

La degradación natural del ADN: el concepto de edad térmica

GARZÓN L

Rev. Esp. Antrop. Biol. (2002) **23**: 65-76

Recibido: 28 octubre 2003

Departamento de Energía., Universidad de Oviedo. Independencia, 13, 33004 Oviedo. E-mail: lgarzon@etsimo.uniovi.es

Palabras clave: depurinización, edad térmica, energía de activación, estabilidad, historia térmica, neandertales, supervivencia

A partir de los datos obtenidos por Lindahl y Nyberg se han estudiado los principales aspectos de la reacción de depurinización del ADN. Por ser más adecuada, en lugar de la ecuación de Arrhenius, se ha utilizado la de Glasstone, Laidler y Eyring. Se ha obtenido un valor de $30172 \pm 43 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para la energía libre de activación. La vida-media del ADN en el proceso de depurinización aumenta al disminuir la temperatura. La formulación del concepto de edad térmica ha sido rigurosamente establecida.

© 2004 *Sociedad Española de Antropología Física*

Introducción

En comparación con los polímeros inorgánicos naturales (silicatos, formalmente mezclas de óxidos), las moléculas orgánicas en general y los biopolímeros en particular (proteínas y ADN) son inestables, circunstancia que se debe al hecho de que en presencia de oxígeno se transforman espontáneamente en óxidos, que constituyen uno de los compuestos más estables de la naturaleza. La existencia de excepciones en la estabilidad, representadas principalmente por los combustibles fósiles, que según lo anterior deberían haberse transformado en óxidos, se explica en función de su localización en la corteza terrestre, que suele estar protegida de la acción de las moléculas ambientales, principalmente oxígeno y agua. Las partes duras de los organismos, los esqueletos, inorgánicos, perduran más tiempo que el resto del ser vivo, aún sin tener en cuenta su eventual fosilización que, como es sabido, es un proceso mucho más lento que cualquiera de los anteriores. Cuando los biopolímeros se encuentran formando parte de los seres vivos, su comportamiento difiere del que muestran en su estado natural.

Proteínas y ADN son macromoléculas. La diferencia morfológica entre ellas reside en que la hebra de las primeras, una cadena de aminoácidos, se encuentra plegada, mientras que ese tipo de plegamiento no existe en el ADN, que es una cadena de nucleótidos. El carácter informático de esta última molécula no sería posible si estuviese plegada de la misma o parecida manera que lo están las proteínas. Su enorme longitud, del orden del metro, obliga a que se enrolle ordenadamente dentro de un espacio diminuto. Dentro del edificio de la molécula de ADN existen dos tipos de uniones (enlaces químicos): el covalente, fuerte, que conforma cada una de las dos hebras y el de hidrógeno (mucho más débil) que se encarga de mantenerlas unidas. Otra característica, que comparte con otras moléculas de gran significado bioquímico, se refiere a que existe a lo largo de la misma una deslocalización de electrones, de lo cual son responsables los dobles enlaces de las bases, como ocurre en las moléculas que, como los carotenos, son antioxidantes y encargadas del control de los radicales libres, que son sustancias de una gran reactividad química producto del metabolismo. Una molécula de tan grandes dimensiones como el ADN parece que debería ser comparativamente inestable, rompiéndose preferentemente en trozos de tamaños diversos. Los agentes agresivos son, el oxígeno, el agua, las

radiaciones ionizantes, la presión y la temperatura. Sin embargo, el grado de deterioro es muy pequeño debido a las características que posee la molécula y a una serie de reacciones de reparación del deterioro ocasionado (Lindahl, 1993; Friedberg, 2003; Ball, 2003; García Barreno, 2003; Alberts, 2003). Inicialmente, cuando apareció la célula primitiva, el ADN formaba un filamento que se extendía en el seno de la célula, que entonces carecía de núcleo, por lo que el ADN estaría expuesto a la acción del oxígeno y demás agentes agresivos. En el curso de la evolución, y a partir de la célula procariota, apareció la célula con núcleo y una serie de orgánulos entre los que cabe destacar, en este caso, las mitocondrias (Margulis y Sagan, 1995). El ADN se situó en el interior del núcleo y en las mitocondrias, con funciones específicas diferentes. El ADN del núcleo y el mitocondrial probablemente poseen naturaleza evolutiva diferente. Las mitocondrias son seguramente el resultado de la simbiosis de archeobacterias. El núcleo debió de formarse tras la aglutinación o condensación del ADN, formándose los cromosomas a partir de su esqueleto protéico, del ADN. Como resumen de todo lo anterior señalaremos que el ADN, en cuanto forma parte de los seres vivos, se comporta como una molécula suficientemente estable, lo cual es debido, no solamente a la eficacia de los mecanismos de reparación, sino también al blindaje que proporciona la presencia de la membrana nuclear con respecto a los mencionados agentes agresivos (Friedberg, 2003).

Cuando el organismo muere los mecanismos de reparación desaparecen, quedando el ADN expuesto inicialmente a la degradación ocasionada por nucleasas endógenas (DeNiro, 1985). Si éstas son destruidas o desnaturalizadas, por desecación, bajas temperaturas, etc., como suele ser el caso, el ADN quedará expuesto a los agentes agresivos. Dada la ubicuidad de la materia viva (la biomasa), el ADN y los productos de su transformación podrán incorporarse al suelo y fijarse por adsorción sobre algunos de sus componentes (Trevors, 1996). Por ello, cualquier molécula orgánica no mantiene su identidad indefinidamente, habiéndose establecido un límite de unos 100000 años para la supervivencia de las moléculas de los biopolímeros. Aunque quizá no tan efectivo como el aislamiento en ámbar y otros casos descritos en la literatura científica (Paabo, 1985a; 1985b; Cano et al., 1993; Paabo, 1993; Cano y Burucki, 1995; Lindahl, 1997), parece haberse demostrado que los huesos fósiles en general, y los humanos en particular, constituyen unos materiales que han actuado con respecto al ADN de una manera parecida, aunque no tan efectiva, como en los casos citados. La estructura alveolar de los huesos (una matriz inorgánica porosa) y su composición química, favorable a la adsorción explicaría el hecho de la relativa conservación de la molécula de ADN, en estos ambientes. En otros casos esta conservación, solamente se mantendría cuando los huesos incorporan carbonato cálcico o quedan inmersos en un medio anóxico o alguna circunstancia similar, que no siempre se presenta. Los dientes, sin embargo, son mucho más adecuados debido a la protección del esmalte.

Los estudios del contenido del ADN en diversos materiales han evidenciado que la doble hélice de esa molécula se ha transformado total o parcialmente en fragmentos, es decir, en trozos de tamaños diversos. Esta fragmentación es el resultado de una transformación del ADN, llamada despurinización, que consiste en la separación de una base púrica de las hebras o trozos de hebra de la molécula. Estudiada hace unos 30 años, se considera como la reacción dominante del ADN (Lindahl y Nyberg, 1972; Lindahl y Anderson, 1972; Lindahl y Karlström, 1973; Lindahl y Nyberg, 1974; Paabo et al., 1989; Lindahl, 1993). Por otra parte se ha comprobado que los trozos ADN libres de purina en presencia de un enzima, llamada *polimerasa* (Reacción PCR, *polymerase chain reaction*), no reaccionan y los que la conservan se pueden replicar. Esta afortunada circunstancia facilita enormemente el análisis del ADN, aumentando también su precisión (Mullis y Faloona, 1987; Saiki et al., 1988; Paabo, 1989).

A pesar de la importancia que presenta el conocimiento de las reacciones que experimenta el ADN y, en particular, la reacción de despurinización, sin embargo, ha sido otorgada escasa

atención al estudio físico-químico de tales aspectos (Lindahl, 1993). Esta circunstancia puede haber influido desfavorablemente en los estudios concernientes a las aplicaciones del análisis de ADN como trazador de materiales fosilizados, particularmente muestras de huesos fósiles.

El objeto de este trabajo es doble: por una parte se dedica un espacio al estudio de la cinética e influencia de la temperatura en la constante de velocidad del proceso citado y, por otra, se hace una formulación correcta del concepto de edad térmica, que no ha sido debidamente introducido (Smith, et al., 2003; Comunicación personal, 2003).

Materiales y métodos

La degradación de las moléculas de ADN en los diversos materiales, producidos o no por los seres vivos, depende de aspectos esenciales del proceso químico, así como de otras características propias del medio en el seno del cual transcurre la reacción. Estos aspectos son el cinético, termodinámico y medio-ambiental, a los que pasaremos revista a continuación.

Como la mayoría de las reacciones biológicas, la despurinización es catalítica y de primer orden. La catálisis se debe a que el ADN y/o sus fragmentos son fácilmente adsorbidos por muchos materiales, según ya se dijo. Que se trate de una reacción de primer orden significa que la velocidad del proceso de despurinización, en cada momento, es proporcional a la cantidad de ADN presente en ese instante, lo que implica que el número de moléculas presentes varía, disminuyendo según una ley exponencial, es decir, como si se tratara de una desintegración radiactiva, por lo tanto, expresable mediante la ecuación:

$$FR = \text{Fracción remanente} = N/N_0 = e^{-kt} \quad (1)$$

siendo k la velocidad de reacción y t el tiempo transcurrido. Así pues, la relación entre el número de moléculas presentes, N , al cabo de un tiempo, t , y las inicialmente existentes, N_0 , sigue una ley fácil de formular, aunque para poderla utilizar se necesita conocer el valor de la velocidad de degradación para cada temperatura. En términos generales la expresión de la velocidad es: $dN/dt = -kN$.

Una diferencia esencial entre la velocidad de desintegración radiactiva y la de una reacción química es que ésta depende de la temperatura, la cual no afecta en absoluto a la transformación radiactiva. Este es un ejemplo de la diferencia entre el mundo molecular (de baja energía) y el mundo nuclear (de alta energía), mucho menos complejo que el molecular. La velocidad de un proceso químico puede determinarse experimentalmente en el laboratorio tratando de recrear las condiciones que rodearon la historia térmica de un ADN particular. Si los factores ambientales no han estado sometidos a grandes y frecuentes cambios a lo largo del tiempo, dentro de las escalas normales utilizadas, la citada velocidad dependerá prácticamente de la temperatura.

El otro aspecto del que hablamos anteriormente se refiere a la naturaleza del medio, soporte de la reacción, el cual será considerado en la discusión. A continuación se estudiará la influencia de la temperatura en la velocidad del proceso.

La influencia de la temperatura en la velocidad

Desde hace más de un siglo se conoce la expresión matemática que relaciona la velocidad de un proceso con su temperatura, llamada ecuación de Arrhenius (Arrhenius, 1889), la cual sigue utilizándose a pesar de los inconvenientes tanto prácticos como conceptuales que presenta. (Cossins y Bowler, 1987; Garzón, 2000a, 2000b, 2003). Esta ecuación es:

$$k = A \cdot \exp(-E/RT) \text{ s}^{-1} \quad (2)$$

donde A y E son parámetros de ajuste, R, la constante de los gases ideales y T la temperatura Kelvin. A es el factor de frecuencia y E la energía de activación, pobremente definida.

En la Tabla 1 se muestran los datos proporcionados por Lindahl y Nyberg (1972), los cuales han permitido obtener los valores de k y de ΔG^* . Al ajustar los datos a una recta se obtienen E y A, lo que permite disponer de la ecuación (2). En la Figura 1 se muestra la recta de ajuste. La herramienta matemática utilizada a lo largo de este trabajo ha sido el *Matlab*, versión 6.1.

Tabla 1. Cinética de la depurinización del ADN

t (° C)	Ln (k) s ⁻¹	1/k (días)	DG* (cal/mol)
45	-18.1078	846.4	30118
50	-17.1678	330.6	29997
55	-16.8146	232.3	30241
60	-16.1613	120.8	30279
65	-15.5227	63.8	30314
70	-14.7841	30.5	30269
75	-13.9460	13.2	30140
80	-13.1362	5.9	30014

Los datos de Lindahl y Nyberg corresponden a los de las dos primeras columnas. Los de la tercera se han obtenido a partir de los de la segunda y corresponden a la vida media en días. La cuarta columna contiene los valores de la energía libre de activación y han sido obtenidos a partir de la ecuación GLE. Su valor medio es de 30172 ± 43 cal/mol.

La ecuación de *Arrhenius* presenta ciertos inconvenientes que aconsejan sustituir su uso por otra ecuación, la cual contempla los aspectos cuánticos de la materia.

Deducida a partir de la Teoría de velocidades absolutas de reacción, nos referiremos a ella como ecuación GLE, (Glasstone, et al., 1941; Johnson et al., 1954). La ecuación es:

$$k = (k_B T/h) \cdot \exp(-\Delta G^*/RT) \text{ s}^{-1} \quad (3)$$

siendo k la velocidad de reacción, T, la temperatura Kelvin, k_B , h y R son las constantes universales de Boltzmann, Planck y la de los gases ideales respectivamente. ΔG^* es una energía libre aparente correspondiente a la formación del estado de transición (Glasstone, 1941; Johnson et al. 1954). Recordando que la vida media de una reacción es $Z=1/k$, la ecuación anterior se escribe:

$$Z = (5.554 \times 10^{-16} / T) \cdot \exp(\Delta G^*/RT) \text{ días} \quad (4)$$

Aparte de la vida media (mean-life), se han introducido otras magnitudes como el tiempo de reducción a la mitad (half-life), igual a $\text{Ln}2/k$. Los valores de la Tabla 1 nos han permitido comprobar que los correspondientes valores de ΔG^* se mantienen prácticamente constantes, por tanto, con un valor excelente de las desviaciones standard y la de la media. (Garzón, 2003). Una vez conocido el valor de ΔG^* se dispone de la ecuación (4) para calcular la velocidad a cualquier temperatura, bien entendido que las demás condiciones de las que pueda depender dicha velocidad, especialmente la naturaleza del medio, permanecen constantes.

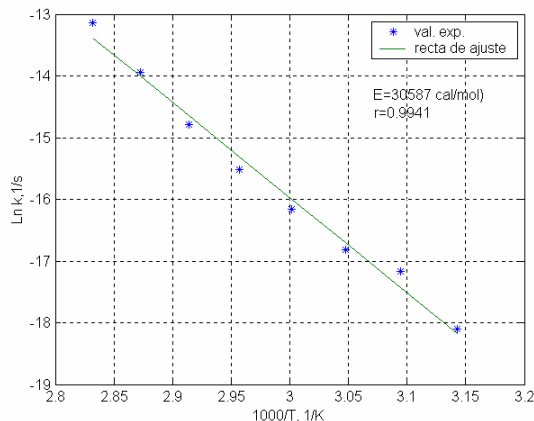
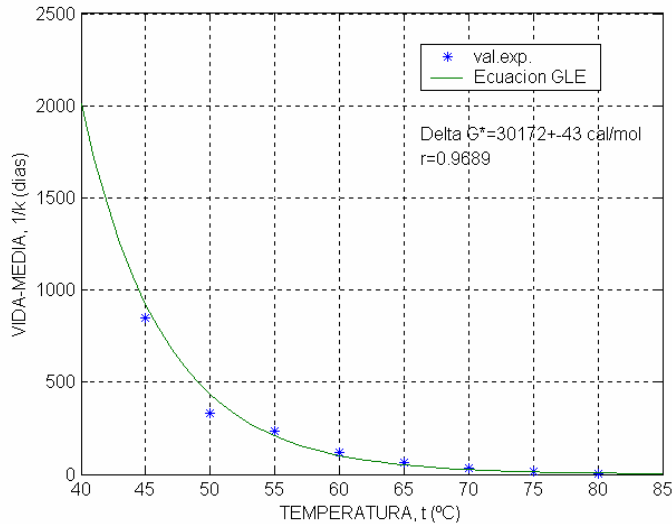


Figura 1. Ajuste de la ecuación de Arrhenius a los datos de depurinización. Los datos de la depurinización del ADN, que figuran en la Tabla I (Temperaturas inversas (1000/T) y Logaritmos naturales de la velocidad de reacción k (s⁻¹)), se han ajustados a la recta: $\text{Ln } k = -1000a/T + b$, siendo $a=E/1000R$ y $b = \ln A$, siendo E la energía de activación y A el factor pre-exponencial en la ecuación de Arrhenius. Los valores obtenidos son $E = 30587$ cal/mol y $A = 1.3 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$.

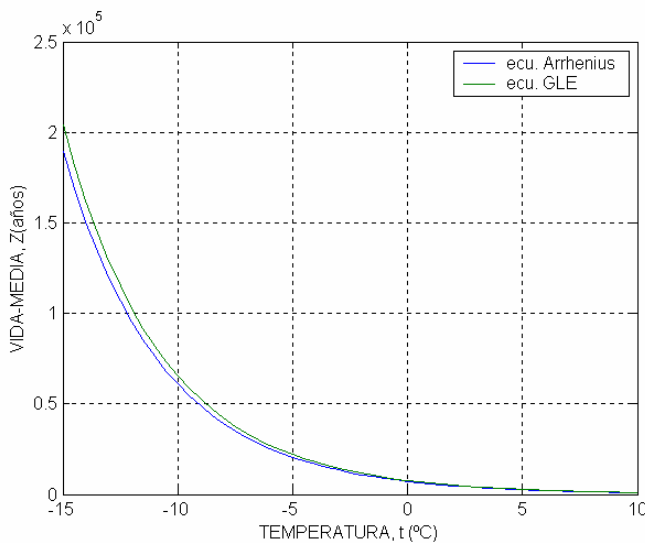
La degradación natural del ADN: el concepto de edad térmica



La gráfica muestra los datos de la depurinización del ADN que figuran en la Tabla 1 marcados con un asterisco y la curva continua dada por la ecuación GLE, con un valor de ΔG^* previamente obtenido con dicha ecuación y el colectivo de los mismos datos.

La concordancia de los valores de los datos es excelente.

Figura 2. Ajuste de la ecuación GLE a los Datos de depurinización



La gráfica muestra la vida media del ADN a varias temperaturas, entre -15 °C y 10 °C obtenida con las ecuaciones de Arrhenius y GLE.

Para las temperaturas de interés en este trabajo ambas ecuaciones proporcionan valores prácticamente idénticos.

La discrepancia entre ellos aumenta al disminuir la temperatura.

Figura 3. Comparación de vidas-medias con las ecuaciones de Arrhenius y GLE

Las figuras 2 y 3 muestran el ajuste de los datos de Lindahl y Nyberg a la ecuación GLE, y la comparación de las dos ecuaciones, respectivamente. Aunque volveremos sobre el tema, señalaremos que a los autores anteriores les corresponde el mérito de haber sido los primeros en calcular la energía de activación para la reacción de depurinización. Este valor difiere poco del que se obtiene en este trabajo: 30.172 ± 43 cal/mol. Comparado con otros valores, por ejemplo, la inactivación de enzimas, el crecimiento de microorganismos y otros (Glasstone et al., 1941; Levy y Miller, 1998; Garzón, 2000b), se observa que se trata de un valor relativa-

mente alto. La ecuación (4) o la Figura 2 permiten obtener los valores de la vida media a cualquier temperatura, indicando que en torno a los $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ es de unos 65000 años, lo cual explica la gran estabilidad de la molécula de ADN, a pesar de que en este caso no se consideran los mecanismos de reparación.

El ADN fósil en neandertales

Varios grupos están tratando de obtener información acerca de las edades térmicas de fósiles de Neandertales, para lo cual necesitan conocer con la mayor precisión posible la temperatura, es decir, la historia térmica a que estuvo sometido el resto fósil de que se trate, la cantidad presente de ADN y las condiciones del medio. Como se discutirá más adelante, la temperatura se ha mostrado como el parámetro que posee la mayor influencia. Una temperatura baja, en torno a las $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, proporciona una velocidad pequeña y en consecuencia una mayor duración del ADN y una mayor antigüedad para un mismo contenido actual de dicha sustancia. La ecuación propuesta por el autor relaciona la velocidad de reacción y la temperatura, existiendo además una magnitud termodinámica, la energía libre de reacción, ΔG^* , que es característica del tipo de reacción, la cual es necesario conocer (Garzón, 2000b). Con esta ecuación se puede comprobar, en efecto, que cuanto menor es la temperatura menor es también, la velocidad de reacción y mayor la vida media (Krings et al., 1997).

Resultados

Los resultados obtenidos por algunos investigadores para el hombre de Neandertal, con las reservas que hemos indicado, se han tratado de troquelar en la siguiente frase: “NOT JUST OLD BUT OLD AND COLD” (Smith, 2003) (No precisamente antiguo pero sí antiguo y frío). Matizando esta frase, debemos señalar que, en las condiciones indicadas, la edad térmica solo depende de la temperaturas. Con respecto a la naturaleza del medio donde ha tenido lugar la degradación del AND se mencionarán una serie de características que pueden haber contribuido a facilitar su estudio en orden a caracterizar el fósil correspondiente y por lo tanto a separar en el tiempo ciertas especies de homínidos. Entre dichas características se mencionarán el pH y su escasa variación, los procesos de adsorción del ADN y/o de sus fragmentos y la tolerable variación de la temperatura.

Ajuste de los datos de la Tabla 1:

Ecuación de Arrhenius.....	$A=1.3 \times 10^{13}$,	$E=30586\text{ cal/mol}$
Ecuación GLE.....		$\Delta G^*=30172\text{ cal/mol}$

En la literatura consultada se ha tomado el valor de 127 KJ/mol, equivalente a 30.340 cal/mol

Los coeficientes de determinación que indican la bondad del ajuste son muy elevados en ambos casos y la diferencia entre las energías es pequeña. Querría decirse, por tanto, que ambas ecuaciones podrían utilizarse para el caso que nos ocupa, a pesar de lo que se dijo acerca de la ecuación de *Arrhenius*.

No obstante, y a título informativo, señalaremos que las diferencias comienzan a ser significativas a temperaturas de varias decenas de grados bajo cero, lo cual no afecta al problema de la conservación del ADN en este caso (Figura 3).

Nosotros vamos a utilizar la ecuación GLE con el valor de la energía de activación igual a 30172, por consiguiente las ecuaciones (3) y siguientes serán utilizadas en este trabajo.

Tabla 2. Estabilidad térmica del ADN a partir de su vida media

t (° C)	VIDA-MEDIA Z (años)	TIEMPO t _w (años)
-10	65487	1.06×10 ⁶
-8	42062	6.84×10 ⁵
-6	27194	4.42×10 ⁵
-4	17695	2.87×10 ⁵
-2	11587	1.88×10 ⁵
0	76341	1.24×10 ⁵
1	6210	1.01×10 ⁵
2	5060	8.23×10 ⁴
3	4128	6.71×10 ⁴
4	3373	5.48×10 ⁴
5	2760	4.49×10 ⁴
6	2262	3.68×10 ⁴
7	1856	3.02×10 ⁴
8	1525	2.48×10 ⁴
9	1255	2.04×10 ⁴
10	1034	1.68×10 ⁴

Los datos de la TABLA 1 han permitido obtener el valor de ΔG,* a partir de la ecuación GLE con una buena precisión. Llevando este valor a dicha ecuación se pueden obtener los valores de la vida-media a cualquier temperatura. La ecuación cinética permite calcular el tiempo transcurrido a cada dada temperatura para que una muestra dada haya alcanzado una determinada concentración. Si ésta es de 256 pares de bases, la ecuación sería $t_w = Z \cdot \ln(3 \cdot 10^9 / 256) = 16.27 \times Z$, lo que supone un número inicial de pares de bases de $3 \cdot 10^9$. Los 100000 años de edad corresponden, según estos cálculos, a una historia térmica que se ha mantenido en media en torno a 1 °C.

Los valores de la vida media que se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 2 han permitido evaluar la antigüedad del DNA con respecto a su degradación a través de la reacción de depurinización, manteniéndose constantes los demás parámetros que pudieran afectar a su integridad.

En este caso se debe tener en cuenta la enorme precisión del análisis, en particular, el método PCR (*polymerase chain reaction*), citado anteriormente. Teniendo en cuenta que la más pequeña relación de pares de bases sería del orden de 10^9 , el tiempo total necesario para que el DNA se redujera desde 10^9 pares de bases a un par, debería satisfacer la ecuación:

$$t_w = (9 \times \ln 10) \times Z = 21 \times Z$$

No obstante, se ha adoptado un valor más conservador que corresponde a un valor de N igual a 256 pares de bases, obteniéndose así un factor de 16.27, en lugar de 21. Los valores de Z que dan valores realistas del tiempo (unos 100000 años) corresponden a temperaturas comprendidas entre 1 y 2 °C.

Edades térmicas de las muestras analizadas

El origen del tiempo se hace coincidir con el momento de la muerte y enterramiento del individuo. A partir de este momento el ADN comienza a transformarse en fragmentos por causa de la reacción de depurinización. Dichos fragmentos se van

acumulando en la estructura del hueso junto con el ADN no degradado. El hueso y, en algunos casos los sedimentos geológicos quedan suficientemente aislados para que las pérdidas por otros procesos puedan ser aceptables. Se suele admitir que las condiciones medias del entorno se mantienen prácticamente constantes en el transcurso del tiempo, lo que significa que en ciertos casos pueda ser aceptable suponer que la velocidad de la reacción sólo dependa de la temperatura, o, mejor dicho, de su valor medio. En particular se suele citar el hecho de que a causa de la composición de los huesos se instala en el mismo un sistema amortiguador del pH. La ecuación anterior indica que la velocidad de descomposición del ADN es muy sensible a la temperatura disminuyendo conforme la temperatura decrece. Lo contrario ocurre con la vida-media, Z. La temperatura se conoce con precisión aceptable través de otros estudios, por lo cual la ecuación anterior permite conocer el valor de k a cualquier temperatura. (Smith et al., 2003). Con este valor la citada ecuación cinética nos proporciona la fracción remanente del ADN en función del tiempo transcurrido hasta el momento actual. Llamando w a este tiempo tendremos:

$$\text{Fracción remanente} = \exp(-k \cdot w) \tag{5}$$

Para entender el concepto de edad térmica de una muestra es conveniente referirse a las características de los parámetros de los que depende el contenido actual del ADN.

La cantidad total específica de ADN (por unidad de masa de la muestra), N_0 , de un individuo de una colectividad dada es conocida. Permanece constante durante su vida iniciándose su degradación ($t=0$) cuando el individuo muere, a partir de cuyo momento la cantidad presente, no degradada, varía con el tiempo transcurrido de acuerdo con la expresión (5) dada anteriormente. Esta ecuación nos indica que un mismo valor de N/N_0 (elegido con criterios analíticos) se alcanzará para una serie de muestras cuando sean iguales los exponentes, es decir:

$$k_0 w_0 = k_1 w_1 = k_2 w_2 = \dots = k_i w_i \quad (6)$$

Los valores de k dependen de la temperatura. ¿Cómo podríamos normalizar las muestras con objeto de poder compararlas adecuadamente?. Las expresiones precedentes permiten resolver la cuestión. Se parte de la definición de un patrón al que se le asigna una temperatura de 10 °C y su edad, que se ha hecho coincidir, en el caso de los neandertales, con un fósil bien caracterizado, el hombre de *Feldhofer*. Designando por 0 e i los subíndices para una muestra patrón y una cualquiera i respectivamente, se debe satisfacer la igualdad :

$$\exp(-k_0 w_0) = \exp(-k_i w_i),$$

que expresa que ambas muestras presentan la misma fracción remanente de ADN. La expresión anterior se satisface cuando se cumple:

$$w_i = (k_0/k_i).w_0 = (Z_i/Z_0).w_0 \quad (7)$$

puesto que $k = 1/Z$. Finalmente a partir de la ecuación (4), poniendo $T = 283.15$ en Z_0 , T en Z_i , y sustituyendo en la ecuación (7), con $w_i =$ edad térmica, ET, se encuentra:

$$ET = w_0.(283.15/T). \exp [(30172/R).(283.15-T/283.15.T)] \quad (8)$$

o bien :

$$F = (283.15/T). \exp [(30172/R).(283.15-T/283.15.T)] \quad (9)$$

siendo $F = ET/w_0$.

El valor de R es $R = 1.9875 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Por razones de espacio, se ha recogido una parte de los de la tabla original, la cual obviamente es más completa en el sentido de que incluye otras edades, no obstante lo cual la que se presenta aquí resulta suficiente a los efectos de la comparación de los valores. Antes de llevar a cabo esta tarea permítasenos que, aprovechando los valores mencionados, insistamos en el concepto de edad térmica. Refiriéndonos por ejemplo a nuestro primer valor, 24140 años, cuya temperatura es de 5.7 °C, en dicha muestra la degradación de su ADN será la misma que la de una muestra patrón (temperatura, 10 °C), cuyo tiempo de degradación fuese de 10400 años. Esto significa que $\exp(-k_1 .24140)$ debe ser igual a $\exp(-k_0.10400)$, es decir: $k_0/k_1 = 2.321$, lo que indica que la velocidad de la muestra es menor que la del patrón, por lo que la muestra habrá conservado su ADN durante más tiempo. Nótese que nuestros valores son muy superiores a los de Smith y colaboradores, disminuyendo a medida que la temperatura crece, al contrario de los datos de Smith et al. Se puede comprobar además que el producto de los valores de ambos autores son muy aproximadamente constantes, lo que indicaría que probablemente han invertido sus resultados.

Considerando nuevamente la ecuación ET anterior, el cociente F entre este valor y la edad asignada a la muestra patrón sólo depende de la temperatura. En la Figura 4 se ha incluido este cociente junto con la posición de los valores y temperaturas que figuran en la Tabla 3. Nuestros resultados indican que en la conservación del ADN en los fósiles estudiados, la temperatura fue el parámetro más importante en orden a encontrar una cantidad remanente de ADN adecua-

da para obtener una precisión aceptable en los análisis. Por consiguiente, a igualdad de las demás condiciones, las muestras de huesos fósiles, reducidos sus contenidos de ADN a un mismo valor, poseerán mayores edades cuanto más bajas hayan sido sus temperaturas. Se podrían resumir estos hechos afirmando: “IF THEY ARE COLD THEY ARE OLD”.

Tabla 3. Comparación de edades térmicas Collins et al (2001)

SITIO	T (°C)	10400 (a)	10400 (a)	32000 (a)	32000 (a)
		<i>Nature</i>	Este Trabajo	<i>Nature</i>	Este Trabajo
Nezmaiskaya	5.7	4528	24140	13346	74276
<i>Ochoz</i>	6.9	5725	19035	9693	58570
<i>Kulna</i>	7	5837	18663	9861	57427
<i>Sipka</i>	7.1	5952	18300	10032	56307
<i>Spy</i>	8.9	8428	12869	12052	39596
<i>Subalyuk</i>	8.2	7365	14749	12174	45382
<i>Engis</i>	9.3	9099	11907	12925	36638
<i>Fond de Foret</i>	9.5	9454	11455	13387	35246
<i>La Naulette</i>	9.6	9637	11235	13624	34570
<i>Soulabe las Maretas</i>	8.9	8428	12869	13119	39596
<i>Feldhofer</i>	10.1	10601	10201	15132	31389
Saint Brelade	11.1	12815	8419	17839	25904
<i>La Chaise</i>	10.4	11223	9629	17549	29627
<i>Regourdou</i>	11.6	14083	7652	22100	23543
<i>Marillac</i>	12.2	16764	6826	24782	21002
<i>Grotte del Principe</i>	14.7	25093	4263	39740	13116

Consideremos el valor de 24140 años correspondiente al sitio de Nezmaiskaya como un ejemplo ilustrativo de edad térmica para la muestra dada. El valor de la temperatura es de 5.7 °C. Por otra parte, la muestra patrón, el hombre de Feldhofer (lugar 11 de la primera columna) posee un valor de su antigüedad de 10400 años = w_1 y una temperatura de 10 °C. Según la ecuación (5), la fracción remanente de ADN es: $FR = \exp(-10400.k_0)$, valor que debe ser igual a la fracción remanente de la muestra, por lo que: $10400.k_0 = 24140.k_1$, es decir, $k_0/k_1 = 2.3$, por lo tanto, k_1 es 2.3 veces inferior a k_0 . Este resultado significa que la muestra posee una velocidad de despurinización más lenta que el patrón, por lo que podrá ser más antigua que éste en un factor igual al anterior. Independientemente, utilizando la ecuación (8) para los valores de T iguales a 283.15 y 278.87 K se obtiene el mismo valor anterior

Discusión

La justificación del motivo o motivos de esta publicación se debe al hecho de que su autor presentó y publicó un trabajo, hace cuatro años, en el que intentaba probar que la ecuación de Arrhenius (Arrhenius, 1889), presenta los inconvenientes señalados y que consecuentemente debería ser sustituida por otra más adecuada, la cual fue oportunamente propuesta. El trabajo fue presentado en una reunión internacional en Blois (*Frontiers of Life*, 2000) e incluido en una página web (www.etsimo.uniovi.es), la cual al ser visitada recientemente por un investigador del departamento de Biotecnología y Zoología de la universidad de Oxford, Tom Gilbert, le movió a ponerse en contacto con el autor porque consideró que con esa ecuación las dificultades que encontraba en su trabajo sobre ADN antiguo, podrían quedar eliminadas. Un trabajo sobre el mismo tema (también del autor), ha sido recientemente aceptado para su próxima publicación en “*Origins of life and evolution of the Biosphere*”.

A pesar de la gran importancia que posee el conocimiento de los aspectos físico-químicos de las transformaciones espontáneas del ADN, en particular la reacción de despurinización, llama la atención el escaso interés que se ha otorgado a su estudio, como en efecto muestra la bibliografía, existiendo solamente un trabajo sobre el tema. Es este trabajo el punto de partida

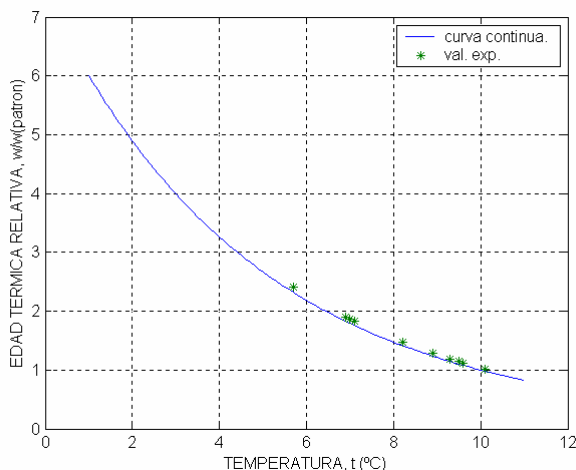


Figura 4. Edades térmicas relativas de muestras de neandertales. Tal y como se ha introducido el concepto de edad térmica, el cociente de las edades de las muestras de un colectivo dado con respecto a un mismo y dado patrón, varía con la temperatura según una misma expresión, la 9

parece más apropiada que la de *Arrhenius*. Los valores obtenidos con GLE, ecuación (9) $\Delta G^*=35090$ cal/mol para A y G y $\Delta G^*=36933$ y 32898 cal/mol para U y C, respectivamente (Levy and Miller, 1998; Shapiro, 1999).

Comparando el valor de la energía libre de activación con los obtenidos para otros procesos con la misma ecuación GLE (crecimiento de microorganismos, 23000 cal.mol⁻¹; inactivación de enzimas, 25000 cal.mol⁻¹ y otros), se puede adelantar que la reacción de despurinización es más lenta que otros procesos mejor conocidos, y más rápida que los de descomposición térmica de las bases citadas. Sin entrar en los detalles, este comportamiento es el que cabría esperar; pues sería equivalente a comparar la estabilidad de muchos materiales de construcción con el edificio de que forman parte.

El comportamiento del ADN fuera del intervalo de temperaturas que figura en la Tabla 1 se puede obtener, obviamente, a partir de la ecuación GLE (4), siendo más interesantes las temperaturas por debajo de 10 °C que por encima de esta temperatura. Esto supone hacer una extrapolación que será tanto más arriesgada cuanto más nos alejemos hacia las bajas temperaturas. Veremos, sin embargo, que en nuestro caso no es necesario exagerar en este sentido, pues como veremos más adelante, los resultados de las medidas de temperatura se hallan comprendidas en el intervalo $2-10$ °C, lo cual no supone una extrapolación exagerada. Como resumen de esta cuestión acerca de la supervivencia del ADN parece evidente que una temperatura baja (un poco superior a los 0 °C) sería favorable para la conservación del ADN. No podemos añadir, sin embargo, como se ha hecho recientemente, que también la antigüedad es un factor favorable, pues la edad depende, en principio, de la energía libre de activación y de la temperatura. Decimos en principio porque la naturaleza del medio es un factor a tener en cuenta.

Desde el punto de vista de la antropología la ecuación más importante de este estudio es la (9), que nos proporciona la relación de temperaturas entre una muestra cualquiera y la temperatura de 10 °C asignada al patrón. Esta ecuación depende además de la energía libre de activación. En la Figura 4 se ha representado su variación con la temperatura. Por lo dicho se trata de una función universal para una reacción dada. Por ello contiene los puntos correspondientes a

para nuestro estudio porque permite disponer de la energía de activación, la cual, a pesar de proceder de la ecuación de *Arrhenius*, sería un valor aceptable por razones que se detallan en los trabajos citados. El hecho de que los valores experimentales se ajusten muy bien a la ecuación GLE, como se ve en la Figura 2, es una circunstancia que permite disponer de un buen modelo para el caso que se considera. Aparte de otros ejemplos, los valores obtenidos recientemente en el estudio de la estabilidad térmica de las bases *Adenina*, *Guanina*, *Citosina* y *Uracilo*, permiten, en efecto, comprobar que la

los valores de la edad térmica de las muestras dadas en la Tabla 3. La edad térmica de una muestra cualquiera se puede obtener a partir de su temperatura y de la antigüedad del patrón. Los valores de la Tabla 3 se han obtenido asignando al patrón la edad de 10000 años.

Faltan por considerar las características más relevantes del medio en el seno del cual ha tenido lugar la degradación del ADN. Los únicos datos disponibles indican que la velocidad de degradación depende del pH del medio, razón por la cual los datos recogidos en la Tabla 1 se refieren a un valor del pH = 7.6. Las demás consideraciones son de carácter teórico. Trataremos de resumirlas a continuación. Señalaremos en primer lugar que un hueso es una mezcla de colágeno (proteínas), biomoléculas y bioapatito. Cuando el organismo muere desaparecen los procesos de reparación del ADN quedando la mayoría del inventario en los lugares que ocupaban los osteocitos; debe admitirse que una fracción de dicho ADN desapareciera por la acción de nucleasas y/o bacterias. La mayoría quedaría atrapada en el interior del hueso habida cuenta de que, según se ha demostrado experimentalmente, el apatito es un buen adsorbente del ADN. Además del propio hueso, el ambiente consiste en los materiales sedimentarios, que serán de parecidas características dentro de un ámbito regional. En cualquier caso, y como resumen de lo anterior podemos señalar que el hueso en su conjunto no está en equilibrio químico con el ambiente, por lo que tendrá lugar una serie de reacciones químicas tendentes a la igualación de los potenciales químicos entre las fases implicadas. El hecho de que existan fenómenos de adsorción, principalmente entre el apatito y el ADN, indica que las reacciones de esta sustancia deben ser catalíticas y por lo tanto de pseudo primer orden. En cualquier caso, se ha considerado que las diferencias entre los enterramientos de una misma clase debidas a las diferencias de los sedimentos sean importantes. Probablemente las incertidumbres derivadas de los modelos de predicción de las temperaturas medias introduzcan las mayores incertidumbres en los valores obtenidos de las edades térmicas.

Conclusiones

1. Aunque la ecuación de *Arrhenius* no sea adecuada, en este caso particular no sería probablemente la responsable de los errores que pudieran cometerse. No obstante se estima que es más conveniente utilizar la ecuación GLE, como se ha hecho en este trabajo.
2. La conclusión más importante se refiere al hecho de que el concepto de edad térmica ha sido formulado rigurosamente, lo que indicaría que sería necesario revisar las interpretaciones que se hayan dado con otros valores distintos de los que proporcionan las ecuaciones utilizadas en este trabajo.

Bibliografía

- ALBERTS B (2003) DNA replication and recombination. *Nature*, 421: 431-435.
- ARRHENIUS S (1889) Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei Inversion Rohrzucker durch Säuren. *Z. Phys. Chem.*, 41: 226-248.
- BALL P (2003) Portrait of a molecule. *Nature*, 421: 421-422.
- CANO RJ, POINAR HN, PIENIAZEK NJ, ACRA A & POINAR GO (1993) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*, 363: 536-538.
- CANO RJ & BURUCKI M (1995) Revival and identification of bacterial spores in 25-40 millions-year-old Dominican amber. *Science*, 268: 1060-1064.
- COSSINS AR AND BOWLER K (1987) *Temperature Biology of Animals*. Chapman and Hall. London. 339 pp.
- DeNIRO M (1985) Postmortem preservation and alteration of in vivo bone collagen isotope ratios in relation to palaeodietary reconstruction. *Nature*, 317: 806-809.
- FRIEDBERG ERROL C (2003) DNA damage and repair. *Nature*, 421: 436-440.
- GARCÍA BARRENO P (2003) *50 años de ADN*. Espasa Calpe. Madrid. 561 pp.
- GARZÓN L (2000a) Materia, Vida y Temperatura. *Mundo Científico*, 219: 34-37.

- GARZÓN L (2000b) Evolution of species and temperature. En: *Frontieres of Life*, Proceedings of the XII th Rencontres de Blois (ed by L. M.Celnikier and J. Tran Thanh Van), The Gioi, Vietnan.335 pp.
- GARZÓN L (2003) Microbial Life and Temperature: A semi empirical Aproach. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, pendiente de publicación.
- GLASSTONES, LAIDLER KJ & EYRING H (1941) *The Theory of Rate Processes*. McGraw. N.Y 611 pp.
- JOHNSON EH, EYRING H & POLISSAR R (1954) *The Kinetic Bases of Molecular Biology*. John Wiley and sons. INC, NY, Chapman and Hall. London 874 pp.
- KRINGS M, STONE A, SCHMITZ RW, KRAINITZKI H, STONEKING M & PAABOS (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**:19-30.
- LEVY M & MILLER SL (1998) The stability of RNA bases: Implications for the origin of life. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **7**, **95**(14):7933-7938.
- LINDAHL T & NYBERG B (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **11**: 3610-3618.
- LINDAHL T & ANDERSSON A (1972) Rate of chain breakage at apurinic sites in double –stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **11**: 3618-3623.
- LINDAHL T & KARLSTROM O (1973) Heat-induced depurination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry*, **12**: 5151-5154.
- LINDAHL T & NYBERG B (1974) Heat-induced deamination of cytosine in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **13**: 3405-3410.
- LINDAHL T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**: 709-715.
- LINDAHL T (1997) Facts and Artifacts of Ancient DNA. *Cell*, **90**: 1-3.
- MARGULIS L & SAGAN D (1995) *Microcosmos*. Tusquets Editores, Barcelona.317 pp.
- MULLIS KB & FALOONA F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzymo.*, **155**:335-350.
- PAABO S(1985a) Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, **404**, 644-645.
- PAABO S (1985b) Ancient DNA. *Sci Am.*, **269**(5): 86-92.
- PAABO S (1989) Ancient DNA; extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1939-1943.
- PAABO S, HIGUCHI RG & WILSON AC (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J Biol Chem.*, **264**: 9709-9712.
- SAIKI R K, GELFAND DH, STOFFELD S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB & ERLICH HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 239-491.
- SMITH COLIN, CHAMBERLAIN ANDREW T, RILEY MICHEL S, STRINGER CHIRS & ATTHEW COLLINS (2003) Neanderthal DNA: Not just old but old and cold?. *Nature* **410**: 771-772.
- SMITH COLIN, CHAMBERLAIN ANDREW T, RILEY MICHEL S, STRINGER CHIRS & AND MATTHEW COLLINS (2003) *The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification*. Comunicación personal.
- SHAPIRO R (1999) Prebiotic synthesis : A critical analysis and implications for the origin of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.US.*, **96**: 4396-4401.
- TREVORS, JT (1996) DNA in soil : adsorption, genetic transformations, molecular evolution and genetic microchip. Antoine van Leeuwenhoek, **70**: 1-10.

Abstract

From the data provided by Lindahl and Nyberg the main aspects of DNA depurination reaction have been studied. Instead of the Arrhenius equation, that is not generally adequate, the Glasstone, Laidler and Eyring one has been used. For the activation free energy a value of 30172 ± 43 cal·mol⁻¹ has been obtained. The mean-life of the DNA depurination process increases as temperature decreases. The formulation of the thermal age concept has been clearly established.

Natural DNA degradation: the concept of thermal age

Key words: activation energy, depurination, Neandertal, stability, survival, thermal age, thermal history