

Articoli/Articles

DNA ANTICO: PRINCIPI E METODOLOGIE

FLAVIO DE ANGELIS, GABRIELE SCORRANO, OLGA RICKARDS

Centro di Antropologia Molecolare per lo Studio
del DNA Antico- Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma, I

SUMMARY

ANCIENT DNA: PRINCIPLES AND METHODOLOGIES

Paleogenetics is providing increasing evidence about the biological characteristics of ancient populations. This paper examines the guiding principles and methodologies to the study of ancient DNA with constant references to the state of the art in this fascinating discipline.

La storia della paleogenetica, seppur affascinante, ha origini relativamente recenti. I primi tentativi, effettuati utilizzando cloni batterici, di amplificare tracce di materiale genetico da frammenti tissutali mummificati non vanno oltre gli inizi degli anni 80^{1,2,3}. Da questi primi esperimenti, molti risultati sono venuti alla luce evidenziando molteplici aspetti dell'analisi molecolare: infatti attraverso lo studio del DNA recuperato da materiale biologico di campioni antichi è possibile indagare in profondità la variabilità genetica umana e i processi che la sottendono. Cospicue infatti sono le pubblicazioni relative alle relazioni filogenetiche tra *Homo neandertalensis* e la nostra specie^{4,5} così come alle analisi delle dinamiche popolazionistiche e alla struttura sociale di nuclei arcaici^{6,7}. Ma lo studio della paleogenetica è un utile strumento anche per indagare processi

Key words: aDNA – Paleogenetics – Molecular anthropology

evoluzionistici⁸ e per ricostruire le caratteristiche fenotipiche di popolazioni antiche^{9,10,11}. Inoltre, notevoli sono stati, negli anni, gli sviluppi della Paleogenomica, cioè la ricostruzione degli interi genomi di specie estinte¹². Oggetto delle ricerche molecolari è il DNA antico (*ancient DNA*, aDNA), residui di materiale genetico che possono essere recuperati da una grande varietà di materiali biologici, di diversa origine, stato di conservazione ed età, come ossa, denti, coproliti¹³, corpi mummificati, sangue coagulato, frammenti vegetali e microrganismi. Anche tessuti molli possono comunque essere una fonte di aDNA in cui analizzare notevoli porzioni di genoma¹⁴; e persino elementi cheratinici come le unghie¹⁵ possono essere utilizzati come fonte primaria di aDNA. Diverse sono le fonti cellulari di tale materiale genetico, essendo il genoma costituito da varie frazioni compartimentalizzate. Se da una parte la genomica generalmente descrive la variabilità del genoma nucleare di un dato organismo, la paleo-genetica utilizza un secondo marcatore di elezione per lo studio della variabilità eucariotica, il DNA contenuto in organelli intracellulari quali i mitocondri¹⁶ e, seppur meno frequentemente, i plastidi delle cellule vegetali¹⁷. Infatti, il DNA mitocondriale, essendo presente in numerose copie (da centinaia a migliaia di copie per cellula¹⁸ rispetto alle sole due copie di genoma nucleare, risulta facilmente analizzabile in reperti antichi¹⁹. Tuttavia, lo studio del aDNA, soprattutto per quanto riguarda la specie umana, è soggetto a sostanziali limitazioni dovute alla presenza di materiale genetico moderno. Il DNA moderno, infatti, è presente in un più elevato numero di copie rispetto al materiale genetico endogeno del campione in esame, essendo quest'ultimo esposto a deterioramento diagenetico. Tale condizione rende quindi gli studi del aDNA estremamente impegnativi a causa della contaminazione da materiale moderno. La natura del campione biologico riflette in parte la qualità del materiale genetico ricavabile: infatti, se ossa e denti sono tessuti facilmente preservati per la loro natura calcificata, essi appaiono maggiormente

contaminabili rispetto ai capelli, che tuttavia sono meno presenti nel record archeologico²⁰. Il rinvenimento di falsi positivi rimane ancora oggi una delle maggiori problematiche della ricerca basata sull'analisi del aDNA. Non pochi sono gli studi che storicamente hanno evidenziato risultati a dir poco sorprendenti come frammenti genetici ricavati da elementi scheletrici fossilizzati pertinenti a dinosauri²¹ o a partire da insetti inclusi in materiale organico^{22,23}. Tuttavia, molto spesso la rianalisi di tali dati²⁴ ha permesso di correggere sostanziali errori che hanno reso, perciò, gli albori della paleogenetica antica, come uno dei terreni più fertili per le stravaganze scientifiche.

Non meno importante è il problema della conservazione del reperto. Infatti, l'estrazione di DNA comporta la distruzione, seppur minima, di materiale biologico per cui è bene scegliere parti, per esempio, dello scheletro, di scarsa importanza per lo studio antropometrico oppure ricavare la quantità necessaria operando carotaggi di pochi millimetri di diametro in zone tali da non compromettere la successiva analisi morfologica²⁵. Nonostante queste precauzioni nel campionamento, alcuni ricercatori sono restii ad applicare analisi genetiche su esemplari antichi per non compromettere l'integrità delle collezioni. La tematica in questione viene ad assumere importanza anche nei casi in cui la comunità odierna presso la quale un reperto è conservato riconosca al record archeologico una relazione culturale, come nel caso di discendenza biologica: difficilmente quindi permetterà l'analisi distruttiva di frammenti appartenenti ai loro antenati^{26,27}. Per tali ragioni sarebbe estremamente utile riuscire a estrarre aDNA attraverso processi mini-invasivi ovvero utilizzando metodiche che non comportino la distruzione del materiale biologico. Attualmente si stanno elaborando dei protocolli che prevedono l'estrazione del DNA in fase liquida²⁸. Questi metodi non compromettono l'integrità del reperto in quanto possono produrre alterazioni chimiche con conseguenti modificazioni fisiche che non sono però rilevabili macroscopicamente.

Nelle cellule l'integrità delle molecole di acido nucleico è mantenuta da complessi sistemi enzimatici che dopo la morte non garantiscono ulteriormente la loro attività funzionale²⁹. In tal modo, il DNA è soggetto a danneggiamenti da parte di fattori esogeni quali attacchi batterici o fungini che ne limitano la preservazione³⁰. Da qui è comprensibile la notevole difficoltà di reperire materiale genetico endogeno da campioni antichi, seppure tale scopo possa essere raggiunto in modo relativamente agevole nei rari casi in cui il materiale biologico risulti essere stato soggetto a rapido disseccamento o a fenomeni di assorbimento su matrici mineralizzate³¹. Un altro fattore che sembra influenzare positivamente la conservazione del aDNA è la bassa temperatura³². Infatti, le analisi dei reperti più antichi si riferiscono a campioni biologici non umani provenienti da regioni sub-artiche; in particolare, le ossa preservate nel permafrost si sono dimostrate idonee al recupero di aDNA permettendo l'amplificazione di frammenti lunghi dalle 100 alle 900 bp^{33,34}. Diversi studi hanno altresì proposto come le dimensioni medie dei frammenti non possano eccedere le 100-500 bp e che non possa essere recuperato DNA da reperti che eccedano il milione di anni, anche in condizioni climatiche tra le più favorevoli³⁵.

Fondamentale per gli studi del aDNA è stata l'invenzione della metodica della polimerizzazione a catena (Polymerase Chain Reaction, PCR)³⁶, mediante la quale è possibile amplificare selettivamente tratti di DNA. Tecnicamente, la PCR è un metodo di clonaggio di DNA che non prevede l'utilizzo di vettori, cosa precedentemente indispensabile per amplificare tratti di materiale genetico³⁷. Questo metodo permette la selezione rapida, l'isolamento e l'amplificazione in vitro di qualsiasi tratto di DNA di cui siano note le estremità al 5' ed al 3' della molecola: ciò avviene grazie all'utilizzo di una DNA polimerasi termostabile (*Taq polimerasi*), isolata dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*, e di due sequenze oligonucleotidiche lunghe 18-25 paia di basi (*base pairs* o bp), dette *primers*, com-

plementari alle regioni fiancheggianti il segmento di interesse. La metodica prevede la ripetizione ciclica di temperature in 3 fasi principali: denaturazione del DNA originale, appaiamento dei *primers* alle regioni fiancheggianti e allungamento del filamento a partire dai *primers* sullo stampo fornito dal DNA originale. Nello specifico, la denaturazione prevede una temperatura elevata (in genere 94°C-96°C) per far avvenire la separazione dei due filamenti della doppia elica del genoma che si intende analizzare; a questa segue la fase di allineamento in cui la temperatura viene diminuita al fine di permettere l'appaiamento tra gli oligonucleotidi e il *template* secondo la regola che una purina sarà complementare a una pirimidina (la guanina alla citosina; mentre l'adenina alla timina). La fase finale di estensione avviene a una temperatura di 72°C-74°C, in cui l'enzima raggiunge la massima efficienza. È stato provato che a questa temperatura la polimerasi lega da 35 a 100 nucleotidi al secondo, perciò, in un minuto si possono amplificare almeno 2000 basi. Il numero di cicli varia tra i 25 e 40, in relazione alle molecole di DNA bersaglio iniziali³⁸. Il risultato finale è un accumulo esponenziale di copie del DNA stampo dell'ordine di 2^n (con n uguale al numero di cicli eseguiti). L'ottenimento di numerose copie di uno stesso segmento genetico di per sé non consente l'analisi della variabilità genetica. Infatti, tale processo è solo la prima fase dell'esperimento: le molecole ottenute devono essere quindi processate al fine di identificare l'esatta sequenza delle basi costituenti il filamento di DNA³⁹. Inoltre, nello studio del aDNA è sicuramente consigliabile non fermarsi al sequenziamento diretto dei prodotti di PCR ma è fondamentale procedere al clonaggio dei vari amplificati e sequenziare più ampliconi. L'analisi di questi permette di discriminare tra le mutazioni presenti in tutte le sequenze da quelle che si verificano solo occasionalmente in uno o pochi cloni. Tale presupposto consente di distinguere la contaminazione da DNA esogeno umano, artefatti derivanti da lesioni al DNA e anche errori della *Taq polimerasi*. Il clonaggio permette

di ottenere numerose copie identiche di un frammento specifico di DNA sfruttando il meccanismo di replicazione del materiale genetico all'interno di cellule batteriche, solitamente di *Escherichia coli*, il cui ciclo riproduttivo di pochi minuti garantisce di ottenere in poche ore un numero elevato di cellule procariote. Per effettuare un clonaggio si deve inserire il tratto a doppia elica di interesse, ottenuto tramite PCR, all'interno di batteri, grazie all'utilizzo di plasmidi capaci di attraversare facilmente la membrana plasmatica della cellula. Il plasmide utilizzato come vettore di clonaggio deve possedere almeno un gene che conferisca resistenza agli antibiotici e un sito di inserzione per il frammento di DNA esogeno all'interno di un gene la cui espressione fenotipica possa essere monitorata. Uno dei sistemi maggiormente utilizzati prevede l'utilizzo di un vettore contenente il sito di inserzione dei frammenti localizzato sul gene *LacZ* che codifica per l'enzima β -Galattosidasi, in modo tale che l'inserzione del DNA amplificato tramite PCR impedisca, per *frameshift*, la sintesi di quella particolare proteina. Le cellule batteriche trasformate vengono quindi fatte crescere su un terreno di coltura contenente galattosio, il cui metabolismo può essere identificato. L'utilizzo di galattosio da parte della cellula procariota provocherà un viraggio cromatico delle colonie batteriche: lo stato metabolizzato conferirà alla colonia un cromatismo blu, mentre il mancato metabolismo del substrato potrà essere identificato da una colonia incolore. Al termine della crescita avverrà lo *screening* per riconoscere le colonie cellulari contenenti il plasmide ricombinante (quindi che ha il frammento di DNA internalizzato) che appariranno bianche rispetto a quelle prive di plasmide o con il plasmide non coniugato all'inserto, che saranno di colore blu. Almeno 15 cloni devono essere successivamente analizzati e sequenziati in modo da ottenere una sequenza consenso significativa. L'analisi della sequenza è l'ultimo passaggio e permette la discriminazione della successione delle basi di un frammento di DNA amplificato: in particolare è possibile discriminare tutti i tipi

di polimorfismi puntiformi (che equivalgono alla sostituzione delle basi azotate nella molecola di DNA), ma anche inserzioni e delezioni di basi. La reazione di sequenza consiste in una PCR asimmetrica, dove viene utilizzato un solo primer che consente l'amplificazione di un singolo filamento, che tramite interpolazione con software specifici, permette di delineare la sequenza delle singole basi azotate nel filamento amplificato. Sebbene tale metodica rimanga alla base di molte ricerche relative al DNA di campioni antichi, oggi le nuove frontiere tecnologiche hanno permesso di aumentare la specificità e la sensibilità dei procedimenti per la valutazione delle sequenze di DNA endogene, permettendo di sequenziare ampi tratti dei genomi antichi. Come precedentemente esposto, le tecniche di analisi del aDNA prevedono la polverizzazione di frammenti ossei o di denti per il successivo recupero del materiale genetico⁴⁰. E' bene precisare che il prodotto di estrazione è costituito non solo dal DNA endogeno del reperto, ma è in realtà una complessa miscela contenente DNA di batteri, funghi, e contaminanti presumibilmente presenti sulla superficie del campione biologico. Se per l'amplificazione di sequenze note, specialmente quelle mitocondriali, la PCR rimane la metodica elettiva, per l'analisi genomica si preferirà coprire stocasticamente l'insieme del genoma totale seguendo due metodi: la costruzione di una libreria di DNA; oppure il processamento con il "Next Generation Sequencing" (NGS). Per la costruzione della libreria il DNA è frammentato enzimaticamente e inserito in plasmidi che saranno impiegati per la trasformazione di cellule batteriche. Quindi il clonaggio consiste nella moltiplicazione di un segmento di DNA appartenente al genoma del reperto antico. Il clonaggio, prevede l'utilizzo di endonucleasi di restrizione che tagliano sia la totalità dei genomi estratti che i vettori, secondo specifiche sequenze nucleotidiche. Dalle colonie formatesi si potrà quindi sequenziare il frammento clonato che varierà in funzione del segmento inserito, che sarà una frazione casuale derivante dalla digestione del DNA totale estratto

dal reperto. Tuttavia tale tecnica non risulta facilmente percorribile, infatti per ottenere sequenze endogene è necessario sequenziare un gran numero di cloni: le percentuali di successo nel clonare sequenze endogene del reperto variano da 1% a 6%⁴¹. Inoltre, attraverso tale metodologia, è impossibile sequenziare una regione specifica del genoma, perché i frammenti ottenuti rappresentano frazioni randomizzate del genoma stesso.

I procedimenti noti come NGS permettono di analizzare un enorme *dataset* di sequenze mediante una particolare tecnologia. Il DNA estratto dal campione, costituito da frammenti di dimensioni variabili, è unito a due *linkers* oligonucleotidici al 3' e al 5' della molecola *template*. Tali frammenti sono poi amplificati mediante una PCR a emulsione, dove ogni goccia di soluzione acquosa rappresenta un micro reattore in cui si verifica l'amplificazione utilizzando *primers* complementari ai *linkers*. Inoltre, l'amplificazione è condotta in modo tale che il nuovo filamento possa legarsi covalentemente a delle micro-sfere: così, dopo l'amplificazione in emulsione, saranno prodotte centinaia di migliaia di microsferi, ognuna delle quali sarà legata a un frammento di DNA a singolo filamento originato da una molecola stampo. Le sfere saranno poi inserite in una piastra contenente più di un milione di pozzetti entro i quali si localizzeranno, e quindi verranno sequenziate le frazioni di DNA tramite pirosequenziamento in loco. Questa tecnica sfrutta la produzione di pirofosfato (PPi) che si evidenzia quando si aggiunge un nucleotide alla catena polinucleotidica. La sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata con la PCR, viene incubata come singola elica insieme agli enzimi *DNA polimerasi*, *ATP solforilasi*, *luciferasi* e *apirasi* e ai substrati *adenosinsolfosfato (ASP)* e *luciferina*. Uno dei quattro deossi-nucleotide-tri-fosfato (dNTP) è aggiunto alla reazione. La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di tale base solo se è complementare al residuo del template. In tal caso si ha la concomitante liberazione di pirofosfato inorganico PPi. Il PPi così prodotto viene

trasformato in ATP per opera della *solforilasi* mediante l'utilizzo di ASP come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della *luciferina* a *ossiluciferina* grazie alla *luciferasi* con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD). L'enzima *apirasi* degrada il dNTP che non è stato incorporato e l'ATP prodotto dalla *solforilasi*. Solo quando la degradazione è terminata si aggiunge un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione. Si aggiungono ciclicamente tutti e 4 i dNTP fino a ottenere la sequenza completa. Il segnale luminoso prodotto dalla luciferina, viene registrato in un apposito "pirogramma" in modo proporzionale all'ATP prodotto e quindi al nucleotide inglobato: un picco di intensità doppia, per esempio, rileva che nello stesso ciclo sono stati inglobati 2 dNTP (se presente una ripetizione della stessa base sul template). Viceversa un segnale nullo indica che il dNTP aggiunto in quel ciclo non è complementare. In questo modo è possibile raggiungere frammenti di sequenze che sovrappo- nendosi parzialmente (costituendo un *contig*) consentono di avere sequenze consenso lunghe fino a 20-30 milioni di nucleotidi⁴², ed è quindi evidente il potenziale applicativo di questa tecnica allo studio dei genomi antichi.

Proprio la natura antica del campione tuttavia aumenta le difficoltà di analisi: infatti, le molecole di aDNA sono contenute in cellule non più pertinenti a tessuti vivi, quindi sono sottoposte a una serie molteplice di fattori esogeni che tendono a provocare danni non più riparabili dai sistemi cellulari. Infatti, come conseguenza della morte, il DNA contenuto nell'organismo va incontro a una serie di processi degradativi che ne modificano le proprietà chimico-fisiche. I fattori che contribuiscono alla degradazione della molecola sono principalmente: idrolisi (che porta alla perdita delle basi azotate); azione ossidativa delle radiazioni ionizzanti (con la produzione di radicali liberi); modificazioni del pH (che rompe i legami idrogeno, reagisce con i gruppi ossidrilici o provoca la depurinazione), ra-

diazioni UV (che causano interazioni intermolecolari denominate crosslink) e la presenza di acidi umici nel terreno. Il principale danno a carico degli acidi nucleici estratti a partire da reperti antichi è in prima istanza identificabile relativamente alle esigue dimensioni dei prodotti di amplificazione (tra 100 e 500 bp⁴³). Questi frammenti di piccole dimensioni possono essere il risultato di diverse reazioni a carico della molecola di DNA. Per esempio, possono essere prodotti per un blocco della DNA polimerasi: l'enzima presenta un'attività polimerasica principale in direzione 5'→3' del filamento, con la formazione del legame fosfodiesterico fra un terminale 3'-OH di un nucleotide di innesco e il fosfato alfa sul 5'-trifosfato di un nucleotide libero (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), con rilascio di pirofosfato (PPi). L'enzima segue le regole di complementarità fra le basi (A-T/C-G) imposte dal template, inoltre un terminale 3'-OH è sempre richiesto, come per tutte le DNA polimerasi, ed è sempre necessario un primer per iniziare la sintesi. Danni indotti da radicali presenti durante i processi decompositivi possono essere facilmente arrecati ai doppi legami delle molecole organiche delle purine e delle pirimidine, provocando rottura degli anelli eterociclici ovvero causare la rottura degli zuccheri che conseguentemente non consentono alla polimerasi di esplicare la sua funzione⁴⁴. Altri danni a carico del aDNA possono essere provocati da reazioni, enzimatiche e non, di rottura della catena fosfodiesterica: ciò può quindi provocare una frammentazione del singolo filamento interessato⁴⁵. Altre frammentazioni possono occorrere nel legame tra le basi azotate e la catena fosfodiesterica, con la conseguente formazione di siti privi della base azotata⁴⁶ che può quindi provocare scissione del filamento⁴⁷. Infine il DNA può anche essere danneggiato quando i gruppi amminici della citosina, adenina e guanina (la timina non possiede un gruppo amminico) vengono eliminati a seguito di reazioni di idrolisi (deaminazione idrolitica). Le basi deaminate vengono rimosse in vivo da particolari meccanismi di riparazione enzimatica, con le *DNA-glicosilasi* che idrolizzano i

legami glicosidici tra basi deaminate e desossiribosio. L'idrolisi del legame glicosidico di una purina deaminata produce un sito apurinico, mentre quello di una pirimidina deaminata un sito apirimidinico. Il tratto di DNA alterato (cioè contenente un sito apurinico o apirimidinico) viene riconosciuto da una endonucleasi che taglia il filamento di DNA a una distanza di circa 4-8 nucleotidi a monte e a valle del nucleotide danneggiato. Delle *elicasi* e delle *esonucleasi* rimuovono e degradano il filamento singolo danneggiato⁴⁸. È evidente che, nel caso di reperti antichi, tale complesso enzimatico non può riparare l'alterazione che così provocherà la sostituzione di basi nelle molecole neo formate dalla PCR. Tale fenomeno è stato ampiamente studiato e due metodiche permettono di identificarlo: l'utilizzo del *uracil-DNA-glicosilasi*, in quanto l'uracile presente nel aDNA a causa di deaminazione della citosina viene rimosso da tale enzima⁴⁹; e la comparazione delle mutazioni riscontrate con eccesso di mutazioni C-T e G-A in cloni ottenuti da sequenze antiche deaminate⁵⁰: infatti la citosina deaminata è un uracile che porta all'incorporazione nel filamento complementare di una adenina piuttosto che una guanina. Anche la *Taq polimerasi* può incorporare nucleotidi erronei nei nuovi filamenti e per questo risulta importante il clonaggio dei prodotti amplificati utilizzando vettori batterici⁵¹. Purtroppo, le attuali conoscenze sui danni a carico del aDNA sono tutt'altro che complete e necessitano di ulteriori ricerche circa le possibilità di incorporare nucleotidi errati o di analizzare molecole ampiamente danneggiate dal tempo e da fattori esogeni.

Associato a queste problematiche vi è anche il problema della contaminazione. Fonte primaria di contaminazione sono i microrganismi che crescono a spese del materiale cellulare, degradandolo, impoverendolo del DNA originale e arricchendolo del loro. Nel caso di resti umani tuttavia è possibile, attraverso l'analisi di marcatori specifici, discriminare tra componente primaria (endogena) degli acidi nucleici e quella secondaria (batterica o fungina). Problema ben più oneroso è

rappresentato dalla contaminazione del campione con DNA moderno umano che, necessariamente più integro del residuo, tende a venire amplificato preferenzialmente durante la PCR. Questo tipo di contaminazione può facilmente avvenire con le manipolazioni dei resti umani compiute, in successione, dall'archeologo, dal personale del museo, dall'antropologo e infine dal biologo molecolare. Per evitare questo problema sarebbe meglio analizzare anche il DNA degli operatori che sono entrati in contatto con i reperti. Al rischio d'inquinamento da manipolazione va aggiunto quello causato dall'ambiente e dagli strumenti: la polvere è un potente veicolo di contaminazione perché contiene peli e cellule desquamate oltre a microbi, acari e altri organismi. Nei laboratori di antropologia molecolare i prodotti stessi della reazione di amplificazione enzimatica, veicolati sotto forma di aerosol, diventano la principale causa di inquinamento dell'aria, delle apparecchiature e dei reagenti usati per le analisi. Esiste poi la contaminazione dovuta alla presenza di DNA umano nelle plastiche da laboratorio⁵². I controlli negativi (ovvero miscele formate dagli stessi costituenti della miscela per la PCR in cui manca DNA) costituiscono in questi casi un efficace sistema per identificare la contaminazione. Un tipo particolare di contaminazione è quello dovuto alla presenza di sostanze che inibiscono l'azione della polimerasi e che possono provenire da trattamenti di imbalsamazione o dal restauro subito dopo il recupero, ma anche dall'interramento del reperto: può trattarsi di composti del suolo come acidi umici, acidi fulvici e altre sostanze⁵³. Esistono, tuttavia, sistemi di purificazione del DNA estratto che consentono di ridurre efficacemente l'effetto inibitorio di queste sostanze. Infine, la contaminazione da DNA eterologo umano può aver avuto origine anche in momenti precedenti al recupero e può essere dovuta, per esempio, a gesti funerari quali la preparazione o il trattamento del cadavere, o a pratiche post-sepolcrali, quali l'apertura della tomba, la manipolazione dei reperti, la riesumazione. Oltre ai riti funebri, fonti di contaminazione sono costituite da sepolture multiple e da

agenti patogeni. E' importante, quindi, una documentazione accurata sul reperto e sulla sua storia post-mortem, necessaria per prevedere la possibilità di recuperare DNA originale dal reperto. Risulta quindi necessario che, durante il recupero nel corso dello scavo archeologico e in tutte le fasi successive di immagazzinamento temporaneo, di trasporto, fino alla consegna ai vari laboratori di analisi e di restauro, siano seguite tutte le procedure e siano usati accorgimenti atti a tutelare la materia organica residua per ottenere il maggior numero possibile di informazioni⁵⁴. Come norma generale, i reperti dovrebbero sempre essere manipolati, durante il recupero, con guanti e mascherina; anche nel laboratorio di antropologia molecolare il reperto non deve venire a contatto con DNA amplificato o con altro DNA più recente: è quindi indispensabile l'uso di guanti chirurgici, camice, cuffia e mascherina sterili e monouso. È di grande importanza la pulizia giornaliera dell'area di lavoro e la sua decontaminazione per mezzo di ipoclorito di sodio, la sterilizzazione degli strumenti e l'utilizzo di reagenti monouso sterilizzati⁵⁵. Obiettivo primario diviene dunque la riduzione al minimo degli agenti contaminanti, per esempio lavorando con la massima sterilità durante tutte le varie fasi della ricerca. Sono stati inizialmente redatti i seguenti criteri di autenticità⁵⁶: (a) eseguire degli estratti di controllo in parallelo con quelli dei campioni antichi per rilevare la presenza di contaminazione all'interno dei reagenti utilizzati durante questa procedura; (b) su ogni campione deve essere eseguito più di un estratto e tutti gli estratti devono restituire sequenze di DNA identiche; (c) ci deve essere una correlazione inversa tra efficienza di amplificazione e dimensione del prodotto amplificato, che riflette la contaminazione, la degradazione e il danno nel aDNA. Infatti, è stato dimostrato che amplificando frammenti lunghi al massimo 100 bp aumenta la probabilità di amplificare il DNA endogeno riducendo quindi la contaminazione esogena⁵⁷. Tali criteri sono stati costantemente ampliati e aggiornati: oggi vi è una lista di procedure a cui attenersi rigorosamente per azzerare il

rischio di contaminazione nei laboratori di indagine genetica^{58,59}: a) clonare gli amplificati nel caso di contaminazioni avvenute nel tempo sulle quali non è più possibile intervenire (permette di determinare il rapporto tra le sequenze endogene/esogene: l'ideale sarebbe trovare frammenti sovrapponibili per accertarsi che l'eventuale variazione della sequenza è reale e non il prodotto di errori); b) determinare attraverso Real-Time PCR la quantità di molecole di DNA amplificabili presenti in un estratto; la quantificazione deve essere eseguita per ciascun coppia di primers che vengono utilizzati per poter ottimizzare l'esperimento^{60,61} c) indagare lo stato di conservazione del reperto osseo. Tale analisi preventiva merita un approfondimento. In primo luogo, perché è uno screening rapido per identificare i reperti che potrebbero contenere DNA, in secondo luogo perché permette di confermare l'esperimento in quanto in un esemplare ben conservato è più probabile che il DNA sia preservato. Per questa indagine sono state proposte diverse tecniche: l'analisi dei cristalli di idrossiapatite dell'osso tramite spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)⁶² e l'analisi degli amminoacidi presenti nella componente organica. Metodi alternativi comprendono la stima del rapporto tra i frammenti peptidici a singoli amminoacidi tramite spettrometria di massa⁶³, l'analisi istologica^{64,65,66,67}, la determinazione dei danni del DNA tramite gas cromatografia/spettrometria di massa⁶⁸, la misurazione della porosità e densità ossea⁶⁹ e la microscopia elettronica a trasmissione⁷⁰. L'analisi all'FT-IR deve essere eseguita secondo la procedura standard che utilizza la pasticca di Bromuro di Potassio (KBr)⁷¹. Andando ad analizzare gli spettri ottenuti con questa tecnica si ottengono molte informazioni sull'idrossiapatite, uno dei costituenti principali del tessuto osseo, e in generale sul suo stato di preservazione; per esempio si può evidenziare se l'osso ha assorbito carbonato di calcio proveniente dall'ambiente circostante la sepoltura attraverso la presenza del picco a 713 cm^{-1} ⁷²; oppure se il cristallo di idrossiapatite ha subito ricristallizzazione, incorporando ioni come il

fluoro (F) e quindi portando alla formazione della francolite, attraverso la presenza del picco a 1098 cm^{-1} ⁷³. Tramite questa indagine è possibile anche calcolare il rapporto tra carbonato e fosfato (C/P), stimato a partire dalle altezze dei picchi, prese in riferimento a una linea di base tra le altezze dei picchi a 1435 cm^{-1} (per C) e 875 cm^{-1} (per P), che evidenzia contatti tra l'osso e l'ambiente circostante e possibili incorporazioni diagenetiche, del carbonato nel cristallo⁷⁴. Infine, si può calcolare lo splitting factor (SF) o indice di cristallinità (CI), parametro fondamentale per determinare la diagenesi della matrice ossea mediante il quale è possibile riflettere la reale dimensione del cristallo e l'estensione del reticolo degli atomi costituenti il tessuto osseo. Con questa tecnica si evidenziano i segnali relativi ai moti vibrazionali (di tipo torsionale) dell'orto-fosfato che assorbe tra 500 e 600 cm^{-1} sia per il fosfato di calcio amorfo che per l'apatite cristallina (Fig. 1).

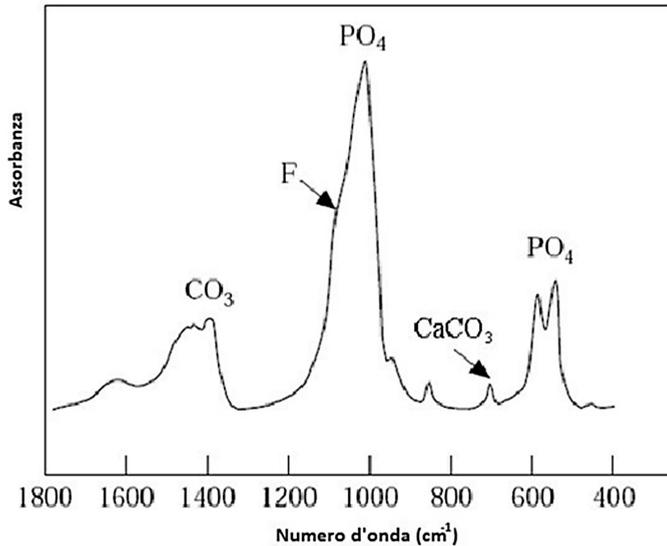


Fig.1 Esempio di spettro, in assorbanza, ottenuto tramite l'FT-IR per un campione osseo

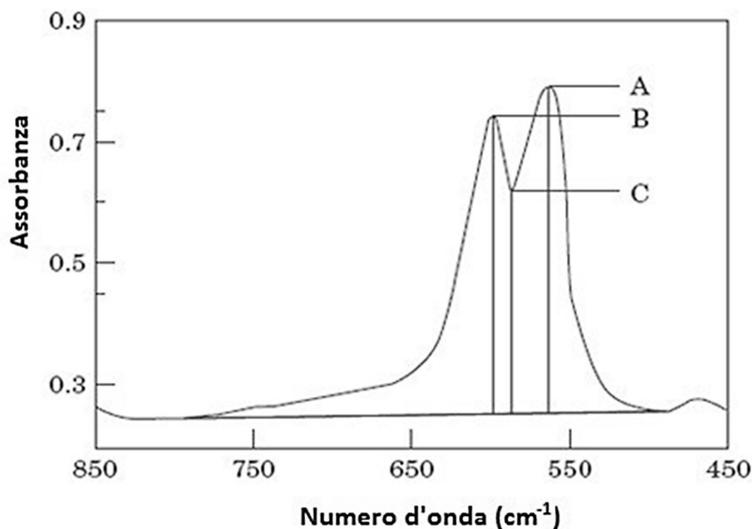


Fig. 2: Assorbanze utilizzate per il calcolo dello SF (cfr testo).

L'apatite ha un assorbimento ben definito in due bande e attraverso lo SF si può misurare l'ammontare di questa separazione⁷⁵; più aumenta, più l'apatite è stata diageneticamente deteriorata, secondo la seguente formula:

$$SF = \frac{A + B}{C}$$

dove A e B sono le altezze dei picchi a 563 cm⁻¹ e 603 cm⁻¹, mentre C è quella relativa al picco tra A e B. Tutte le assorbanze sono riferite a partire dalla linea di base⁷⁶.

Per completare l'analisi dello stato di preservazione osseo si deve analizzare anche la componente organica valutando il tasso di racemizzazione degli amminoacidi D-amminoacidi/L-amminoacidi tramite gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Esso rappresenta un importante strumento di indagine nelle analisi del

aDNA⁷⁷ perché tutti gli amminoacidi, a eccezione della glicina (Gly), otticamente inattiva, presentano due isomeri ottici (enantiomeri): D (destro giro) e L (levo giro). Dei due, solamente l'enantiomero L viene utilizzato in natura nella biosintesi delle proteine. Dopo la morte di un individuo, gli L-amminoacidi si trasformano in D-enantiomeri fino a che le due forme sono presenti in egual misura (D/L=1) secondo un processo influenzato da vari fattori tra i quali temperatura, umidità e presenza di ioni metallici. In teoria gli L-amminoacidi prodotti dagli organismi viventi impiegherebbero un tempo di 105-106 anni per racemizzare completamente⁷⁸, ma tra loro l'acido aspartico (Asp) presenta uno dei tassi di racemizzazione più veloci, ed è simile al tasso di depurinazione del DNA^{79,80,81}. Quindi la racemizzazione dell'Asp può essere utilizzata come indicatore della degradazione del DNA. Dato che l'Asp presenta una velocità di racemizzazione maggiore degli altri amminoacidi quali l'alanina (Ala) e la valina (Val), ci si aspetterebbe a parità d'età di trovare un valore D/L più alto per l'Asp rispetto agli altri due (D/L Asp > D/L Ala > D/L Val)⁸². Al contrario, un rapporto D/L di Val o Ala maggiore di quello di Asp è prova di contaminazione esogena da amminoacidi⁸³. Negli ultimi anni⁸⁴ è stato messo in evidenza che non vi è una diretta correlazione tra preservazione organica e conservazione del DNA antico, ma sicuramente tale approccio costituisce un ulteriore strumento per comprendere la storia biomolecolare del campione oggetto di studio. Ulteriori criteri per il controllo della contaminazione sono: d) mantenere le aree di lavoro prePCR e postPCR fisicamente isolate e dedicate solo allo studio del aDNA per diminuire contaminazione da aerosol di prodotti amplificati; e) indossare sempre tute protettive e guanti per eliminare il contatto con il materiale oggetto d'analisi; f) tutte le plastiche e gli ambienti adibiti allo studio del aDNA devono essere regolarmente decontaminati con irradiazione di luce UV a 254nm; g) far riprodurre l'intera fase sperimentale ad altri operatori e in laboratori diversi per individuare un contaminante in laborato-

rio: la replica in un secondo laboratorio è pertanto un'ulteriore precauzione per escludere la presenza di contaminati.

Le applicazioni dello studio del aDNA sono molto variegata. Sebbene inferenze sulla filogenesi delle popolazioni umane sono ampiamente sviluppate tramite l'analisi delle popolazioni viventi⁸⁵, le relazioni tra le popolazioni moderne possono essere confrontate anche con gruppi umani estinti attraverso lo studio dell'aDNA. Per esempio, sono diverse le analisi svolte sul genoma mitocondriale neandertaliano, ottenuto sia tramite sequenziamento Sanger che NGS⁸⁶. Tali analisi hanno spesso evidenziato una variabilità del genoma neandertaliano non paragonabile a quella presente nella nostra specie, escludendo, per lo meno a livelli significativi, il mescolamento tra *H. neanderthalensis* e *H. sapiens*^{87,88}. Tuttavia, ulteriori analisi condotte sul genoma nucleare sembrerebbero evidenziare un certo grado, anche se minimo, di commistione^{89,90}. Un'altra applicazione dello studio del aDNA è tesa a esplorare le affinità e le interazioni tra popolazioni conspecifiche, andando a integrare evidenze di tipo linguistico-culturale. Infatti, attraverso lo studio del aDNA si può ricostruire l'evoluzione diacronica di una popolazione, correlando i cambiamenti genetici a modificazioni demiche o culturali. Tale approccio è stato ampiamente utilizzato per indagare la continuità genetica delle popolazioni mesoamericane precolombiane⁹¹ o per spiegare le dinamiche del processo di neolitizzazione in Europa^{92,93}. Se da una parte le ricerche menzionate analizzano il DNA antico a livello popolazionistico, approcci maggiormente selettivi possono essere valutati conoscendo specifiche regioni genomiche. Attualmente si stanno sempre più diffondendo ricerche tese a identificare marcatori genetici nei genomi antichi, tali da essere considerati buoni indicatori fenotipici grazie a studi di comparazione funzionale con genomi moderni. Infatti l'identificazione di polimorfismi nei genomi antichi, può essere indicativo nel delineare caratteristiche fenotipiche delle popolazioni passate, intese come insieme di singoli individui, tali da poter essere relazionate a fenomeni di adat-

tamento⁹⁴. Uno dei polimorfismi più studiati è quello relativo alla capacità anche in età adulta di digerire il lattosio, uno zucchero presente nel latte che ne costituisce circa il 2-8%. E' un disaccaride costituito da glucosio e galattosio, digerito nell'intestino tenue dall'enzima β -D-galattosidasi (*lattasi*) e trasformato in zuccheri semplici che possono essere assorbiti. La principale fonte naturale di lattosio è il latte, che spesso è l'unica fonte di alimento per i neonati. Nella maggior parte dei mammiferi la produzione dell'enzima lattasi diminuisce con l'età quando il latte non è più consumato ed è la ragione per la condizione nota come "intolleranza al lattosio". Se il latte o un altro prodotto lattiero-caseario continuano a essere assunti nella dieta dopo che la produzione dell'enzima è stata ridotta a livelli insufficienti, il lattosio che non è assorbito passa nel colon dove è metabolizzato dai batteri con il processo della fermentazione, creando una miscela di diossido di carbonio, idrogeno e metano. E' questa produzione di gas che causa i sintomi addominali dell'intolleranza al lattosio: crampi addominali, gonfiore e flatulenza. Tale caratteristica sembra essersi originata in eventi indipendenti come forme di evoluzione convergente in diverse popolazioni⁹⁵. Studi sul aDNA hanno mostrato come nella popolazione europea la persistenza è un'acquisizione relativamente recente, che non riguarda le popolazioni neolitiche che occupavano i territori europei⁹⁶. Tali indicazioni quindi suggeriscono come la persistenza in Europa si sia sviluppata solo dopo che il consumo di latte è andato crescendo con l'adozione della pastorizia: circa 7500 anni fa una mutazione è avvenuta nell'Europa centrale in una zona di allevamento da latte, risultante nella produzione continua dell'enzima lattasi anche negli adulti. È probabile che la mutazione, nel gene *LCT*⁹⁷, sia stata sottoposta ad una pressione selettiva in quanto il latte è un'importante fonte di calcio e vitamina D (soprattutto nelle regioni del nord dove il clima è più freddo e poco soleggiato). Caratteristiche molecolari con riflessi fenotipici sono state identificate anche nel genoma neandertaliano: i geni *FOXP2*⁹⁸ e il gene *MCR1*⁹⁹ sono stati

recentemente identificati nel materiale genetico di *H. neandertalensis*. Nello specifico è stato possibile identificare come il gene *FOXP2* sia condiviso tra *H. neandertalensis* e *H. sapiens*, e poiché tale gene è stato relazionato alla nascita del linguaggio articolato nella nostra specie, sono evidenti le implicazioni culturali che da tale condivisione possano essere generate¹⁰⁰. Anche il gene che codifica per il recettore della melanocortina (*MCR1*) è stato analizzato in due reperti neandertaliani provenienti dalla Spagna (El Sidrón 1252) e dall'Italia (Monti Lessini) in quanto correlato a funzionalità regolatorie dei pigmenti della pelle e dei capelli. I reperti neandertaliani evidenziarono come la sequenza genica del recettore era caratterizzata da una mutazione responsabile di minor efficienza (*loss of function*): la mutazione provocherebbe un cambiamento amminoacidico che risulterebbe in pelle di colore chiaro e capelli tendenti al rosso. La mutazione neandertaliana è a oggi assente nelle popolazioni umane, suggerendo come le diverse varianti geniche possano essere derivate da eventi mutazionali disgiunti. Sebbene tali approcci siano stati ampiamente utilizzati negli ultimi anni, la potenzialità informativa degli SNP identificati nei genomi antichi è tuttora limitata, in quanto le variazioni fenotipiche prodotte sono spesso riferite e comparate alle variazioni fenotipiche prodotte da mutazioni in genomi moderni¹⁰¹. Altra applicazione degli studi di aDNA è la ricostruzione dei rapporti di parentela tra gli individui di un sito: è il caso in cui il rinvenimento di piccoli gruppi umani consenta di ipotizzare rapporti di parentela da districare attraverso l'analisi molecolare, che di norma permette anche di determinare il sesso, a livello molecolare, degli individui. Tale applicazione è stata eseguita su molteplici campioni, che vanno da gruppi neandertaliani¹⁰²; fino a necropoli mongole¹⁰³ e dell'età imperiale romana (Catalano et al., comunicazione personale). Infine il DNA antico può essere utilizzato anche per caratterizzare patologie presenti in reperti antichi. Diverse sono le tipologie patologiche riscontrabili su materiale antico, e spesso riguardano non direttamente

il aDNA umano quanto piuttosto il materiale genetico di parassiti. Il primo DNA patogeno rinvenuto in campioni antichi è stato quello del batterio *Mycobacterium tuberculosis*¹⁰⁴, rapidamente seguito dal *Mycobacterium leprae*¹⁰⁵. Tali ricerche spesso sono andate caratterizzando casi documentati di epidemie, in cui tali microrganismi patogeni potevano aver avuto un ruolo chiave nella patogenesi¹⁰⁶. La preservazione e la persistenza di DNA batterico antico, se da una parte può apparire controversa¹⁰⁷, è stata dimostrata da diverse ricerche che indicano come i microrganismi possano attuare una serie di meccanismi che permettano di sopravvivere in condizioni sub-ottimali, mantenendo la stabilità del loro materiale genetico¹⁰⁸. Diverse sono le ricerche incentrate su tali assunti, tra le quali l'analisi di una tomba israeliana datata al I sec. d.C.¹⁰⁹, che rappresenta la prima sepoltura a datazione certa di un individuo sofferente di tubercolosi e lebbra, identificate a livello molecolare. Altro caso di utilità dello studio molecolare dei reperti antichi è quello che prevede l'identificazione molecolare di patogeni in reperti archeologici con diagnosi paleopatologiche indefinite. Nella cittadina albanese di Butrint (X-XIII secolo d.C.) l'analisi antropologica aveva infatti evidenziato lesioni osteolitiche circolari sulle vertebre toraciche e lombari conformi a diverse patologie come tubercolosi o brucellosi, altra patologia di origine batterica da *Brucella sp.* Lo screening genetico incentrato su tali agenti eziologici ha permesso di identificare il materiale genetico di *Brucella sp.*, batterio facilmente trasmissibile attraverso contatti tra uomo e bovini. Tale osservazione ha confermato come la Brucellosi fosse endemica dell'area a partire dal Medio Evo¹¹⁰. Recentemente, infine, è stato analizzato il genoma completo del batterio *Yersinia pestis* isolato da reperti scheletrici pertinenti ad individui deceduti durante la Peste del 1300¹¹¹. Tale ricerca ha permesso di accertare come non sussistano sostanziali modificazioni della sequenza batterica rispetto al patogeno moderno, non consentendo quindi di identificare la motivazione per la quale la Morte Nera del 1300 fosse stata particolar-

mente aggressiva e virulenta. Tale epidemia sorse in Europa dal 1347, forse proveniente dall'Asia, e velocemente si diffuse su tutto il continente europeo obbligando i governi a predisporre aree cimiteriali dedicate, per accogliere i numerosi decessi. Proprio da una di queste aree cimiteriali sono stati campionati gli elementi dentari per estrarre il aDNA. Attraverso una metodologia di selezione dei genomi batterici si è riuscito a trascurare il materiale genetico umano e di contaminanti ambientali (ad esempio altre forme batteriche presenti nel suolo) per sequenziare, attraverso metodiche NGS, l'intero genoma di *Y. pestis*. L'analisi del genoma ha quindi dimostrato come, non essendoci sostanziali differenze tra ceppi batterici, la estrema gravità della Morte Nera poteva essere ascritta alle condizioni epidemiologico-ambientali caratteristiche del periodo¹¹².

Parimenti ai batteri, anche alcuni parassiti possono essere identificati tramite il loro materiale genetico conservato nel tempo. Infatti, spesso, l'interesse non è solo quello di identificare gli effetti di alcune parassitosi su corpi mummificati, ma il recupero di materiale genetico pertinente agli agenti parassitari e la possibilità di analizzare tale materiale genetico. Uno degli articoli pionieristici sulla presenza di patologie causate da parassiti era relativo al Chagas, causata da *Trypanosoma sp.*, identificato in mummie provenienti dal deserto di Atacama¹¹³ attraverso l'analisi delle lesioni cardiache. A partire dalla fine degli anni '90 sono iniziate una serie di ricerche atte ad identificare ed isolare, a partire da mummie peruviane datate 4000 anni fa, il DNA del *Trypanosoma cruzi*¹¹⁴. Ricerche successive portarono alla pubblicazione di diversi lavori circa l'isolamento del aDNA pertinente il parassita anche in mummie Chinchorro datate 9000 anni fa¹¹⁵, che permisero di identificare come il morbo di Chagas fosse presente nelle società pre-Colombiane e che i gruppi umani preistorici probabilmente ebbero contatti con il parassita in diverse modalità¹¹⁶. Infine un'altra classe di patologie possono essere evidenziate tramite lo studio del aDNA: i tumori. Esempio di questa applicazione è stata l'ana-

lisi dei resti mummificati appartenenti al Re Ferrante I d' Aragona¹¹⁷. In questo caso la dissezione del corpo mummificato aveva evidenziato una massa neoplatica nella pelvi. Le analisi molecolari dei tumori antichi offre la preziosa possibilità di valutare la storia delle neoplasie e porle in relazione alle alterazioni genetiche, allo stile di vita ed ai fattori di rischio ambientali. Data la esigua numerosità campionaria disponibile per tumori dei tessuti molli, è evidente come il caso di un Re, con la sua vita dettagliatamente vivisezionata da cronache coeve, possa rappresentare un ottimo campione per investigare il ruolo di fattori esogeni allo sviluppo della cancerogenesi. A livello molecolare lo sviluppo di un tumore è legato all'insorgere di mutazioni in geni denominati proto-oncogeni, spesso legati a funzioni del ciclo cellulare¹¹⁸. Nello specifico sono stati analizzati il proto-oncogene *K-ras*, particolarmente correlato, se "attivato" da mutazioni, a tumori colo-rettali¹¹⁹, e il gene *BRAF*, mutato in un ampio ventaglio di espressioni tumorali¹²⁰. I risultati ottenuti concordarono con un pattern mutazionale nel gene *K-Ras*, che comporta anche una mutuale esclusione delle mutazioni in *BRAF* nei tumori colo-rettali, rappresentando fattori indipendenti nella carcinogenesi del colon¹²¹.

Le molteplici applicazioni menzionate evidenziano come il DNA antico possa esser senza dubbio considerato un utile strumento per l'analisi della variabilità genetica delle popolazioni passate. Nonostante le numerose limitazioni imposte sia dal carattere estremamente labile del aDNA che dagli approcci metodologici di ultima generazione, di cui progressivamente si perfezionano le applicazioni, è evidente come tale componente possieda delle qualità intrinseche che possano esser tramutate in notevoli ambiti di ricerca differenziali. Tali ambiti, se da una parte non permetteranno ai dinosauri di tornare sulla Terra, né ai neandertaliani di ricolonizzare l'Europa, tuttavia possono essere una ricchissima fonte di conoscenza sulla biologia e sull'evoluzione delle specie del nostro Pianeta.

BIBLIOGRAFIA E NOTE

1. HIGUCHI R., BOWMAN B., FREIBERGER M., RYDER O.A., WILSON A.C., *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*. Nature 1984; 312: 282-284.
2. PÄÄBO S., *Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA*. Nature 1985; 314: 644-645.
3. PÄÄBO S., HIGUCHI R.G., WILSON A.C. *Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology*. J. Biol. Chem. 1989; 264: 9709-9712.
4. GREEN R.E., KRAUSE J., PTAK SE, BRIGGS A.W., RONAN M.T., SIMONS J.F., DU L., EGHOLM M., ROTHBERG J.M., PAUNOVIC M., PÄÄBO S., *Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA*. Nature 2006; 444: 330-336.
5. KRAUSE J., FU Q., GOOD J.M., VIOLA B., SHUNKOV M.V., DEREVIANKO A.P., PÄÄBO S. *The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia*. Nature 2010; ; 464: 894-897.
6. HAAK W., BRANDT G., DE JONG H.N., MEYER C., GANSLMEIER R., HEYD V., HAWKESWORTH C., PIKE A.W., MELLER H., ALT K.W. *Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age*. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105: 18226-18231.
7. LALUEZA-FOX C., ROSAS A., ESTALRRICH A., GIGLI E., CAMPOS P.F., GARCÍA-TABERNERO A., GARCÍA-VARGAS S., SÁNCHEZ-QUINTO F., RAMÍREZ O., CIVIT S., BASTIR M., HUGUET R., SANTAMARÍA D., GILBERT M.T., WILLERSLEV E., DE LA RASILLA M., *Genetic evidence for patrilocality among Neanderthal groups*. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 2011; 108: 250-253.
8. HO S.Y., KOLOKOTRONIS S.O., ALLABY R.G. *Elevated substitution rates estimated from ancient DNA sequences*. Biol. Lett. 2007; 3: 702-705.
9. KRAUSE J., LALUEZA-FOX C., ORLANDO L., ENARD W., GREEN R.E., BURBANO H.A., HUBLIN J.J., HÄNNI C., FORTEA J., DE LA RASILLA M., BERTRANPETIT J., ROSAS A., PÄÄBO S. *The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals*. Curr. Biol. 2007; 17: 1908-1912.
10. RASMUSSEN M., LI Y., LINDGREEN S., PEDERSEN J.S., ALBRECHTSEN A., MOLTKE I., METSPALU M., METSPALU E., KIVISILD T., GUPTA R., BERTALAN M., NIELSEN K., GILBERT M.T., WANG Y., RAGHAVAN

- M., CAMPOS P.F., KAMP H.M., WILSON A.S., GLEDHILL A., TRIDICO S., BUNCE M., LORENZEN E.D., BINLADEN J., GUO X., ZHAO J., ZHANG X., ZHANG H., LI Z., CHEN M., ORLANDO L., KRISTIANSSEN K., BAK M., TOMMERUP N., BENDIXEN C., PIERRE T.L., GRØNNOW B., MELDGAARD M., ANDREASEN C., FEDOROVA S.A., OSIPOVA L.P., HIGHAM T.F., RAMSEY C.B., HANSEN T.V., NIELSEN F.C., CRAWFORD M.H., BRUNAK S., SICHERITZ-PONTÉN T., VILLEMS R., NIELSEN R., KROGH A., WANG J., WILLERSLEV E., *Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo*. *Nature* 2010; 463: 757-762.
11. KELLER A., GRAEFEN A., BALL M., MATZAS M., BOISGUERIN V., MAIXNER F., LEIDINGER P., BACKES C., KHAIRAT R., FORSTER M., STADE B., FRANKE A., MAYER J., SPANGLER J., MCLAUGHLIN S., SHAH M., LEE C., HARKINS T.T., SARTORIA., MORENO-ESTRADA A., HENN B., SIKORA M., SEMINO O., CHIARONI J., ROOTSI S., MYRES N.M., CABRERA V.M., UNDERHILL P.A., BUSTAMANTE C.D., VIGL E.E., SAMADELLI M., CIPOLLINI G., HAAS J., KATUS H., O'CONNOR B.D., CARLSON M.R., MEDER B., BLIN N., MEESE E, PUSCH CM, ZINK A. *New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing*. *Nat. Commun.* 2012; 3:698.
 12. LALUEZA-FOX C., GILBERT M.T. *Paleogenomics of archaic hominins*. *Curr. Biol.* 2011; 21: R1002-1009.
 13. BON C., BERTHONAUD V., MAKSUD F., LABADIE K., POULAIN J., ARTIGUENAVE F., WINCKER P., AURY J.M., ELALOUF J.M., *Coprolites as a source of information on the genome and diet of the cave hyena*. *Proc. Biol. Sci.* 2012 Mar 28. [Epub ahead of print]
 14. HAWASS Z., GAD Y.Z., ISMAIL S., KHAIRAT R., FATHALLAD., HASANN., AHMED A., ELLEITHY H., BALL M., GABALLAH F., WASEF S., FATEEN M., AMER H., GOSTNER P., SELIM A., ZINK A., PUSCH C.M. *Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family*. *JAMA.* 2010; 303: 638-647.
 15. BENGTSSON C.F., OLSEN M.E., BRANDT L.Ø., BERTELSEN M.F., WILLERSLEV E., TOBIN D.J., WILSON A.S., GILBERT M.T., *DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail*. *Ann. Anat.* 2012; 194: 17-25.
 16. HOFREITER M., *Paleogenomics*. *C.R. Palevol.* 2008; 113-124.
 17. SALSE J., *In silico archeogenomics unveils modern plant genome organisation, regulation and evolution*. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2012; 15: 122-130.
 18. LINDINGER A., PETERLI R., PETERS T., KERN B., VON FLÜE M., CALAME M., HOCH M., EBERLE A.N., LINDINGER P.W., *Mitochondrial DNA content in human omental adipose tissue*. *Obes. Surg.* 2010; 20: 84-92.

19. Cfr. op. cit. nota 3.
20. GILBERT M.T., TOMSHO L.P., RENDULIC S., PACKARD M., DRAUTZ D.I., SHER A., TIKHONOV A., DALÉN L., KUZNETSOVA T., KOSINTSEV P., CAMPOS P.F., HIGHAM T., COLLINS M.J., WILSON A.S., SHIDLOVSKIY F., BUIGUES B., ERICSON P.G., GERMONPRÉ M., GÖTHERSTRÖM A., IACUMIN P., NIKOLAEV V., NOWAK-KEMP M., WILLERSLEV E., KNIGHT J.R., IRZYK G.P., PERBOST C.S, FREDRIKSON K.M., HARKINS T.T., SHERIDAN S., MILLER W., SCHUSTER S.C. *Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts*. Science 2007; 317: 1927-1930.
21. WOODWARD S. R., WEYAND N. J. & BUNELL M. *DNA sequence from Cretaceous period bone fragments*. Science 1994; 266: 1229-1232.
22. CANO R.J., POINAR H.N. & POINAR JR.G O. *Isolation and partial characterisation of DNA from the bee Proplebeia dominicana (Apidae: Hymenoptera) in 25-40 million year old amber*. Med. Sci. Res. 1992; 20: 249-251.
23. DESALLE R., GATESY J., WHEELER W. & GRIMALDI D. *DNA Sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications*. Science 1992; 257: 1933-1936.
24. ZISCHLER H., HOSS M., HANDT O., VON HAESLER A., VAN DER KUYL A.C. & GOUDSMIT J., *Detecting dinosaur DNA*. Science 1995; 268: 1192-1193.
25. MILANIL., *L'analisi del DNA antico in Antropologia*. Antropos 2005; 1: 53-56.
26. THOMAS D.H., *Skull wars: Kennewick Man, archaeology, and the battle for Native American identity*. New York: Basic Books, 2000.
27. LAWLER A., *Grave disputes*. Science 2010; 330: 166-170.
28. BOLNICK D.A., BONINE H.M., MATA-MIGUEZ J., KEMP B.M., SNOW M.H., LEBLANC S.A., *Nondestructive Sampling of Human Skeletal Remains Yields Ancient Nuclear and Mitochondrial DNA*. Am. J. Phys. Anthropol. 2012; 147: 293-300.
29. LINDAHL T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature 1993; 362: 709-715.
30. EGLINTON G., LOGAN G.A., *Molecular preservation*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1991; 333: 315-327.
31. CARAMELLI D & LAGO G., *Advances in ancient DNA studies*. JASs 2006; 84: 65-83.
32. WILLERSLEV E., HANSEN A.J., POINAR H.N., *Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost*. Trends Ecol. Evol. 2004; 19: 141-147.

33. HÖSS M., JARUGA P., ZASTAWNY T.H., DIZDAROGLU M. & PÄÄBO S., *DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues*. Nucl. Acids Res. 1996; 24: 1304–1307.
34. BARNES I., MATHEUS P., SHAPIRO B., JENSEN D. & COOPER A., *Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears*. Science 2002; 295: 2267–2270.
35. POINAR H., HOSS M., BADA J.L. & PÄÄBO S., *Aminoacid racemisation and the preservation of ancient DNA*. Science 1996; 272: 864-866.
36. MULLIS K.B., FALOONA F.A., *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol 1987; 155: 335-350
37. Cfr op. cit. nota 1
38. SIMON C., FRANKE A., MARTIN A., *The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification*. In: HEWITT G.M., JOHNSTON A.W.B., YOUNG J.P.W., *Molecular taxonomy*. Berlin, Springer, 1991.
39. SHENDURE J.A., PORRECA G.J., CHURCH G.M., GARDNER A.F., HENDRICKSON C.L., KIELECZAWA J., SLATKO B.E., *Overview of DNA sequencing strategies*. Curr Protoc Mol Biol. 2011; 7: 7.1.
40. CAMPOS P.F., CRAIG O.E., TURNER-WALKER G., PEACOCK E., WILLERSLEV E., GILBERT M.T. *DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it?* Ann. Anat. 2012; 194: 7-16.
41. NOONAN J.P., COOP G., KUDARAVALLI S., SMITH D., KRAUSE J., ALESSI J., CHEN F., PLATT D., PÄÄBO S., PRITCHARD J.K., RUBIN E.M., *Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA*. Science 2006; 314: 1113-1118.
42. Cfr op. cit. nota 16.
43. HOFREITER M., JAENICKE V., SERRE D., HAESLER A.V.A., PÄÄBO S., *DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA*. Nucleic Acids Res. 2001; 29: 4793-4799.
44. FRIEDBERG E.C., WALKER G.C., SIEDE W., *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington D.C ASM Press, 1995.
45. Cfr. op. cit. nota 28.
46. SCHAAPER R.M., KUNKEL T.A., LOEB L.A., *Infidelity of DNA-synthesis associated with bypass of apurinic sites*. Proc.Natl. Acad. Sci. USA.1983; 80: 487-491.
47. Cfr. op. cit. nota 41.
48. MAITI A., NOON M.S., MACKERELL A.D. JR, POZHARSKI E., DROHAT A.C., *Lesion processing by a repair enzyme is severely curtailed by*

residues needed to prevent aberrant activity on undamaged DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012; 109: 8091-8096.

49. Cfr op. cit. nota 3.
50. HANSEN A., WILLERSLEV E., WIUF C., MOURIER T. & ARCTANDER P., *Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates.* Mol. Biol. Evol. 2001; 18: 262–265.
51. Cfr. op. cit. nota 40.
52. SCHMIDT T., HUMMEL S., HERRMANN B., *Evidence of contamination in PCR laboratory disposables.* Naturwissenschaften 1995; 82: 423-431.
53. Cfr. op. cit. nota 24.
54. Cfr. op. cit. nota 24.
55. BRAMANTI B., PACCIANI E., *Il recupero dei resti umani nello scavo archeologico in funzione dell'analisi del DNA.* In: ROLLO F., *Il DNA nello studio dei resti umani antichi. Principi, metodi e applicazioni.* Palermo, Medical Books, 1999.
56. Cfr. op. cit. nota 3.
57. Cfr. op. cit. nota 5.
58. COOPER A., POINAR H.N., *Ancient DNA: do it right or not at all.* Science 2000; 289: 1139
59. PÄÄBO S., POINAR H., SERRE D., JAENICKE-DESPRES V., HEBLER J., ROHLAND N., KUCH M., KRAUSE J., VIGILANT L., HOFREITER M., *Genetic analyses from ancient DNA.* Annu Rev Genet. 2004; 38: 645-679.
60. Cfr. op. cit. nota 30.
61. HANDT O., KRINGS M., WARD R.H., PÄÄBO S., *The retrieval of ancient human dna sequences.* Am. J. Hum. Genet. 1996; 59: 368–376.
62. SHEMESH A., *Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites.* Geochim. Cosmochim. Acta. 1990; 54: 2433-2438.
63. POINAR H.N., STANKIEWICZ B.A., *Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 8426–8431.
64. BAILEY J.F., RICHARDS M.B., MACAULAY V.A., COLSON I.B., JAMES I.T., BRADLEY D.G., HEDGES REM, SYKES B.C., *Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species.* Proc. R. Soc. London Ser. B 1996; 263: 1467-1473.
65. BARNES I., YOUNG J.P.W., DOBNEY K.M., *DNA-based identification of goose species from two archaeological sites in Lincolnshire.* J. Archaeolog. Sci. 2000; 27: 91–100.
66. COLSON I.B., RICHARDS M.B., BAILEY J.F., SYKES B.C., HEDGES REM. *DNA analysis of seven human skeletons excavated from the terp of Wijnaldum.* J. Archaeolog. Sci. 1997; 24: 911–917.

67. JANS M.M.E., NIELSEN-MARSH C.M., SMITH C.I., COLLINS M.J., KARS H., *Characterisation of microbial attack on archaeological bone*. J. Archaeolog. Sci. 2004; 31: 87–95.
68. HOSS M., JARUGA P., ZASTAWNY T.H., DIZDAROGLU M., PÄÄBO S., *DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues*. Nucleic Acids Res. 1996; 24: 1304–1307.
69. NIELSEN-MARSH C.M., HEDGES REM, MANN T., COLLINS M. J., *A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone*. Thermochimica Acta. 2000; 365: 129-139.
70. KOON HEC, NICHOLSON R.A., COLLINS M. J., *A practical approach to the identification of low temperature heated bone using TEM*. J. Archaeolog. Sci. 2003; 13: 1393–1399.
71. SUROVELL T.A. & STINER M.C., *Standardizing Infra-red Measures of Bone Mineral Crystallinity: an Experimental Approach*. J. Archaeolog. Sci. 2001; 28: 633-642.
72. NIELSEN-MARSH C.M., HEDGES REM., *Patterns of Diagenesis in Bone I: The effects of Site Environments*. J. Archaeolog. Sci. 2000; 27: 1139-1150.
73. WRIGHT L.E., SCHWARCZ H.P., *Infrared and Isotopic Evidence for Diagenesis of Bone Apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary Implications*. J. Archaeolog. Sci. 1996; 23: 933-944.
74. Cfr. op. cit. nota 60.
75. Cfr. op. cit. nota 50.
76. Cfr. op. cit. nota 59.
77. Cfr. op. cit. nota 34.
78. MAROTA I., ROLLO F., *Molecular paleontology*. Cell. Mol. Life Sci. 2002; 59: 97-111.
79. BADA J.J., WANG X.S., POINAR H.N., PÄÄBO S., POINAR G.O., *Amino acid racemization in amber-entombed insects: implications for DNA preservation*. Geochim. Cosmochim. Acta. 1994; 58: 3131-3135.
80. BADA J.J., WANG X.S., HAMILTON H., *Preservation of key biomolecules in the fossil record: current knowledge and future challenges*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1999; 354: 77-87.
81. O'CONNEL T.C., HEDGES REM, KLINKEN G.J.V., *An improved method for measuring racemisation of amino acid from archaeological bone collagen*. Ancient Biomol. 1997; 1: 215-220.
82. Cfr. op. cit. nota 64.
83. Cfr. op. cit. nota 62.

84. COLLINS M.J., PENKMAN K.E., ROHLAND N., SHAPIRO B., DOBBERSTEIN R.C., RITZ-TIMME S., HOFREITER M., *Is amino acid racemization a useful tool for screening for ancient DNA in bone?* Proc. Biol. Sci. 2009; 276: 2971–2977.
85. CANN R.L., STONEKING M., WILSON A.C., *Mitochondrial DNA and human evolution.* Nature 1987; 325: 31-36.
86. Cfr. op. cit. nota 5.
87. CAMELLI D., LALUEZA-FOX C., CONDEMI S., LONGO L., MILANI L., MANFREDINI A., DE SAINT PIERRE M., ADONI F., LARI M., GIUNTI P., RICCI S., CASOLI A., CALAFELL F., MALLEGGNI F., BERTRANPETIT J., STANYON R., BERTORELLE G., BARBUJANI G., *A Highly divergent DNA sequence in a Neandertal individual from Italy.* Curr. Biol., 2006; 16: 630-632.
88. LALUEZA FOX C., SAMPIETRO L.M., CAMELLI D., PUDER Y., LARI M., *Neandertal evolutionary genetics: mitochondrial DNA data from the iberian peninsula.* Mol. Biol. Evol. 2005; 22: 1077-1081.
89. GREEN R.E., KRAUSE J., BRIGGS A.W., MARICIC T., STENZEL U., KIRCHER M., PATTERSON N., LI H., ZHAI W., FRITZ M.H., HANSEN N.F., DURAND E.Y., MALASPINAS A.S., JENSEN J.D., MARQUES-BONET T., ALKAN C., PRÜFER K., MEYER M., BURBANO H.A., GOOD J.M., SCHULTZ R., AXIMU-PETRI A., BUTTHOF A., HÖBER B., HÖFFNER B., SIEGEMUND M., WEIHMANN A., NUSBAUM C., LANDER E.S., RUSS C., NOVOD N., AFFOURTIT J., EGHOLM M., VERNA C., RUDAN P., BRAJKOVIC D., KUCAN Z., GUSIC I., DORONICHEV V.B., GOLOVANOVA L.V., LALUEZA-FOX C., DE LA RASILLA M., FORTEA J., ROSAS A., SCHMITZ R.W., JOHNSON P.L., EICHLER E.E., FALUSH D., BIRNEY E., MULLIKIN J.C., SLATKIN M., NIELSEN R., KELSO J., LACHMANN M., REICH D., PÄÄBO S., *A draft sequence of the Neandertal genome.* Science 2010; 328:710-22.
90. GHIROTTI S., TASSI F., BENAZZO A., BARBUJANI G., *No evidence of Neandertal admixture in the mitochondrial genomes of early European modern humans and contemporary Europeans.* Am. J. Phys. Anthropol. 2011; 146: 242-252.
91. FEHREN-SCHMITZ L., REINDEL M., CAGIGAO E.T., HUMMEL S., HERRMANN B., *Pre-Columbian population dynamics in coastal southern Peru: A diachronic investigation of mtDNA patterns in the Palpa region by ancient DNA analysis.* Am. J. Phys. Anthropol. 2010; 141: 208-221.

92. HAAK W., FORSTER P., BRAMANTI B., MATSUMURA S., BRANDT G., TÄNZER M., VILLEMS R., RENFREW C., GRONENBORN D., ALT KW, BURGER J., *Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites*. Science 2005; 310: 1016-1018.
93. LELLI R., ALLEN R., BIONDI G., CALATTINI M., CONATI BARBARO C., GORGOGNONE M. MANFREDINI A., MARTINEZ-LABARGA C., RADINA F., SILVESTRINI M., TOZZI C., RICKARDS O., CRAIG O.E., *Examining dietary variability of the earliest farmers of south-eastern Italy*. Sottomesso a Am. J. Phys. Anthropol.
94. HARRIS EE, MEYER D., *The molecular signature of selection underlying human adaptations*. Am. J. Phys. Anthropol. 2006; Suppl 43: 89-130
95. TISHKOFF S.A., REED F.A., RANCIARO A., VOIGHT B.F., BABBITT C.C., SILVERMAN J.S., POWELL K., MORTENSEN H.M., HIRBO J.B., OSMAN M., IBRAHIM M., OMAR S.A., LEMA G., NYAMBO T.B., GHORI J., BUMPSTEAD S., PRITCHARD J.K., WRAY G.A., DELOUKAS P., *Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe*. Nat. Genet. 2007; 39: 31-40.
96. BURGER J., KIRCHNER M., BRAMANTI B., HAAK W., THOMAS M.G., *Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007; 104: 3736-3741.
97. Cfr. op. cit. nota 76.
98. ENARD W., PRZEWORSKI M., FISHER S.E., LAI C.S., WIEBE V., KITANO T., MONACO A.P., PÄÄBO S., *Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language*. Nature 2002; 418: 869-872.
99. LALUEZA-FOX C., RÖMPLER H., CAMELLI D., STÄUBERT C., CATALANO G., HUGHES D., ROHLAND N., PILLI E., LONGO L., CONDEMI S., DE LA RASILLA M., FORTEA J., ROSAS A., STONEKING M., SCHÖNEBERG T., BERTRANPETIT J., HOFREITER M., *A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals*. Science 2007; 318: 1453-1455.
100. BURBANO H.A., HODGES E., GREEN R.E., BRIGGS A.W., KRAUSE J., MEYER M., GOOD J.M., MARICIC T., JOHNSON P.L., XUAN Z., ROOKS M., BHATTACHARJEE A., BRIZUELA L., ALBERT F.W., DE LA RASILLA M., FORTEA J., ROSAS A., LACHMANN M., HANNON G.J., PÄÄBO S., *Targeted investigation of the Neandertal genome by array-based sequence capture*. Science 2010; 328: 723-725.
101. KIRSANOW K., BURGER J., *Ancient human DNA*. Ann. Anat. 2012; 194: 121-132.

102. Cfr. op. cit. nota 7.
103. RICAUT F.X., AURIOL V., VON CRAMON-TAUBADEL N., KEYSER C., MURAIL P., LUDES B., CRUBÉZY E., *Comparison between morphological and genetic data to estimate biological relationship: the case of the Egin Gol necropolis (Mongolia)*. Am. J. Phys. Anthropol. 2010; 143: 355-364.
104. SPIGELMAN M., LEMMA E., *The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons*. Int.J. Osteoarch. 1993; 3: 137-143.
105. RAFI A., SPIGELMAN M., STANFORD J., LEMMA E., DONOGHUE H., ZIAS J., *Mycobacterium leprae DNA from ancient bone detected by PCR*. Lancet 1994; 343: 1360-1361.
106. DONOGHUE H.D., SPIGELMAN M., GREENBLATT C.L., LEV-MAOR G., BAR-GAL G.K., MATHESON C., VERNON K., NERLICH A.G., ZINK A.R., *Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA*. The Lancet Infectious Diseases 2004; 4: 584-592.
107. WILLERSLEV E., HANSEN A.J., RØNN R., BRAND T.B., BARNES I., WIUF C., GILICHINSKY D., MITCHELL D., COOPER A., *Long-term persistence of bacterial DNA*. Curr. Biol. 2005; 14: R9-10.
108. JOHNSON S.S., HEBSSGAARD M.B., CHRISTENSEN T.R., MASTEPANOV M., NIELSEN R., MUNCH K., BRAND T., GILBERT M.T., ZUBER M.T., BUNCE M., RØNN R., GILICHINSKY D., FROESE D., WILLERSLEV E., *Ancient bacteria show evidence of DNA repair*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 104: 14401-14405.
109. MATHESON C.D., VERNON K.K., LAHTI A., FRATPIETRO R., SPIGELMAN M., GIBSON S., GREENBLATT C.L., DONOGHUE H.D., ZISSU B., *Molecular Exploration of the First-Century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem*. PLoS ONE 2009; 4: e8319.
110. MUTOLO M.J., JENNY L.L., BUSZEK A.R., FENTON T.W., FORAN D.R., *Osteological and Molecular Identification of Brucellosis in Ancient Butrint, Albania*. Am. J. Phys. Anthropol. 2012; 147: 254-263.
111. SCHUENEMANN V.J., BOS K., DEWITTE S., SCHMEDES S., JAMIESON J., MITTNIK A., FORREST S., COOMBES B.K., WOOD J.W., EARN D.J., WHITE W., KRAUSE J., POINAR H.N., *Targeted enrichment of ancient pathogens yielding the pPCP1 plasmid of Yersinia pestis from victims of the Black Death*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011; 108: E746-752.
112. BOS K.I., SCHUENEMANN V.J., GOLDING G.B., BURBANO H.A., WAGLECHNER N., COOMBES B.K., MCPHEE J.B., DEWITTE S.N., MEYER M., SCHMEDES S., WOOD J., EARN D.J., HERRING D.A.,

- BAUER P., POINAR H.N., KRAUSE J., *A draft genome of Yersinia pestis from victims of the Black Death*. Nature 2011; 478: 506-510.
113. ROTHHAMMER F., ALLISON M.J., NUÑEZ L., STADEN V., ARRIZA B., *Chagas disease in pre-Columbian South America*. Am. J. Phys. Anthropol. 1985; 68: 495-498.
114. GUHL F., JARAMILLO C., VALLEJO G.A., YOCKTENG R., CARDENAS-ARROYO F., FORNACIARI G., ARRIAZA B., AUFDERHEIDE A.C., *Isolation of T. cruzi DNA in 4.000-year-old mummified human tissue from northern Chile*. Am. J. Phys. Anthropol. 1999; 108: 401-407.
115. AUFDERHEIDE A.C., SALO W., MADDEN M., STREITZ J., BUIKSTRA J., GUHL F., ARRIAZA B., RENIER C., WITTMERS LE J.R., FORNACIARI G., ALLISON M., *A 9,000-year record of Chagas' disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101: 2034-2039.
116. EMPERAIRE L., ROMANA C.A., *Triatominae et Cactaceae: un risque pour la transmission de la trypanosomose Americaine dans le peridomicile (Nord-Est du Bresil)*. Parasite 2006; 13: 171-178.
117. OTTINI L., FALCHETTI M., MARINOZZI S., ANGELETTI L.R., FORNACIARI G., *Gene-environment interactions in the pre-Industrial Era: the cancer of King Ferrante I of Aragon (1431-1494)*. Hum. Pathol. 2011; 42: 332-339.
118. TANNOCK I., HILL R., BRISTOW R., HARRINGTON L., *The basic science of oncology (4th ed.)*. New York, McGraw-Hill, 2005.
119. CASTAGNOLA P., GIARETTI W., *Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer*. Biochim. Biophys. Acta 2005; 1756: 115-125.
120. CHO N.Y., CHOI M., KIM B.H., CHO Y.M., MOON K.C., KANG G.H., *BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma*. Int. J. Cancer. 2006; 119: 1858-1862.
121. OGINO S., GOEL A., *Molecular classification and correlates in colorectal cancer*. J. Mol. Diagn. 2008; 10: 13-27.

Correspondence should be addressed to:

Flavio De Angelis. E-mail: flavio.de.angelis@uniroma2.it

