

Articoli/Articles

LA PALEOPATOLOGIA MOLECOLARE: IL FUTURO
PER INDAGARE IL PASSATO

LAURA OTTINI*, RAMONA LUPI*, MARIO FALCHETTI*,
GINO FORNACIARI[#], RENATO MARIANI-COSTANTINI[°],
LUCIANA RITA ANGELETTI*

*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Sezione di Storia della
Medicina, Università "La Sapienza", Roma; [°]Dipartimento di Oncologia e
Neuroscienze, Università "Gabriele D'Annunzio", Chieti; [#]Dipartimento di
Oncologia, Trapianti e Tecnologie Avanzate in Medicina, Divisione di
Patologia, Sezione di Storia della Medicina e Paleopatologia, Università di Pisa

SUMMARY

*MOLECULAR PALEOPATHOLOGY: A NOVEL PERSPECTIVE
FOR BIOMEDICAL HISTORY*

Molecular paleopathology is an emerging field that is devoted to the detection, identification and characterization of the molecular signatures in past diseases. When studied with modern molecular techniques, ancient human remains may yield direct informations on the diseases of ancient populations as well as on the history of human diseases. Data concerning specific diseases of infectious, neoplastic and genetic origin can be obtained by molecular investigations of skeletal and mummified human remains. In particular, ancient DNA extracted from bone tissue, teeth and mummified soft tissues can be deeply analyzed by using PCR-based molecular techniques. Additionally, DNA of ancient pathogens, including bacteria, viruses and parasites, can be isolated from human remains and molecular diagnosis of infectious diseases can be made. Thus, molecular data, complemented by morphological and biochemical analyses, could help to reconstruct the epidemiology of past diseases and epidemics.

Key words: Paleopathology - Ancient DNA - Infectious diseases - Neoplastic diseases

Introduzione

La paleopatologia è una disciplina che studia le malattie delle popolazioni del passato, riferendo i quadri patologici a specifici contesti ambientali, antropologici, archeologici e storico-culturali. La ricerca paleopatologica si basa sull'analisi delle fonti dirette, rappresentate principalmente da resti umani antichi, scheletrici o mummificati. Le tecnologie biochimiche, biofisiche e molecolari che oggi contribuiscono allo sviluppo della medicina moderna aprono nuove prospettive anche per lo studio delle patologie nel passato. I progressi delle conoscenze sui meccanismi molecolari alla base delle malattie ed il miglioramento delle tecniche d'indagine hanno aperto nuove prospettive di sviluppo per la paleopatologia ed hanno permesso la nascita di una nuova disciplina: la paleopatologia molecolare (Fig. 1).

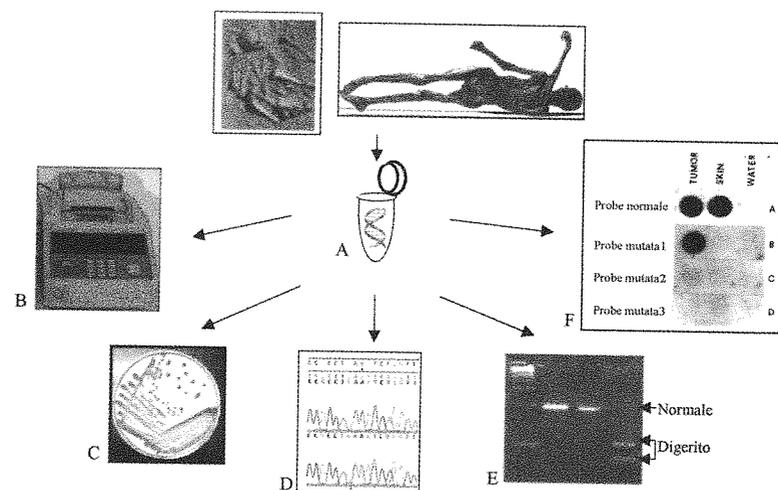


Fig. 1 - Esempio di metodiche utilizzate per le analisi di paleopatologia molecolare. Da resti antichi scheletrici o mummificati si estrae il DNA (A); attraverso la PCR, reazione polimerasica a catena (B), e il clonaggio (C) si possono riprodurre "in vitro" milioni di copie di sequenze specifiche di DNA antico; la sequenza delle singole basi che compongono il frammento di DNA amplificato per PCR o per clonaggio, può essere letta mediante analisi di sequenza (D); la presenza di mutazioni in regioni note di DNA può essere rivelata usando enzimi di restrizione, RFLP, polimorfismo di lunghezza del frammento di restrizione (E); o per ibridizzazione con sonde molecolari specifiche, Dot-Blot (F).

Le nuove prospettive d'indagine paleopatologica: la paleopatologia molecolare

La paleopatologia molecolare rappresenta un nuovo settore di indagine paleopatologica volto alla identificazione e caratterizzazione molecolare delle patologie osservate in reperti umani antichi. Lo sviluppo delle tecnologie molecolari avvenuto negli ultimi decenni ha consentito di studiare l'informazione genetica contenuta anche in minime tracce di DNA, molecola che, in determinate condizioni, può persistere in resti biologici antichi, quali ossa o tessuti mummificati. Miliardi di copie di DNA possono essere riprodotte in una provetta a partire da una singola copia stampo ottenuta da una sola cellula attraverso la metodica della PCR (*Polimerase Chain Reaction*, reazione polimerasica a catena) e la successione delle singole basi che compongono il DNA può essere svelata attraverso l'analisi di sequenza. Lo studio del DNA ottenuto da reperti scheletrici antichi, DNA antico (aDNA), può permettere di ricostruire vicende biologiche perdute con l'arresto dei processi vitali. A partire dal 1984, anno in cui per la prima volta veniva isolato DNA antico da un campione di muscolo essiccato di quagga, specie di equide estinto circa 150 anni fa¹, si sono susseguiti studi sul DNA antico proveniente da resti scheletrici umani, quali tessuti ossei e dentari, capelli e tessuti mummificati. Oggi, le indagini di paleopatologia molecolare sono rese possibili dagli affinamenti delle tecnologie di estrazione degli acidi nucleici da materiale antico, e dalla messa a punto di strategie di amplificazione *in vitro* tramite PCR specificamente adattate allo studio di acidi nucleici degradati. Da un punto di vista temporale, il limite di sopravvivenza del DNA antico è stimato tra i 50.000 e i 100.000 anni. Tra le condizioni che favoriscono la conservazione del DNA vi sono il congelamento, la disidratazione, la sterilità e l'anossia, condizioni che nel caso di resti antichi spesso non si sono verificate. La paleopatologia molecolare è quindi condizionata dal limite imposto dai processi tafonomici che influenzano il grado di conservazione del DNA endogeno antico. Poiché molto spesso i resti archeologici sono in uno stato di conservazione tale

da non contenere DNA endogeno, prima di procedere all'isolamento del DNA antico, si devono effettuare opportuni esperimenti di controllo. Tra questi il più rapido ed efficace consiste nell'analisi dello stato di racemizzazione degli amminoacidi, che permette di identificare, tra i vari resti archeologici, quelli in cui lo stato di preservazione è tale da lasciar supporre che il recupero del DNA antico sia possibile. I fattori limitanti l'indagine molecolare su reperti antichi sono legati al fatto che il DNA antico è scarso e danneggiato, per cui qualsiasi traccia di DNA contaminante moderno può portare a fallaci interpretazioni. La possibile contaminazione con sequenze di DNA moderno deve essere sempre evitata adottando specifiche precauzioni nel corso del recupero, dell'analisi e della conservazione dei reperti biologici antichi. Lo studio del DNA antico può basarsi anche sull'analisi di sequenze geniche presenti nel DNA contenuto nei mitocondri. Il DNA mitocondriale (mtDNA) presenta alcuni vantaggi rispetto al DNA contenuto nel nucleo. A differenza del DNA nucleare, presente solo in due copie per cellula, il DNA mitocondriale ha copie multiple per cellula (circa 10^3 - 10^4 copie) e possiede la caratteristica di accumulare variabilità genetica in modo più spiccato rispetto al DNA genomico. Il DNA mitocondriale, non essendo soggetto al processo di ricombinazione, evolve esclusivamente per accumulo sequenziale di mutazioni lungo linee femminili di radiazione e pertanto fornisce informazioni esclusivamente sulla linea materna. I polimorfismi silenti accumulati nel DNA mitocondriale sono di antica origine e correlati all'appartenenza etnica ed alla provenienza geografica dei singoli individui. Negli studi sull'evoluzione di specie diversificate recentemente, come la popolazione umana, il mtDNA si comporta quindi come un preciso orologio molecolare.

La paleopatologia molecolare: analisi delle malattie infettive, ereditarie e neoplastiche

Attraverso indagini di paleopatologia molecolare la presenza di malattie infettive, malattie ereditarie e neoplasie può essere

indagata a livello di DNA di resti umani antichi (Fig. 2). L'analisi molecolare del DNA genomico di patogeni eventualmente conservatisi in resti umani antichi può contribuire alla ricostruzione della storia delle malattie infettive. La ricerca del DNA di agenti patogeni (batteri, virus, protozoi, miceti) all'interno del DNA estratto da resti antichi permette di verificare la presenza di specifiche malattie infettive nell'area geografica e nel periodo storico a cui i resti in esame appartengono. Le prime indagini di paleopatologia molecolare delle malattie infettive si sono rivolte alla ricerca di microrganismi che hanno la capacità di infettare direttamente l'apparato scheletrico dando luogo a lesioni infiammatorie croniche che risultano in alterazioni morfologiche evidenti a livello macroscopico, come la tubercolosi e la lebbra. I micobatteri sono stati, infatti, i primi agenti patogeni ad essere identificati attraverso la metodica della PCR in resti umani antichi. Risale al 1993 il primo isolamento del DNA del *Mycobacterium tuberculosis*, agente causale della tubercolosi, in reperti scheletrici umani antichi². Sequenze di DNA di *Mycobacterium tuberculosis* sono state identificate in lesioni ossee e nei tessuti molli di mummie egiziane ed in mummie precolombiane in Cile^{3, 4, 5}. Questi dati molecolari documentano la presenza di patologie tubercolari sin dalle prime civiltà e indicano che nel Nuovo Mondo la tubercolosi era presente prima del

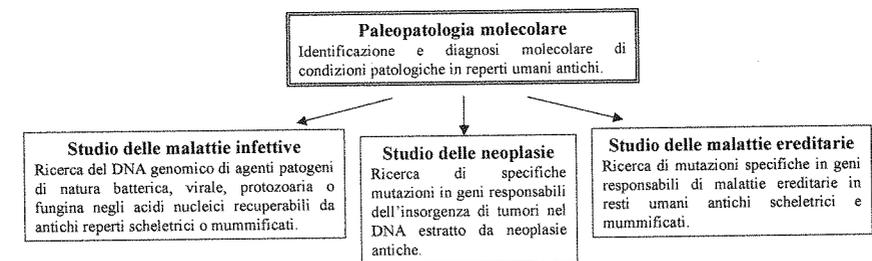


Fig. 2 - Applicazioni della paleopatologia molecolare allo studio delle malattie infettive, delle neoplasie antiche e delle malattie ereditarie.

contatto con gli Europei. Sequenze di DNA del *Mycobacterium leprae*, agente causale della lebbra, sono state identificate in resti scheletrici umani antichi di epoca medievale ed alto-medievale provenienti dall'Inghilterra e dal Medio Oriente⁶ e da individui databili intorno al 300-600 d.C. in Israele. L'analisi molecolare fornisce informazioni obiettive circa la presenza e le caratteristiche genetiche di un determinato patogeno in una determinata epoca e regione, e può confermare a livello molecolare le informazioni desumibili dalle fonti storiche e dai ritrovamenti archeologici. Un esempio è offerto dalla "Peste Giustiniana" e dalla "Morte Nera" di epoca medievale. Dalle fonti storiche si desume che tali pestilenze siano ascrivibili alla peste bubbonica, vista la descrizione della presenza di bubboni negli appestati, e i dati molecolari sembrano confermare tale ipotesi: infatti, sequenze di DNA specifiche per la *Yersinia pestis*, agente eziologico della peste bubbonica, sono state identificate nella polpa dentaria di individui risalenti al V-VI e XII-XIV secolo^{7, 8}. Ritrovamenti archeologici di sepolture multiple, generalmente poste fuori dai tradizionali siti di sepolture, possono essere indicative di eventi catastrofici improvvisi che hanno colpito più individui contemporaneamente, come nel caso di epidemie. Le indagini di paleopatologia molecolare possono contribuire a definire la presenza di specifiche patologie infettive. Un esempio è offerto dagli studi molecolari effettuati su resti scheletrici provenienti da un cimitero infantile del V secolo rinvenuto nei pressi di Lugnano in Teverina in Umbria, non lontano dal confine con il Lazio. Dati archeologici e antropologici ipotizzavano la presenza di tale cimitero come il risultato di una epidemia di malaria, i dati molecolari hanno confermato tale ipotesi evidenziando la presenza nei resti scheletrici di sequenze di DNA di *Plasmodium falciparum*^{9, 10}.

In popolazioni esposte alla malaria si può osservare la ricorrenza di determinate mutazioni nei geni delle globine: il riscontro di tali mutazioni in materiale scheletrico antico può rappresentare un indice suggestivo della presenza di malaria in antiche comunità. Lo

studio di mutazioni geniche costituzionali può permettere di comprendere meglio le mutue interazioni tra patologie ambientali e patologie su base genetica che hanno plasmato il genoma umano nei millenni passati e che giocano oggi un ruolo nella predisposizione ereditaria a diverse malattie come nel caso della malaria e delle emoglobinopatie. Una mutazione nel gene responsabile della β talassemia è stata identificata mediante PCR e successivo sequenziamento in resti scheletrici provenienti da un bambino con gravi patologie ossee in uno scavo archeologico in Israele¹¹.

L'approccio paleopatologico a livello molecolare può anche essere applicato allo studio delle neoplasie. La gran parte dei tumori insorge con il contributo determinante di mutazioni a carico del DNA dovute ad interazione con fattori mutageni di origine ambientale, tra cui agenti infettivi (papillomavirus per diverse neoplasie epiteliali, il virus dell'epatite B per il carcinoma epatocellulare), agenti fisici (radiazioni ultraviolette per le neoplasie cutanee), o chimici (cancerogeni contenuti in determinati alimenti per le neoplasie dell'apparato gastrointestinale). I diversi fattori mutageni possono causare specifici tipi di mutazione del DNA. L'esposizione agli idrocarburi aromatici policiclici, che rappresentano i più importanti composti cancerogeni derivanti dalla combustione di sostanze organiche, è, ad esempio, associata a caratteristiche mutazioni puntiformi del DNA, consistenti in sostituzioni di purine, come la guanina (G) o l'adenina (A) con pirimidine come la timina (T) o la citosina (C), definite trasversioni. Pertanto, nei tumori umani, "impronte mutazionali" riconducibili a determinati cancerogeni possono essere identificate analizzando la struttura dei geni bersaglio nel DNA estratto dalle cellule neoplastiche. Mutazioni puntiformi nella sequenza codificante possono determinare perdita di funzione in geni che sopprimono la trasformazione neoplastica, come il gene p. 53, oppure attivazione di geni che promuovono la crescita tumorale, come i geni ras, e particolarmente il gene K-ras. Nel 1996 è stata dimostrata la presenza di una mutazione puntiforme (GGT→GAT) nel codone 12 del gene K-ras nell'adenocarcinoma mucinoso ritrovato nel corpo mummificato del

Re Ferrante I d'Aragona¹² (Fig. 3). Questi risultati sono particolarmente interessanti considerando che dei tre siti di mutazione specifici di K-ras (codoni 12, 13, e 61) il codone 12 risulta essere il bersaglio di mutazione che più frequentemente oggi si osserva nei tumori coloretali¹³.

Per poter contribuire a gettar luce sulla storia delle neoplasie e sulle relazioni tra tipo di mutazione, stile di vita e fattori di rischio nel corso del tempo, stiamo conducendo, nell'ambito del progetto MIUR "Malattie e regime di vita nell'Italia centro-meridionale dei secoli XIII-XIX: fonti biologiche e storico-letterarie", studi molecolari su tumori identificati in mummie antiche. Uno dei nostri obiettivi è quello di proseguire gli studi iniziati nel 1996 sull'adenocarcinoma mummificato del Re Ferrante I d'Aragona per confermare con metodiche molecolari altamente specifiche, come l'analisi di sequenza, la mutazione sul codone 12 del gene K-ras, inizialmente identificata attraverso ibridazione con una sonda molecolare. A tale scopo il DNA antico è stato estratto sia da un frammento di tumore mummificato sia da sezioni incluse in paraffina del tumore e del tessuto normale di controllo (Fig. 4). Il DNA estratto è stato amplificato per PCR e sottoposto ad analisi di sequenza. Il sequenziamento diretto degli esoni 1 e 2 del gene k-Ras amplificato dal DNA del tumore ha confermato la presenza della mutazione speci-

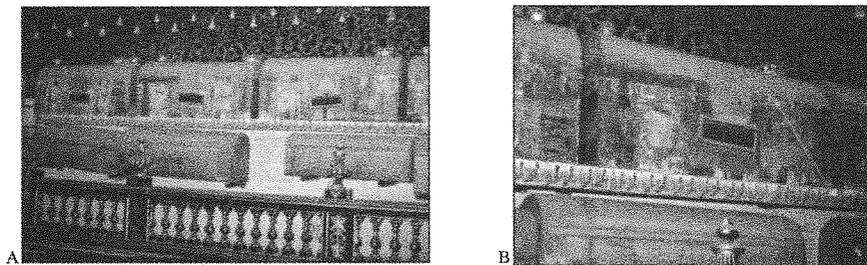


Fig. 3 - Sarcofagi nell'Abbazia di San Domenico Maggiore. La mummia artificiale del Re Ferrante I D'Aragona è stata esumata nell'Abbazia di San Domenico Maggiore a Napoli. I sarcofagi sono disposti su due file: la superiore per i personaggi più importanti, la inferiore per i personaggi minori (A). Dettaglio del sarcofago del Re (B).

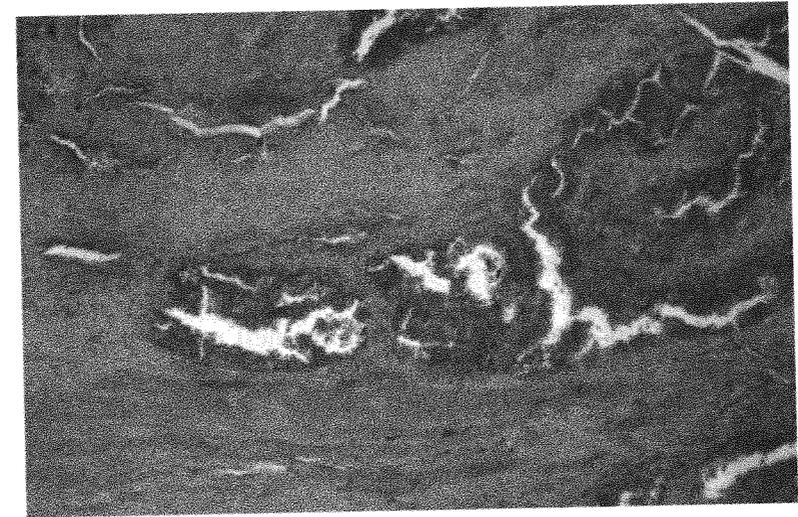


Fig. 4 - L'esame istologico dei tessuti muscolari del piccolo bacino effettuato sui tessuti mummificati della mummia del Re Ferrante I D'Aragona evidenzia un adenocarcinoma infiltrante.

fica (GGT→GAT) al codone 12 del gene K-ras. È interessante osservare che nei tumori coloretali si ha una maggiore suscettibilità al danno dei cancerogeni che determinano formazione di addotti

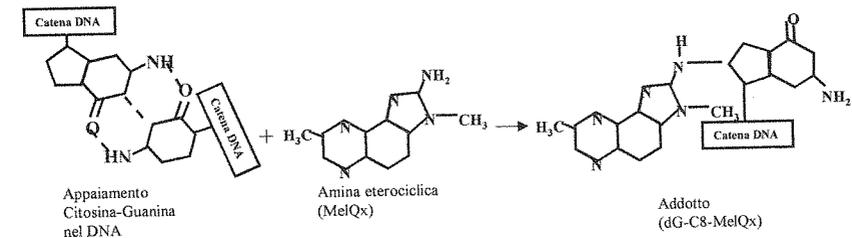


Fig. 5 - Formazione di addotti al DNA. Le amine eterocicliche possono generarsi quando la temperatura di cottura di alcuni alimenti, quali le carni, raggiungono temperature maggiori di 150°C, e diventano cancerogene una volta metabolizzate da enzimi come la N-acetiltransferasi, durante i processi digestivi. La formazione di addotti sul DNA provoca l'insorgenza di mutazioni.

sul DNA (Fig. 5) ed in particolare, la presenza di mutazioni al codone 12 si associa con l'esposizione a carcinogeni chimici inclusi gli idrocarburi aromatici policiclici e le amine eterocicliche contenute in determinati alimenti, tra cui la carne rossa, il cui largo consumo è considerato fattore di rischio per il tumore del colon^{14, 15}. I cronachisti dell'epoca riferiscono la forte predilezione del re Ferrante I d'Aragona per le carni rosse, in particolare la selvaggina. Gli studi di paleopatologia molecolare condotti su neoplasie rilevate in antiche mummie suggerisce, quindi, che gli stessi meccanismi molecolari responsabili dello sviluppo dei tumori nell'uomo attuale siano stati responsabili delle patologie neoplastiche del passato.

Conclusioni

Il DNA, la molecola della vita, racchiude in sé la storia biologica di ciascun individuo, il suo passato ed il suo futuro. L'analisi del DNA consente oggi alla medicina molecolare di predire il rischio futuro di malattie e alla paleopatologia molecolare di ricostruire la storia delle malattie stesse.

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(5991):282-284.
2. SPIGELMAN M. & LEMMA E., *The use of polymerase chain reaction to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons*. Int. J. Osteoarcheol. 1993; 3:143.
3. CRUBEZY E., LODES B., POVEDA J. D., CLAYTON J., CROUAEU-ROY B., MONTAGNON D., *Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old*. C R Acad Sci III 1998; 321(11):941-951.
4. SALO W. L., AUFDERHEIDE A. C., BUIKSTRA J., HOLCOMB T. A. *Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(6):2091-2094.
5. ARRIAZA B.T., SALO W., AUFDERHEIDE A. C., HOLCOMB T. A. *Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence*. Am J Phys Anthropol. 1995; 98(1):37-45.

6. RAFI A., SPIGELMAN M., STANFORD J., LEMMA E., DONOGHUE H., ZIAS J., *Mycobacterium leprae DNA from ancient bone detected by PCR*. Lancet 1994; 343(8909):1360-1361.
7. DRANCOURT M., ABOUDHARAM G., SIGNOLI M., DUTOUR O., RAOULT D., *Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(21):12637-12640.
8. DRANCOURT M., RAOULT D. *Molecular detection of Yersinia pestis in dental pulp*. Microbiology. 2004;150 (Pt 2):263-4; discussion 264-265.
9. ABBOTT A., *Earliest malaria DNA found in Roman baby graveyard*. Nature 2001; 412(6850):847.
10. SALLARES R. and GOMZI S., *Biomolecular archaeology of malaria*. Anc. Biomol. 2001; 3:195-203.
11. FILON D., FAERMAN M., SMITH P., OPPENHEIM A., *Sequence analysis reveals a beta-thalassaemia mutation in the DNA of skeletal remains from the archaeological site of Akhziv, Israel*. Nat Genet. 1995; 9(4):365-368.
12. MARCHETTI A., PELLEGRINI S., BEVILACQUA G., FORNACIARI G., *K-RAS mutation in the tumour of Ferrante I of Aragon, King of Naples*. Lancet 1996; 347(9010):1272.
13. BURMER G. C., LOEB L. A., *Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma*. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86(7):2403-2407.
14. PALLI D., RUSSO A., OTTINI L., MASALA G., SAIEVA C., AMOROSIA., CAMA A., D'AMICO C., FALCHETTI M., PALMIROTTA R., DECARLI A., COSTANTINI R.M., FRAUMENI J. F. Jr., *Red meat, family history, and increased risk of gastric cancer with microsatellite instability*. Cancer Res. 2001; 61(14):5415-5419.
15. CHAO A., THUN M. J., CONNELL C. J., MCCULLOUGH M. L., JACOBS E. J., FLANDERS W. D., RODRIGUEZ C., SINHA R., CALLE E. E., *Meat consumption and risk of colorectal cancer*. JAMA 2005; 293(2):172-182.

Ringraziamenti: Studio finanziato da MIUR-COFIN fondi "40%" "Malattie e regime di vita nell'Italia centro-meridionale dei secoli XIII-XIX: fonti biologiche e storico-letterarie".

Correspondence should be addressed to:

Laura Ottini, Department of Experimental Medicine and Pathology, University "La Sapienza", Policlinico Umberto I, Viale Regina Elena 324, 00161, Rome, Italy
Phone: +39-06-49973009; Fax: +39-06-4454820, e-mail: ottini@yahoo.com