

La Racemización del ácido aspártico: método del zilch para el DNA antiguo.

H. Torres-Silva

1. Introducción

La arqueología biomolecular se refiere al estudio del material bioquímico obtenido de especímenes arqueológicos. Este material molecular incluye proteínas sanguíneas, fibras de colágeno, resinas, ácidos grasos e incluso DNA. En este sentido, ciertas técnicas de biología molecular han resultado de gran utilidad para investigar los restos de poblaciones del pasado.

En los últimos 20 años, el “DNA antiguo” se ha obtenido de momias egipcias, especies extintas, e incluso de DNA preservado en ámbar de millones de años.

Sin embargo, este campo tiene importantes dificultades, dado el problema de la supervivencia del DNA, la contaminación desde fuentes modernas y la reproductibilidad.

Son muchos los métodos que se están ensayando para demostrar si el DNA obtenido de estas muestras es auténtico o si por el contrario es un falso positivo, así como para poder datar con certeza ese tipo de muestras. Uno de estos métodos es el de la racemización del ácido aspártico.

Desde las investigaciones de Helfman y Bada (1) en 1975, uno de los caminos abiertos para la comprobación del “DNA antiguo” y la estimación de la edad cronológica de materiales biológicos es, al parecer con una precisión razonablemente buena, la extensión de la racemización de los aminoácidos.

Los isómeros ópticos son compuestos con la misma fórmula molecular pero que difieren en el camino que rotan en el plano de la luz polarizada. A los isómeros, imágenes especulares uno de otro, se les denomina “enantiómeros” y se dice que son ópticamente activos por su capacidad para hacer girar el plano de la luz polarizada cuando se examinan en un polarímetro. El enantiómero que rota el plano de luz polarizada a la derecha, se denomina D-isómero y el que lo hace a la izquierda, L-isómero.

Si hay una mezcla equimolar de dos enantiómeros, se habla de mezcla racémica o racemato. Esta mezcla equimolar es ópticamente inactiva, aunque los enantiómeros que la forman sean activos, puesto que la mitad de las moléculas rotan a la derecha y la otra mitad a la izquierda, dando un resultado de no rotación aparente.

Los isómeros ópticos aparecen en aquellos compuestos que tienen al menos un centro quiral, es decir, un carbono con cuatro sustituyentes distintos. Salvo la glicocola que no posee ninguno de estos centros quirales, el resto de los aminoácidos si lo poseen (dando lugar a dos estereoisómeros o enantiómeros diferentes), a excepción de la treonina e isoleucina que poseen dos, por lo que pueden dar lugar a cuatro estereoisómeros.

Todos los aminoácidos que aparecen en la naturaleza y que se emplean en la síntesis de proteínas, pertenecen a la forma estereoquímica L. Sin embargo, una vez aislados de los procesos metabólicos activos, los L-aminoácidos sufren una “racemización”, es decir, van transformándose gradualmente en formas D-enantiómero, hasta constituirse en una mezcla equimolar DL o racemato, ópticamente inactiva. Esta racemización se produce en tejidos metabólicamente inactivos, observándose que, con bastante precisión, la relación entre las dos formas estereoquímicas, es una expresión de la edad.

La tasa a la cual tiene lugar la racemización, difiere para cada aminoácido, y a su vez, depende de la presencia de agua, de la temperatura, del pH y de la quelación de ciertos iones metálicos a las proteínas. Además, la racemización se ve afectada también por algunos de los mismos factores que afectan a la depuración del DNA, la principal reacción hidrolítica responsable de la degradación espontánea de los ácidos nucleicos.

De todos los aminoácidos estudiados con estos propósitos, parece que es el ácido aspártico el que aporta mejores resultados dado que su tasa de racemización (0.1% al año) es más rápida que la de los otros (2).

2. Desarrollo de la ecuación de propagación para conjunto de moléculas de aminoácidos como un medio dispersivo, no lineal y quiral:

Las ecuaciones de Maxwell son:

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (1)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J}_f \quad (2)$$

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho_f \quad (3)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (4)$$

Donde la densidad de corriente en el interior del aminoácido: $\vec{J}_f = \sigma \vec{E}$
y asumiendo además que $\rho_f = 0$

Según la ecuación de Fedorov para medios quirales isotrópicos se adopta el siguiente formalismo:

$$\vec{D} = \epsilon_n \vec{E} + \epsilon \beta \nabla \times \vec{E} \quad (5)$$

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H} + \mu_0 \beta \nabla \times \vec{H} \quad (6)$$

Reemplazando la ecuación (5) en (2) y aplicando rotor, se tiene:

$$\nabla \times \nabla \times \vec{H} = \varepsilon_n \frac{\partial}{\partial t} \nabla \times \vec{E} + \varepsilon \beta \frac{\partial}{\partial t} \nabla \times \nabla \times \vec{E} + \sigma \nabla \times \vec{E} \quad (7)$$

De igual forma reemplazando (6) en (1) y aplicando rotor:

$$\nabla \times \nabla \times \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial}{\partial t} \nabla \times \vec{H} - \mu_0 \beta \frac{\partial}{\partial t} \nabla \times \nabla \times \vec{H} \quad (8)$$

Usando la identidad vectorial: $\nabla \times \nabla \times \vec{A} = \nabla (\nabla \cdot \vec{A}) - \nabla^2 \vec{A}$

Y considerando que $\nabla \cdot \vec{E} = 0$ se reemplaza (7) en (8), de manera de dejar una expresión que contenga solo el campo eléctrico, obteniéndose lo siguiente:

$$\begin{aligned} \nabla^2 \vec{E} + \mu_0 \varepsilon \beta^2 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \nabla^2 \vec{E} &= \mu_0 \varepsilon_n \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} + \mu_0 \varepsilon \beta \frac{\partial^2}{\partial t^2} \nabla \times \vec{E} + \mu_0 \sigma \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \\ &+ \mu_0 \beta \varepsilon_n \frac{\partial^2}{\partial t^2} \nabla \times \vec{E} + \mu_0 \beta \sigma \frac{\partial}{\partial t} \nabla \times \vec{E} \end{aligned} \quad (9)$$

Por otra parte la permitividad puede aproximarse como:

$$\varepsilon_n = \varepsilon + \varepsilon_2 |\vec{E}|^2$$

Reemplazando este último en la ecuación (9) se tiene:

$$\begin{aligned} \nabla^2 \vec{E} \left(1 + \mu_0 \varepsilon \beta^2 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) &= \mu_0 \varepsilon \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} + \mu_0 \varepsilon_2 |\vec{E}|^2 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} + \mu_0 \varepsilon \beta \frac{\partial^2}{\partial t^2} \nabla \times \vec{E} + \mu_0 \sigma \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \\ &+ \mu_0 \varepsilon \beta \frac{\partial^2}{\partial t^2} \nabla \times \vec{E} + \mu_0 \varepsilon_2 \beta |\vec{E}|^2 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \nabla \times \vec{E} + \mu_0 \sigma \beta \frac{\partial}{\partial t} \nabla \times \vec{E} \end{aligned} \quad (10)$$

Usando además que:

$$\beta = \mu_0 \varepsilon_2, \quad \alpha = \mu_0 \sigma, \quad v^2 = \frac{1}{\mu_0 \varepsilon}$$

El zilch se obtiene de estas expresiones. La idea es que el parámetro quiral β depende del fosil. De estas expresiones se puede obtener la ecuación que expresa la racemización del aminoácido aspártico. Esto se logra a través de una ley de tasa reversible de primer orden:

$$\text{Ln} \left(\frac{1 + \frac{D}{L}(\beta)}{1 - \frac{D}{L}(\beta)} \right)_t - \text{Ln} \left(\frac{1 + \frac{D}{L}(\beta)}{1 - \frac{D}{L}(\beta)} \right)_{t=0} = 2K_1 t \quad (11)$$

donde D/L son funciones de la quiralidad del hueso y es la relación de formas D y L de la muestra en concentración, t es el tiempo y el término logarítmico a t=0 describe la

cantidad de ácido D-aspartico formado mediante el procedimiento de hidrólisis estándar de péptidos para obtención de los aminoácidos de la muestra (con HCl 6 M a 100 °C durante 6 horas).

Aplicando esta ecuación se han analizado para el cálculo de la edad cronológica, tejidos como discos intervertebrales (3), cerebro (4), parénquima pulmonar (5), dientes (6,7) y huesos (8), comprobándose que esta medida es posible cuando el tejido contiene una concentración lo suficientemente elevada de proteínas que se sintetizaron en vida y que no se han modificado. Tales proteínas, metabólicamente estables, cuya edad se corresponde bastante fielmente con la edad del organismo, están en tejidos con una tasa baja de turn-over proteico.

Los estudios más exhaustivos se han realizado en hueso, cartílago, discos intervertebrales y dientes, observándose que la tasa de racemización es de $5,3 \times 10^{-3}$ (9) para la fracción peptídica ácido-soluble de la dentina; de $3,1 \times 10^{-3}$ para el cartílago (2), de sólo 2×10^{-3} para la correspondiente fracción de hueso (8), de $2,8 \times 10^{-3}$ para el anillo fibroso periférico, y de 4×10^{-3} para el núcleo pulposo (3). En la fracción de colágeno ácido-insoluble de la dentina es de $1,0 \times 10^{-3}$, con un valor en hueso de sólo $0,47 \times 10^{-3}$.

Como se comprueba, en el hueso la cantidad relativa de ácido D-aspartico es menor que en otros tejidos estudiados, siendo una de las explicaciones más aceptadas, la elevada remodelación del hueso (mayor que en dentina o en cartílago), o la posible existencia de contaminación con proteínas de otras fuentes como tejido conectivo y sangre que pueden incrementar de forma significativa la cantidad de forma L (8).

La diferencia entre los dos compartimentos de la dentina se puede explicar dado que el colágeno en este tejido no está sujeto a ninguna remodelación, mientras que la fracción peptídica ácido-soluble puede tener intercambio nutricional con la circulación a través de los túbulos y peritúbulos de dentina (10).

En relación a los discos intervertebrales, la tasa de racemización es mayor en el núcleo pulposo que en el anillo fibroso; sin embargo, la correlación entre la edad y esa tasa de racemización se ha demostrado que es mucho más débil para el núcleo pulposo que para el anillo fibroso. Esto se ha explicado porque el núcleo pulposo sufre un considerable estrés mecánico que induce cambios estructurales y bioquímicos incluso en adultos jóvenes (3). Este aspecto es fundamental, ya que la tasa de racemización de los aminoácidos no sólo depende de la temperatura ambiente y los otros factores citados, sino también del “ambiente bioquímico” de los aminoácidos. Sin embargo, aún en el caso de emplear anillos fibrosos, todos los autores están de acuerdo en que la estimación de la edad mediante este método es mucho más precisa en dentina que en discos intervertebrales, especialmente si éstos muestran degeneración marcada como, por ejemplo, osteofitos o formación de tejido cicatricial.

De este modo, parece evidente que es en dentina donde los resultados son más fiables, variando los errores de estimación de edad desde ± 7 -9 años (9) a $\pm 12,5$ años (10).

Pero, además, hay que tener en cuenta, que cuando las muestras son muy pequeñas (menos de 0,5 mg de dentina), la posible contaminación con proteínas de

otras fuentes, tales como sangre o tejidos pulpar o periodontal, puede incrementar de forma significativa la cantidad relativa de forma L- dando una baja estimación de la edad. De forma parecida, la contaminación con bacterias con forma D-aspártico en sus paredes celulares, puede producir una edad aparentemente mayor.

En sujetos vivos, las diferencias normales de temperatura corporal (36,5 a 37,6 °C) se ha visto que influyen en la tasa de racemización de tal manera que la determinación de la edad de individuos ancianos puede diferir en hasta 20 años (11). Este hallazgo debe tenerse siempre en cuenta a la hora de valorar los resultados de determinación de edad cronológica de restos antiguos que hayan permanecido en zonas climáticas templadas, desérticas o de fríos intensos. También, la importancia de la temperatura se demuestra en otros aminoácidos estudiados como alanina y leucina (12) en los que se ha visto que las modificaciones de su tasa de racemización son tan acusadas por acción de la temperatura, que su aplicación no es útil en la mayoría de los casos.

En relación al otro aspecto que señalábamos al principio de esta revisión, el método de racemización del ácido aspártico ha puesto de manifiesto que también es válido para valorar la posibilidad de obtener DNA fiable de muestras muy antiguas, de modo que se ha podido observar que no es posible obtener una secuencia fiable de DNA cuando la relación D/L aspártico es mayor de 0,08 (12).

Además, hay una clara relación entre la racemización del ácido aspártico y la longitud de la secuencia de DNA, de modo que en muestras con una DL igual a 0,05 se obtienen secuencias de entre 140 y 340 pares de bases, mientras que con muestras con tasas más elevadas de racemización, sólo se pueden obtener fragmentos más cortos de DNA (13).

La mayor parte de los autores están de acuerdo (12) en que el valor DL igual a 0,1 es el límite para obtener secuencias de DNA fiables, lo que a su vez limita a su obtención en restos de pocos miles de años en regiones calientes como Egipto y a unos 10^5 en regiones frías, retomando así la importancia de la temperatura.

La aplicación de este método precisa estudios más exhaustivos para poder ser utilizado con absoluta fiabilidad, lo que pondría en tela de juicio hallazgos como la obtención de DNA de restos de dinosaurios descrita en los últimos 5 años. De hecho, hay ya muchos expertos que basándose en este método de racemización, no admiten la autenticidad del DNA obtenido de restos óseos del dinosaurio de Utah, en los que la relación DL del ácido aspártico fue de 0,21 y en los que además, el valor de racemización de la alanina fue mayor que el del aspártico, lo que parece indicar que los aminoácidos presentes en la muestra eran una mezcla de edades diferentes (14). Algo similar puede aplicarse al estudio del hueso de *Tyrannosaurus rex* encontrado en Montana, cuya tasa DL del ácido aspártico fue de 0,23 con una mayor racemización de la alanina, lo que para muchos es indicativo de presencia de aminoácidos contaminantes.

Los autores que defienden el método de racemización parecen estar de acuerdo en que siempre la tasa de transformación DL del aspártico debe ser mayor que la de otros aminoácidos, no pudiendo obtenerse secuencias de DNA auténtico cuando la racemización no sigue este modelo.

Conclusiones

El método de racemización del ácido aspártico es útil para la estimación de la edad cronológica de una muestra biológica antigua, basándose en el hecho de que los aminoácidos que se incorporan a los péptidos y proteínas existen en su forma L después de la formación, pero que posteriormente se van transformando lentamente en una mezcla racémica de formas D y L si el tejido no está sujeto a renovación fisiológica, con la ventaja adicional de que sólo se precisan muestras de unos pocos miligramos para realizar el análisis, obteniéndose los resultados en pocos días.

El valor de la tasa de transformación es de 0,1% al año, siendo esto especialmente cierto para tejidos estables como la dentina, y más impreciso para otros tejidos como cartílago, discos intervertebrales o hueso, por lo que tales restos sólo se emplearán cuando no sea posible disponer de dientes. Aún en este último tipo de muestras se recomienda, sin embargo, tener muy presente que la tasa de racemización se va a ver afectada en importante medida por la temperatura, el pH y el contenido de agua, por lo que siempre será necesario considerar el error de estimación no sólo en relación al coeficiente de correlación sino también del intervalo de confianza.

Por último, parece que el estudio de la racemización de los aminoácidos supone un camino para identificar la data de restos muy antiguos y especialmente para establecer en cuáles de estos restos no es de esperar que sea posible obtener un DNA auténtico, eliminando los falsos positivos que pueden darse en métodos como la reacción de la cadena de polimerasa.

Agradecimientos

Bibliografía

- (1) Helfman PH, Bada J.L. (1975). Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc Natl Acad Sci. USA* 72: 2891-2894.
- (2) Rodríguez Albarrán M et al, La Racemización del ácido aspártico: su utilidad como método de estimación de la edad cronológica y preservación del DNA antiguo. Revisión. Publicación interna
Laboratorio de Toxicología. Dpto. Medicina Legal. Univ. Complutense. 28040-Madrid
- (3) Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A (1995). Estimation of chronologic age using the aspartic acid racemization method I. On human rib cartilage. *Int J Legal Med* 108: 19-23
- (4) Ritz S, Schütz HW (1993). Aspartic acid racemization in intervertebral disc as an aid to postmortem estimation of age death. *J Forensic Sci* 38: 633-640.
- (5) Man EH, Sandhouse ME, Burg J, Fisher GH (1983). Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. *Science* 220: 1407-1408.
- (6) Shapiro SD, Endicott SK, Provance MA, Pierce JA, Campbell EJ (1991). Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons --related radiocarbon. *J Clin Invest* 87: 1828-1834.

- (7) Masters PM (1986). Age at death determinations for autopsied remains based on aspartic acid racemization in tooth dentine: importance of postmortem conditions. *Forensic Sci Int* 32: 179-184.
- (8) Ohtani S, Yamamoto K (1991). Age estimation using the racemization of amino acid in human dentine. *J Forensic Sci* 36: 792-800.
- (9) Turzynski A, Ritz S (1994). Demonstration of the marked longevity and low turnover of osteocalcin in bone. *Exp Clin Endocrinol* 102 [Suppl 1]: 104.
- (10) Mörnstad H, Pfeiffer H, Teivens A (1994). Estimation of dental age using HPLC-technique to determine the degree of aspartic acid racemization. *J Forensic Sci* 39: 1425-1431.
- (11) Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A (1995). Estimation of chronologic age using the aspartic acid racemization method II. On human cortical bone. *Int J Legal Med* 108: 24-26.
- (12) Helfman PM, Bada JL (1976). Aspartic acid racemization in dentine as a measure of ageing. *Nature* 262, n° 5566: 279-281.
- (13) Poinar H, Höss M, Bada JL, Pääbo S (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272: 864-866.
- (14) Lindahl T (1993). *Nature* 365: 700.
- (15) Pääbo S, Wilson AC (1991). *Curr Biol* 1:45.