosis: past and present. *Reviews in Anthropology*, 40: 27-52.
- Campbell, T. 2019. *Investigating the emergence and spread of tuberculosis in South Africa*. PhD Thesis. Cape Town, University of Cape Town.
- Canci, A.; Minozzi, S. Y; Borgognini-Tarli, S. 1996. New evidence of tuberculous spondylitis from Neolithic Liguria (Italy). *International Journal of Osteoarchaeology*, 6: 497–501.
- Cardoso, H. F.; Marinho, L.; Caldas, I. M.; Puentes, K.; Andrade, M.; Toso, A.; Assis, S.; Magalhães, T. 2020. Historical, demographic, curatorial and legal aspects of the BoneMedLeg human skeletal reference collection (Porto, Portugal). *Anthropologischer Anzeiger*, 77: 57-73.
- Carvalho, M. V. D.; Lira, V. F.; do Nascimento, E. A.; Kobayashi, S. B. T.; de Araújo, L. F.; de Almeida, A. C.; Petraki, G. G. P.; Cunha, E.; Soriano, E. P. 2020. New acquisitions of a contemporary Brazilian Identified Skeletal Collection. *Forensic Science International: Reports*, 2: 100050.
- Chandra, G.; Selvaraj, P.; Jawahar, M. S.; Banurekha, V. V.; Narayanan, P. R. 2004. Effect of vitamin D3 on phagocytic potential of macrophages with live *Mycobacterium tuberculosis* and lympho proliferative response in pulmonary tuberculosis. *Journal Clinical Immunology*, 24: 249-257.
- Christensen, T.; Martínez-Lavín, M.; Pineda, C. 2011. Periostitis and osteolysis in a Medieval skeleton from South-West Hungary: (leprosy, treponematosi, tuberculosis or hypertrophic osteoarthropathy) a diagnostic challenge!. *International Journal of Osteoarchaeology*, 23: 69-82.
- Cole, S. T.; Brosch, R.; [...]; Barrell, B. G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537-544.
- Comas, I.; Coscolla, M.; Luo, T.; Borrell, S.; Holt, K.E.; Kato-Maeda, M.; Parkhill, J.; Malla, B.; Berg, S.; Thwaites, G.; Yeboah-Manu, D. et al., 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics*, 45(10): 1176-1182.
- Coussens, A. K.; Wilkinson, R. J.; [...]; Martineau, A. R. 2012. Vitamin D accelerates resolution of inflammatory responses during tuberculosis treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 15449-15454.

- Cunha, E. 1995. Testing identification records: evidence from the Coimbra identified skeletal collections (nineteenth and twentieth centuries). *In: Saunders, S. R.; Herring, A. (Eds.). Grave reflections portraying the past through cemetery studies.* Toronto, Canadian Scholars' Press, p. 179-198.
- Cunha, E.; Lopez-Capp, T. T.; [...]; Soriano, E. A. 2018. The Brazilian identified human osteological collections. *Forensic Science International*, 289: 449-e1-449.e6.
- Cunha, E.; Wasterlain, S. 2007. The Coimbra identified skeletal collections. *In: Grupe, G.; Peters, J. (Eds.). Skeletal series and their socio-economic context.* Verlag, Documenta Archaeobiologiaeachen, p. 23-33.
- Davies-Barrett, A. M.; Antoine, D.; Roberts, C. A. 2019. Inflammatory periosteal reaction on ribs associated with lower respiratory tract disease: A method for recording prevalence from sites with differing preservation. *American Journal of Physical Anthropology*, 168: 530-542.
- de la Cova, C. 2011. Race, health, and disease in 19th-century-born males. *American Journal of Physical Anthropology*, 144: 526-537.
- DGS. 2018. *Tuberculose em Portugal: desafios e estratégias.* Lisboa, Direção-Geral da Saúde.
- Dheda, K.; Migliori, G. B. 2012. The global rise of extensively drug-resistant tuberculosis: is the time to bring back sanatoria now overdue? *The Lancet*, 379: 773-775.
- Donoghue, H. D. 2017. Insights gained from ancient biomolecules into past and present tuberculosis - a personal perspective. *International Journal of Infectious Diseases*, 56: 176-180.
- Donoghue, H. D.; Spigelman, M.; Zias, J.; Gernaey-Child, A. M.; Minnikin, D. E. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 265-269.
- Esteves, S.; Catarino, I.; Lopes, D.; Sousa, C. 2017. Spinal tuberculosis: Rethinking an old disease. *Journal of Spine*, 6: 1.
- Etxeberria, F.; Pla, K. 2014. *El fuerte de San Cristóbal en la memoria: de prisión a sanatorio penitenciario.* Arre, Pamilea.
- Eyler, W. R.; Monsein, L. H.; Beute, G.H.; Tilley, B.; Schultz, L. R.; Schmitt, W. G. H. 1996. Rib enlargement in patients with chronic pleural disease. *American Journal of Roenthenology*, 167: 921-926.
- Fernandes, T.; Granja, R.; Thillaud, P. L. 2014. Spectrometric analysis and scanning electronic microscopy of two pleural plaques from mediaeval Portuguese period. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 20: 260-263.
- Ferreira, M. T.; Vicente, R.; Navega, D.; Gonçalves, D.; Curate, F.; Cunha, E. 2014. A new forensic collection housed at the University of Coimbra, Portugal: The 21st century identified skeletal collection. *Forensic Science International*, 245: 202.e1-202.e5.

- Formicola, V.; Milanese, Q. Y.; Scarsini, C. 1987. Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millennium B.C. from Arene Candide Cave (Liguria, Italy). *American Journal of Physical Anthropology*, 72: 1-6.
- Forst, J.; Brown, T. A. 2017. A case study: Was Private William Braine of the 1845 Franklin Expedition a victim of tuberculosis? *Arctic*, 70: 381-388.
- Gagneux, S. 2012. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367: 850-859.
- Gagneux, S.; DeRiemer, K.; Van, T.; Kato-Maeda, M.; de Jong, B. C.; Narayanan, S.; Nicol, M.; Niemann, S.; Kremer, K.; Gutierrez, M. C.; Hilty, M.; Hopewell, P. C.; Small, P. M. 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 2869-2873.
- Giacon, M.; Carrara, N. 2014. Paleopatologia nella Collezione Osteologica del Museo di Antropologia dell'Università di Padova: tecniche di indagine nei casi di tubercolosi. *Museologia Scientifica Memorie*, 11: 136-139.
- Gladykowska-Rzeczycka, J. 1999. Tuberculosis in the past and present in Poland. In: Pálfi, G.; Dutour, O.; Deák, J.; Hutás, I. (Eds.). *Tuberculosis: past and present*. Budapest-Szeged, Golden Book Publishers and Tuberculosis Foundation, p. 561-576.
- Goldenberg, D. L. 1998. Septic arthritis. *The Lancet*, 351: 197-202.
- Gooderham, E.; Marinho, L.; Spake, L.; Fisk, S.; Prates, C.; Sousa, S.; Oliveira, C.; Santos, A. L.; Cardoso, H. F. V. [em revisão]. Severe skeletal lesions, osteopenia and growth deficit in a child with pulmonary tuberculosis (mid-20th century, Portugal). *International Journal of Paleopathology*,
- Guttentag, A. R.; Salwen, J. K. 1999. Keep your eyes on the ribs: the spectrum of normal variants and diseases that involve the ribs. *Radiographics*, 19: 1125-1142.
- Henderson, C. Y.; Alves-Cardoso, F. 2018. *Identified skeletal collections: testing ground of anthropology*. Oxford, Archaeopress.
- 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.
- Hershkovitz, I.; Greenwald, C. M.; Latimer, B.; Jellema, L. M.; Wish-Baratz, S.; Eshed, V.; Dutour, O.; Rothschild, B. M. 2002. Serpens endocrania symmetrica (SES): a new term and a possible clue for identifying intrathoracic disease in skeletal populations. *American Journal of Physical Anthropology*, 118: 201-216.
- Holloway K.L.; Henneberg, R.J.; De Barros Lopes, M.; Henneberg, M. 2011. Evolution of human tuberculosis: A systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence. *Journal of Comparative Human Biology*, 62: 402-458.

- Holloway, K. L.; Link, K.; Rühli, F.; Henneberg, M. 2013. Skeletal lesions in human tuberculosis may sometimes heal: An aid to palaeopathological diagnoses. *PLoS ONE*, 8: e62798.
- Hopewell, P. 1994. Overview of clinical tuberculosis. In: Bloom, B. (Ed.). *Tuberculosis: pathogenesis, and control*. Washington, ASM Press, p. 25-46.
- Kass, S. M.; Williams, P. M.; Reamy, B. V. 2007. Pleurisy. *American Academy of Family Physicians*, 75: 1357-1364.
- Kelley, M. A.; Micozzi, M. S. 1984. Rib lesions in chronic pulmonary tuberculosis. *American Journal of Physical Anthropology*, 65: 381–386.
- Koch, R. 1982 [1882]. The etiology of tuberculosis [Translation of the German]. *Reviews of Infectious Disease*, 4: 1270-1274.
- Lee, O. Y.; Wu, H. H.; Besra, G. S.; Rothschild, B. M.; Spigelman, M.; Hershkovitz, I.; Bar-Gal, G. K.; Donoghue, H. D.; Minnikin, D. E. 2015. Lipid biomarkers provide evolutionary signposts for the oldest known cases of tuberculosis. *Tuberculosis*, 95: S127-32.
- Lepierre, C. 1909. A questão do dualismo na tuberculose. *IV Congresso da Liga Nacional contra a tuberculose*, Porto-Abril 1907. Coimbra, Imprensa Académica, p. 1-42.
- Liu, P.; Stenger, S.; [...]; Modlin, R. 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311: 1770–1773.
- Locke, E. A. 1915. Secondary hypertrophic osteo-arthropathy and its relation to simple club-fingers. *Archives of Internal Medicine*, 15: 659-713.
- Lönnroth, K.; Jaramillo, E.; Williams, B. G.; Dye, C.; Raviglione, M. 2009. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Social Science & Medicine*, 68: 2240-2246.
- Lopes, C. 2014. *As mil caras de uma doença - sífilis na sociedade Coimbrã no início do século XX. Evidências históricas e paleopatológicas nas Coleções Identificadas de Coimbra*. Tese de doutoramento em Antropologia. Coimbra, Universidade de Coimbra.
- Luna, L.; Aranda, C.; Santos, A. L.; Donoghue, H.; Minnikin, D.; Lee, O.; Wu, H.; Ratto, N. 2018. El hallazgo más antiguo de *Mycobacterium tuberculosis* complex en Argentina: evaluación macroscópica, radiográfica, molecular y química de un individuo adulto joven. In: Marques, C.; Lopes, C.; Cortesão Silva, F.; Curate, F.; Leandro, I.; Oliveira-Santos, I.; Assis, S.; Matos, V. (Eds.). *VI Jornadas Portuguesas de Paleopatologia: a saúde e a doença no passado - programa-resumos*. Coimbra, Universidade de Coimbra, Centro de Investigação em Antropologia e Saúde, p. 45.
- Mansukoski, L.; Sparecello, V. S. 2018. Smaller long bone cross-sectional size in people who died of tuberculosis: Insights on frailty factors from a 19th and early 20th century Finnish population. *International Journal of Paleopathology*, 20: 38-44.
- Mariotti, V.; Zuppello, M.; Pedrosi, M. E.; Bettuzzi, M.; Brancaccio, R.; Peccenini, E.; Morigi, M. P.; Belcastro, M. G. 2015. Skeletal evidence of tuberculosis in a modern identified human skeletal

- collection (Certosa cemetery, Bologna, Italy). *American Journal of Physical Anthropology*, 157: 389-401.
- Martínez-Lavín, M.; Matucci-Cerinic, M.; Jajic, I. Y.; Pineda, C. 1993. Workshop report: hypertrophic osteoarthropathy, a consensus on its definition, classification, assessment and agnostic criteria. *Journal of Rheumatology*, 20: 1386-1387.
- Martins, C. 2012. *A tuberculose como um “mal social” em pleno século XXI: a perspetiva dos doentes e as dificuldades no controlo da enfermidade em Coimbra*. Dissertação de Mestrado em Antropologia Médica. Coimbra, Universidade de Coimbra.
- Masson, M.; Bereczki, Z.; Molnár, E.; Donoghue, H. D.; Minnikin, D. E.; Lee, O. 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.
- Matos, V.; Santos, A. L. 2013. Os bons ares do barrocal algarvio: a tuberculose em ferroviários internados no Sanatório Carlos Vasconcelos Porto. In: Mendes, A. R.; Oliveira, A. P. D.; Santos C. F. (Eds.). *Contributos para a história da saúde no Algarve. Promontoria Monográfica: História do Algarve 01*, p. 193-209.
- Matos, V.; Santos, A. L. 2015. Trends in mortality from pulmonary tuberculosis before and after the medical use of antibiotics: archival evidence from the Portuguese sanatorium Carlos Vasconcelos Porto (1918-1991). *Tuberculosis*, 95: S101-104.
- Matos, V.; Santos, A. L. 2006. On the trail of pulmonary tuberculosis based on rib lesions: results from the Human Identified Skeletal Collection from the Museu Bocage (Lisbon, Portugal). *American Journal of Physical Anthropology*, 130: 190-200.
- Mousa, H. A., 2007. Bones and joints tuberculosis. *Bahrain Medical Bulletin*, 29: 1-9.
- Murphy, E. M.; Chistov, Y. K.; Hopkins, R.; Rutland, P.; Taylor, G. M. 2009. Tuberculosis among Iron Age individuals from Tyva, South Siberia: palaeopathological and biomolecular findings. *Journal of Archaeological Science*, 36: 2029–2038.
- Nelson, E. A.; Buikstra, J. E.; Herbig, A.; Tung, T. A.; Bos, K. I. [no prelo]. Advances in the molecular detection of tuberculosis in pre-contact Andean South America. *International Journal of Paleopathology*, <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2019.12.006>
- Nicklisch, N.; Maixner, F.; Ganslmeier, R.; Friederich, S.; Dresely, V.; Meller, H.; Zink, A.; Alt, K. W. 2012. Rib lesions in skeletons from early Neolithic sites in Central Germany: on the trail of tuberculosis at the onset of agriculture. *American Journal of Physical Anthropology*, 149: 391-404.
- Ortner, D. J. 2003. *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. New York, Elsevier Science/Academic Press.
- Ortner, D. J.; Frohlich, B. 2008. *The Early Bronze Age I tombs and burials of Bab edh-Dhra, Jordan*. Lanham, Rowman & Littlefield.

- Pálfi, G.; Bereczki, Z.; Ortner, D. J.; Dutour, O. 2012. Juvenile cases of skeletal tuberculosis from the Terry Anatomical collection (Smithsonian Institution, Washington, DC, USA). *Acta Biologica Szegediensis*, 56: 1-12.
- Pearlstein, K. E. 2015. *Health and the huddled masses: An analysis of immigrant and Euro-American skeletal health in 19th century New York City*. PhD Thesis. Washington, D. C., American University.
- Pechenkina, E. A.; Benfer, R. A. Jr. ; Ma, X. 2007. Diet and health in the Neolithic of the Wei and Middle Yellow River Basins, Northern China. In: Cohen, M. N.; Crane-Kramer, G. N. M. (Eds.). *Ancient health: skeletal indicators of agricultural and economic intensification*. Gainesville, University of Florida Press, p. 255–272.
- Pedersen, D. D.; Milner, G. R.; Kolmos, H. J.; Boldsen, J. L. 2019. The association between skeletal lesions and tuberculosis diagnosis using a probabilistic approach. *International Journal of Paleopathology*, 27: 88-100.
- Ponnuswamy, A. 2014. Clinical tuberculosis. In: Davies, P. D. O.; Gordon, S. B.; Davies, G. (Eds.). *Clinical tuberculosis*. London, CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 129-150.
- Porter, R. 1996. *The Cambridge illustrated history of medicine*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Quigley, C. 2001. *Skulls and skeletons: Human bone collections and accumulations*. Jefferson, McFarland and Company.
- 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.
- Resnick, D. Y.; Kransdorf, M. J. 2005. *Bone and joint imaging*. Philadelphia, Elsevier Science Health Science Division.
- Resnick, D.; Niwayama, G. 1995. *Diagnosis of bone and joint disorders*. Philadelphia, WB Saunders.
- Roberts, C. A.; Bernard, M.-C. 2015. Tuberculosis: A biosocial study of admissions to a children's sanatorium (1936-1954) in Stannington, Northumberland, England. *Tuberculosis*, 95: S105-S108.
- Roberts, C. A.; Buikstra, J. E. 2003. *The bioarchaeology of tuberculosis: a global perspective on a re-emerging disease*. Gainesville, University Press of Florida.
- Roberts, C. A.; Buikstra, J. E. 2019. Bacterial infection. In: Buikstra, J. E. (Ed.). *Ortner's identification of pathological conditions in human skeletal remains*. London, Elsevier - Academic Press, p. 321-440.
- Roberts, C. A.; Lucy, D. Y.; Manchester, K. 1994. Inflammatory lesions of ribs: an analysis of the Terry Collection. *American Journal of Physical Anthropology*, 95: 169–182.
- Rocha, M. A. 1995. Les collections ostéologiques humaines identifiées du Musée Anthropologique de l'Université de Coimbra. *Antropologia Portuguesa*, 13: 7-38.
- Rothschild, B. M.; Rothschild, C. 1998. Recognition of hypertrophic osteoarthropathy in skeletal remains. *Journal of Rheumatology*, 25: 2221-2227.

- Sable, S. B.; Posey, J. E.; Scriba, T. J. 2019. Tuberculosis vaccine development: Progress in clinical evaluation. *Clinical Microbiology Reviews*, 33: e00100-19.
- Salo, W. L.; Aufderheide, A. C.; Buikstra, J. E.; Holcomb, T. A. 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian Mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 2091-2094.
- Santos, A. L. 1999. TB files: new Hospital data (1910-1936) on the Coimbra Identified Skeletal Collection. In: Pálfi, G; Dutour, O.; Deák, J.; Hutás, I. (Eds.). *Tuberculosis Past and Present*. Szeged, Golden Book Publisher Ltd., Tuberculosis Foundation, p. 127-134.
- Santos, A. L. 2000. *A skeletal picture of tuberculosis: macroscopic, radiological, biomolecular, and historical evidence from the Coimbra identified skeletal collection*. PhD Thesis. Coimbra, Universidade de Coimbra.
- Santos, A. L. 2004. Modern cases old diseases: anthropological study of three male skeletons from Mozambique. In: Sanogo K.; Togola T. (Eds). *Proceedings of the 11th Congress of the PanAfrican Association for Prehistory and Related Studies*. Bamako, Institute des Sciences Humaines, p. 412-420.
- Santos, A. L. 2015. Archives and Skeletons: An interdisciplinary approach to the study of paleopathology of tuberculosis. *Tuberculosis*, 95: S109-S111.
- Santos, A. L. 2018a. Introdução. In: Cunha, N. F. (Coord.). *Bernardino Machado: homem da ciência, também professor de Antropologia*. Vila Nova de Famalicão, Câmara Municipal de Vila Nova de Famalicão, Museu Bernardino Machado, p. 9-14.
- Santos, A. L. 2018b. Skulls and skeletons from documented, overseas and archaeological excavations: Portuguese trajectories. In: O'Donnabhain, B.; Lozada, M. (Eds.). *Archaeological Human Remains: Legacies of Imperialism, Communism and Colonialism*. Cham, Springer, p. 111-125.
- Santos, A. L. 2020. Un patrimonio particular: la importancia de las colecciones osteológicas identificadas. *Mètode Science Studies Journal*, 101: 65-71.
- Santos, A. L.; Matos, V. M. J. 2019. Contribution of paleopathology to the knowledge of the origin and spread of tuberculosis: evidence from Portugal. *Antropologia Portuguesa*, 36: 73-91.
- Santos, A. L.; Roberts, C. 2001. A picture of tuberculosis in young Portuguese people in the earlier 20th century: a multidisciplinary study of the skeletal and historical evidence. *American Journal of Physical Anthropology*, 115: 38-49.
- Santos, A. L.; Roberts, C. 2006. Anatomy of a serial killer: differential diagnosis of tuberculosis based on rib lesions of adult individuals from the Coimbra Identified Skeletal Collection, Portugal. *American Journal of Physical Anthropology*, 130: 38-49.
- Santos, A. L.; Suby, J. A. 2012. Tuberculosis en retrospectiva: revisión de los conocimientos actuales y su aplicación en el estudio de restos humanos. *Cuadernos de Prehistoria y Arqueología de la Universidad de Granada*, 22: 127-148.

- Silva, A. M. D. da; Marques, A. 2019. S. Jacinto Ward and the assistance to tuberculosis patients by the Third Venerable Order of St. Francis' Penance of Coimbra (1908-1944). *Antropologia Portuguesa*, 36: 27-46.
- Smith, N. H.; Hewinson, R.G.; Kremer, K.; Brosch, R.; Gordon, S. V. 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 537-544.
- Spake, L.; Cardoso, H. F. 2019. Indirect evidence for biological mortality bias in growth from two temporo-spatially distant samples of children. *Anthropologischer Anzeiger*, 76: 379-390.
- Sparacello, V. S.; Roberts, C. A.; Kerudin, A.; Müller, R. 2017. A 6500-year-old Middle Neolithic child from Pollera Cave (Liguria, Italy) with probable multifocal osteoarticular tuberculosis. *International Journal of Paleopathology*, 17: 67-74.
- Spekker, O. 2018. *Evaluation of endocranial bony changes in relation to tuberculosis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection (Washington, DC, USA)*. PhD Thesis. Szeged, University of Szeged.
- Spekker, O.; Hunt, D. R.; Váradi, O. A.; Berthon, W.; Molnár, E.; Pálfi, G. 2018. Rare manifestations of spinal tuberculosis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection (National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA). *International Journal of Osteoarchaeology*, 28: 343-353.
- Spekker, O.; Pálfi, G.; Kozocsay, G.; Pósa, A.; Bereczki, Z.; Molnár, E. 2012. New cases of probable skeletal tuberculosis from the Neolithic period in Hungary: a morphological study. *Acta Biologica Szegediensis*, 56: 115–123.
- Steyn, M.; Buskes, J. 2016. Skeletal manifestations of tuberculosis in modern human remains. *Clinical Anatomy*, 29: 854-861.
- Steyn, M.; Scholtz, Y.; Botha, D.; Pretorius, S. 2013. The changing face of tuberculosis: trends in tuberculosis-associated skeletal changes. *Tuberculosis*, 93: 467-474.
- Stone, A. C.; Wilbur, A. K.; Buikstra, J. E.; Roberts, C. A., 2009. Tuberculosis and leprosy in perspective. *Yearbook of Physical Anthropology*, 52: 66-94.
- Suzuki, T.; Fujita, H.; Choi, J. G. 2008. Brief communication: new evidence of tuberculosis from Prehistoric Korea - Population movement and early evidence of tuberculosis in Far East Asia. *American Journal of Physical Anthropology*, 136: 357–360.
- Suzuki, T.; Inoue, T. 2007. Earliest evidence of spinal tuberculosis from the Aneolithic Yayoi period in Japan. *International Journal of Osteoarchaeology*, 17: 392–402.
- Talat, N.; Perry S.; Parsonnet, J.; Dawood, G.; Hussain, R. 2010. Vitamin D deficiency and tuberculosis progression. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 853-855.
- Tayles, N.; Buckley, H. R. 2004. Leprosy and tuberculosis in Iron Age Southeast Asia? *American Journal of Physical Anthropology*, 125: 239–256.
- Teo, H. E. L.; Peh, W. C. G. 2004. Skeletal tuberculosis in children. *Pediatric Radiology*, 34: 853-860.

- Tiemersma, E. W.; van der Werf, M. J.; Borgdorff, M. W.; Williams, B. G.; Nagelkerke, N. J. 2011. Natural History of Tuberculosis: Duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PLoS ONE*, 6: e17601.
- Tremblay, D. L. 1997. A germ's journey to isolated islands. *International Journal of Osteoarchaeology*, 7: 621-624.
- Ubelaker, D. H. 2014. Osteology reference collections. In: Smith, C. (Ed.). *Encyclopedia of Global Archaeology*. New York, Springer-Verlag, p. 5632-5641.
- Umbelino, C.; Santos, A. L. 2011. Portugal. In: Márquez-Grant, N.; Fibiger, L. (Eds). *The Routledge handbook of archaeological human remains and legislation: an international guide to laws and practice in the excavation and treatment of archaeological human remains*. London, Routledge, p. 341-352.
- Umbelino, C.; Santos, A. L.; Assis, S. 2012. Beyond the cause of death: other pathological conditions in a female individual from the Coimbra Identified Skeletal Collection. *Anthropological Science*, 120: 73-79.
- Veiga, A. M. C. C. 2016. *Controlo da tuberculose em Portugal continental: estudo do insucesso terapêutico e dos seus factores nos doentes pulmonares para optimização do Programa Nacional*. Doutoramento em Saúde Pública. Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.
- Wallis, R. S.; Pai, M.; Menzies, D.; Doherty, T. M.; Walzl, G.; Perkins, M. D.; Zumla, A. 2010. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *The Lancet*, 375: 1920-1937.
- Weston, D. A. 2012. Nonspecific infection in paleopathology: Interpreting periosteal reactions. In: Grauer, A. L. (Ed.). *A Companion to Paleopathology*. Chichester, Wiley, p. 492-512.
- WHO. 2019. *Global Tuberculosis Report*. Geneva, World Health Organization.
- Wilbur, A. K.; Buikstra, J. E. 2006. Patterns of tuberculosis in the Americas: How can modern biomedicine inform the ancient past? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 59-66.
- Wilbur, A. K.; Farnbach, A. W.; Knudson, K. J.; Buikstra, J. E. 2008. Diet, tuberculosis, and the paleopathological record. *Current Anthropology*, 49: 963-991.
- Wood, J. W., Millner, G. R., Harpending, H. C.; Weiss, K. M. 1992. The osteological paradox: problems of inferring prehistoric health from skeletal samples. *Current Anthropology*, 33: 343-369.
- Yap, F. Y.; Skalski, M. R.; Patel, D. B.; Schein, A. J.; White, E. A.; Tomasian, A.; Masih, S.; Matcuk Jr, G. R. 2017. Hypertrophic osteoarthropathy: clinical and imaging features. *Radiographics*, 37: 157-195.
- Young, S. 2017. *Please forget to floss: Developing an assay for identifying tuberculosis in dental calculus from the Smithsonian's Huntington Collection (1893-1921)*. Syracuse University Honors Program Capstone Projects. 1006.