



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESNATURALIZACIÓN DE DNA POR DISIPACIÓN
DE FOTONES UV: EXPERIMENTO PARA PROBAR
LA TEORÍA DE DISIPACIÓN TERMODINÁMICA
PARA EL ORIGEN DE LA VIDA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
FÍSICO

PRESENTA:
NORBERTO SANTILLÁN PADILLA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. KARO MICHAELIAN PAUW

Cd. Universitaria, D. F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Santillán
Padilla
Norberto
(045) 771 7 02 58 53
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Física
408053291

2. Datos del tutor

Dr.
Karo
Michaelian
Pauw

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Rafael
Navarro
González

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Octavio Reymundo
Miramontes
Vidal

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Alejandro
Frank
Hoefflich

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Alicia
Zarzosa
Pérez

Resumen

Recientemente se publicó la teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida [1, 2] en la que se propone que la vida surgió como un proceso irreversible cuya función termodinámica era la de disipar el potencial fotónico generado por el Sol y el espacio exterior, misma función que la vida lleva a cabo en nuestros días. Particularmente la teoría propone que en el origen de la vida, hace 3.85 mil millones de años aproximadamente, las moléculas de DNA y RNA jugaron un papel muy importante como estructuras disipativas convirtiendo en calor la energía de los fotones UV-C que incidían en la superficie de la Tierra provenientes del Sol, es decir los fotones con longitud de onda entre 230 y 290 nm. Dicha propuesta está basada, por un lado, en el hecho de que las moléculas de DNA y RNA convierten en calor, mediante un mecanismo llamado *conversión interna*, casi toda la energía de los fotones UV-C que absorben; la conversión interna consiste en la transformación de la energía de excitación electrónica en vibraciones y rotaciones moleculares. Por otro lado está basada en la estimación de Carl Sagan [3] de que la atmósfera primitiva permitía el paso directo a la superficie de la Tierra de los rayos UV con longitudes de onda entre 240 y 290 nm, justo en el rango de absorción del DNA y el RNA. Además, según esta teoría, la reproducción de las cadenas de DNA y RNA en la sopa primitiva, uno de los problemas centrales en el estudio del origen de la vida, pudo haberse llevado a cabo mediante un mecanismo asistido por luz UV y temperatura, llamado mecanismo UVTAR, en el que la capacidad disipativa de estas moléculas jugó un papel fundamental porque el calor que ellas mismas producían al disipar los fotones UV-C pudo ser absorbido por el agua y así aumentar localmente la temperatura alrededor de las moléculas de DNA y RNA lo cual, a su vez, produciría su desnaturalización abriendo así la posibilidad a su replicación. Dado que la disipación de fotones UV-C en calor es un proceso irreversible y que por tanto produce entropía, esta teoría le da a la vida una razón termodinámica para su aparición y proliferación según el principio de Onsager, el cual establece que el surgimiento de un nuevo proceso irreversible (la vida) en un sistema que está fuera del equilibrio y en contacto con sus alrededores

(la Tierra primitiva en interacción con su ambiente solar) ocurre siempre y cuando tal proceso incremente la producción de entropía global de dicho sistema.

Con el propósito de comenzar a investigar la veracidad de esta nueva teoría se ha diseñado un experimento para poner a prueba el primer paso del mecanismo UVTAR, *i.e.* para comprobar la hipótesis de que gracias a la capacidad disipativa del DNA, este puede ser desnaturalizado irradiándolo con la luz UV manteniendo constante la temperatura de la solución que lo contiene, y que la suspensión de la irradiación UV permite su renaturalización a esa misma temperatura. En el experimento fueron sometidas a radiación UV-C soluciones de DNA de origen biológico y sintético. Registrando la extinción de la luz incidente (absorción + dispersión) entre 200 y 800 nm se ha logrado obtener evidencia de que la luz UV-C puede desnaturalizar, al menos parcialmente, una muestra de DNA genómico de esperma de salmón y de levadura (*S. cerevisiae*) mantenidas a 40 y 55°C, y se observa que este efecto es reversible y reproducible bloqueando y desbloqueando el paso de la luz UV-C sobre la solución. El mismo experimento se llevó a cabo con cadenas sintéticas de 25 y 48 pares de bases a temperaturas más altas (70 y 75°C) obteniendo los mismos resultados.

La primera parte de este escrito da una idea general sobre el estudio del origen de la vida y del aspecto innovador que la teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida aporta a tal estudio. Después se exponen conceptos básicos sobre el DNA y su importancia en el comienzo de la vida, así como las propiedades físicas que pudieron favorecer su proliferación en las condiciones de la Tierra primitiva. Luego se resume el mecanismo mediante el cual la teoría de disipación termodinámica pretende explicar la replicación del DNA y RNA bajo las supuestas condiciones de la Tierra primitiva; y finalmente se exponen los detalles del experimento con el que se comprueba el primer paso de dicho mecanismo, es decir del efecto de desnaturalización y renaturalización bajo ciclos de irradiación UV a temperatura constante.

Índice general

Resumen	2
1. Preámbulo	6
1.1. El estudio del origen de la vida	6
1.2. La teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida	9
2. El DNA	16
2.1. Composición y Estructura	16
2.2. Posible origen y presencia en la sopa primitiva	20
2.3. Disipador de fotones UV-C en calor	22
3. UVTAR. Mecanismo propuesto para la replicación no enzimática de DNA y RNA en el origen de la vida.	28
4. Probando experimentalmente el primer paso del mecanismo UVTAR. Desnaturalización de DNA por luz UV	34
4.1. La desnaturalización en el DNA	34
4.2. Experimento: Propósito y Antecedentes	39
4.3. Material	41
4.3.1. Equipo y montaje experimental	41
4.3.2. Reactivos	43
4.4. Método	44
4.4.1. Preparación de la solución de DNA	44
4.4.2. Irradiación de la solución	44
4.4.3. Recolección de datos: extinción de luz.	45
4.5. Resultados y su análisis	48
4.5.1. Espectros de extinción.	48
4.5.2. Efecto de la temperatura en los espectros de extinción.	51
4.5.3. Curvas de desnaturalización por aumento de temperatura.	54
4.5.4. Desnaturalización de DNA por irradiación con luz UV-C a temperatura constante.	59

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	5
4.5.5. Descensos repentinos en la extinción.	68
4.6. Conclusiones	72
4.7. Discusión	74
A. Corrida control con DNA de 48 pb.	77
B. Incertidumbres al medir la extinción de luz.	80
C. Código para análisis de datos.	83
Referencias	87

Capítulo 1

Preámbulo

El análisis de las rocas más antiguas, incluidos meteoritos, sugiere que el planeta Tierra se formó hace 4.54 mil millones de años aproximadamente, y la evidencia indiscutible más antigua de vida en la Tierra, interpretada como una bacteria fosilizada, data de hace 3 mil millones de años, aunque hay cierta evidencia biológica que parece mostrar la presencia de vida desde hace 3.85 mil millones de años. Esto sugiere que la vida apareció relativamente poco después de haberse formado nuestro planeta. Pero cómo es que apareció y porqué o para qué, si es que acaso hay una razón.

La primera parte de este capítulo explica, de manera general, qué se sobreentiende cuando se habla de *origen de la vida* y cómo se estudia dicho origen, y la segunda parte expone por qué surgió la vida según la teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida.

1.1. El estudio del origen de la vida

Actualmente cuando un científico habla del origen de la vida hace referencia a un proceso largo que pudo haber tomado millones de años en completarse, que tuvo lugar en la Tierra primitiva hace 3.85 mil millones de años aproximadamente y en el que, gracias a diferentes fenómenos físicos y a diversas reacciones químicas, se formaron las moléculas fundamentales (aminoácidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos) que constituyen a todos los seres vivos, las cuales eventualmente desarrollaron complejas relaciones entre sí que permitieron la creación de los primeros organismos y su evolución.

Aunque el estudio del origen de la vida es multidisciplinario, existen dos líneas de investigación que abordan este estudio de manera directa; la quími-

ca prebiótica y la filogenia molecular. La primera es un intento de crear vida en el laboratorio porque se enfoca en investigar qué tipo de reacciones químicas dieron origen a las moléculas de la vida; bajo qué condiciones físicas se desarrollaron tales reacciones; cómo las moléculas se asociaron para formar seres vivos y cómo los seres vivos adquirimos esas características que parecen ser exclusivas de nosotros, la de adaptarnos al medio en el que vivimos, de autopreservarnos y autoperpetuarnos. La segunda pretende hacer un viaje hacia atrás en el tiempo a través de organismos de diferentes especies haciendo una comparación de su información genética que permita saber, entre otras cosas, qué tipo de moléculas y reacciones químicas son comunes a todo ser vivo y a partir de ello inferir cómo estaban formados y cómo era el metabolismo de los organismos que dieron origen a toda la biodiversidad que conocemos hoy: arqueas, bacterias y eucariontes. En esta visión va implícita la suposición de que todo tipo de vida terrestre desciende de un ancestro común.

Desde la perspectiva de la química prebiótica, a la cual es más afín el experimento que se reporta en este escrito, el primer problema al que se enfrenta el estudio del origen de la vida es saber cuáles eran las condiciones físicas de la Tierra primitiva.

De entre las primeras condiciones físicas estudiadas se encuentra la composición de la atmósfera primitiva. En 1924 Oparin sugirió que la atmósfera de la Tierra primitiva era químicamente reductora, compuesta por vapor de agua (H_2O), amoníaco (NH_3), hidrógeno (H_2) y metano (CH_4). Pero los estudios de Tian et al.[4] sugieren que la atmósfera primitiva no fue reductora sino neutra, formada por H_2O , H_2 y dióxido de carbono (CO_2). Más tarde, debido a la suposición de que la actividad volcánica de la Tierra primitiva era mucho mayor que en la actualidad, se propuso que la atmósfera pudo haber contenido CO_2 , dióxido de sulfuro (SO_2) y H_2O , principales gases expulsados en una erupción volcánica.

En cuanto a la temperatura superficial de la Tierra, según estudios de Knauth y Lowe[5] basados en isótopos ^{16}O y ^{18}O , se cree que era cercana a los 80°C hace 3.8 mil millones de años, y que descendió a $70 \pm 15^\circ\text{C}$ hace 3.5 mil millones de años aproximadamente [6].

Respecto a la incidencia de radiación a la atmósfera y superficie terrestre se sabe que el Sol joven era más activo debido a una mayor tasa de rotación y su espectro era probablemente más intenso en el rango ultravioleta de lo que es en la actualidad, y entre 25 y 30 % menos intenso en el rango del vi-

sible [7]. Cnossen et al. [8] han hecho simulaciones de absorción y dispersión de fotones para distintos modelos hipotéticos de la atmósfera primitiva en los que se consideran diferentes concentraciones de CO_2 a diversas presiones; sus conclusiones fueron que durante el período del Arqueano (entre 4 y 3.5 mil millones de años atrás) la superficie de la Tierra estaba sujeta a una radiación ultravioleta con longitudes de onda entre 200 y 300 nm en un factor hasta de 10^{31} veces mayor que el actual (a 255 nm).

La salinidad inicial de los océanos fue entre 1.5 y 2 veces mayor que el valor actual y permaneció en un nivel alto a lo largo del Arqueano en ausencia de cratones continentales requeridos para aislar grandes depósitos de halita y salmuera producto de la evaporación del agua de mar [9].

Debido a una alta concentración de CO_2 en la atmósfera primitiva los océanos pudieron haber sido ácidos. Según Morse y Mackenzie [10], en los comienzos del Hadeano, hace 4.3 mil millones de años aproximadamente, el pH del agua de mar fue probablemente de 5.8 ± 0.2 , y para el final del Hadeano, hace 3.8 mil millones de años, cambió probablemente a un valor más neutro, ~ 6.8 .

En segundo lugar, el estudio del origen de la vida tiene el reto de averiguar cómo, bajo las supuestas condiciones de la Tierra primitiva, se sintetizaron los compuestos que eventualmente formaron a los primeros organismos con vida. Esto significa descubrir las reacciones químicas mediante las cuales se sintetizaron las moléculas de la vida.

En 1953 fue Stanley Miller quien abrió el camino de esta línea de investigación al sintetizar algunos aminoácidos a partir de una mezcla de gases reductores (NH_3 , CH_4 , H_2O y H_2) sometidos a descargas eléctricas durante una semana. Cuando se propuso que la atmósfera primitiva pudo haber sido más neutra, dominada por nitrógeno (N_2) y CO_2 , se demostró que sometiendo dichos gases a descargas eléctricas, al igual que en el experimento clásico de Miller, la síntesis de aminoácidos es menos eficiente, pero agregando inhibidores de oxidación como el hierro ferroso (Fe^{2+}) y tampónes de pH para que la solución, producto de la condensación de los gases, no se hiciera ácida, la síntesis de aminoácidos aumenta entre 10 y 100 veces [11].

En 1959, Joan Oró sintetizó adenina a partir de ácido cianhídrico [12]. El ácido cianhídrico resulta de la irradiación con luz UV de las moléculas que componen una atmósfera no-reductora. La adenina es una de las cuatro bases nitrogenadas tanto del DNA como del RNA y es también parte esencial de la molécula que hoy en día sirve como almacén y fuente de la energía que todo

ser vivo necesita para llevar a cabo sus funciones vitales, el adenosín trifosfato o ATP. A partir del trabajo de Oró se han reportado síntesis abiótica de las otras bases nitrogenadas del DNA y RNA bajo las posibles condiciones en la que se encontraba la Tierra primitiva (ver sección 2.2).

Si bien hay muchas evidencias de que bajo las condiciones que probablemente minaban a nuestro planeta en el Arqueano pudo haberse llevado a cabo la síntesis de las moléculas que conforman hoy en día a los seres vivos (algunas de esas pruebas se citarán a lo largo de este escrito), aun no se tiene una visión completa del proceso del origen de la vida y probablemente nunca se tenga. Sin embargo se puede intentar hallar una lógica que haya dado lugar a la aparición de la vida, como lo intenta hacer la teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida.

1.2. La teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida

Fundamentos

A la Tierra incide la radiación solar compuesta aproximadamente en un 50 % por luz UV y visible mientras que el otro 50 % es infrarrojo. Particularmente la radiación de longitud de onda corta, *i.e.* el UV y el visible, se absorben en la atmósfera y en la superficie terrestre para luego convertirse en otras formas de energía. A su vez nuestro planeta emite hacia el espacio radiación de longitud de onda larga del rango infrarrojo.

Con la radiación no sólo llega energía sino también entropía. Para sistemas conformados por átomos y moléculas la entropía suele ser interpretada como una medida de qué tan distribuidas están las cantidades conservadas, como la energía interna, el momento y el momento angular, en los grados de libertad del sistema. A mayor distribución sobre los grados de libertad mayor entropía. En los sistemas que constan puramente de radiación, como un haz de luz, la entropía adquiere un significado semejante. Considérese por ejemplo el caso de dos haces de luz que transportan la misma cantidad de energía pero uno de ellos consta sólo de fotones ultravioleta (UV) y el otro de fotones infrarrojo (IR). Dado que cada fotón UV transporta mayor energía que un fotón IR ($E = h\nu$, $\nu_{UV} > \nu_{IR}$) el haz de luz UV tiene menos fotones que el de luz infrarroja y por tanto la energía del primero está más compacta (o bien menos distribuida) que la del segundo. Por ello la entropía asociada al haz de luz UV es menor que la asociada a la de luz infrarroja.

La teoría de radiación de Planck de cuerpo negro muestra que tanto la energía como la entropía asociadas a la radiación dependen únicamente de la temperatura del cuerpo que la emite. Para un haz cualquiera de fotones, no necesariamente de cuerpo negro, la entropía como función de la longitud de onda λ está dado por $L(\lambda)$ [J/m³Ks] [13]:

$$L(\lambda) = \frac{n_0 k c}{\lambda^4} \left[\left(1 + \frac{\lambda^5 I(\lambda)}{n_0 h c^2} \right) \ln \left(1 + \frac{\lambda^5 I(\lambda)}{n_0 h c^2} \right) - \left(\frac{\lambda^5 I(\lambda)}{n_0 h c^2} \right) \ln \left(\frac{\lambda^5 I(\lambda)}{n_0 h c^2} \right) \right] \quad (1.1)$$

donde n_0 denota el estado de polarización del haz, $n_0 = 1$ o 2 para un haz polarizado y no polarizado, respectivamente; k es la constante de Boltzmann, c es la velocidad de la luz, h la constante de Planck e $I(\lambda)$ es el flujo de energía a la longitud de onda λ . El flujo de energía $I(\lambda)$ [J/m³s] emitido por un cuerpo negro por unidad de ángulo sólido subtendido y por longitud de onda λ es dada por [13]:

$$I(\lambda) = \frac{n_0 h c^2}{\lambda^5} \frac{1}{e^{hc/\lambda k T} - 1}. \quad (1.2)$$

Evaluable en períodos largos de tiempo (*e.g.* un año) la cantidad de energía emitida por la Tierra en forma de radiación de onda larga es casi igual a la absorbida en forma de onda corta. En promedio, el flujo anual de energía absorbida en forma de onda corta es de ~ 238 W/m² [14, 15]. La diferencia entre la radiación absorbida y la emitida en forma de onda larga por la Tierra es de 0.5-1 W/m² [16]. Sin embargo, la entropía asociada a la radiación emitida rebasa por mucho la asociada a la radiación absorbida debido a que la temperatura del Sol es mucho mayor que la de la Tierra (ver figura 1). Con base en la ecuación (1.1) y haciendo una aproximación de cuerpo gris, Michaelian [13] ha estimado que el flujo de entropía que sale de la Tierra hacia el espacio en forma de onda larga es aproximadamente 12 veces más grande que el que entra con la radiación solar. Por tanto la Tierra *produce entropía* al intercambiar radiación con el Sol y el espacio exterior (figura 1). Tanto las nubes como la superficie terrestre reflejan directamente al espacio parte de la radiación solar incidente sin causar cambios en la longitud de onda, efecto conocido como albedo. Esto provoca una distribución más isotrópica de los fotones en el espacio que la distribución de esos mismos fotones en la haz de luz solar incidente (haz paralelo) y por tanto dicha reflexión también produce entropía [13, 17].

Los procesos que producen entropía son conocidos como procesos disipativos o irreversibles y le permiten a la naturaleza explorar una mayor cantidad de

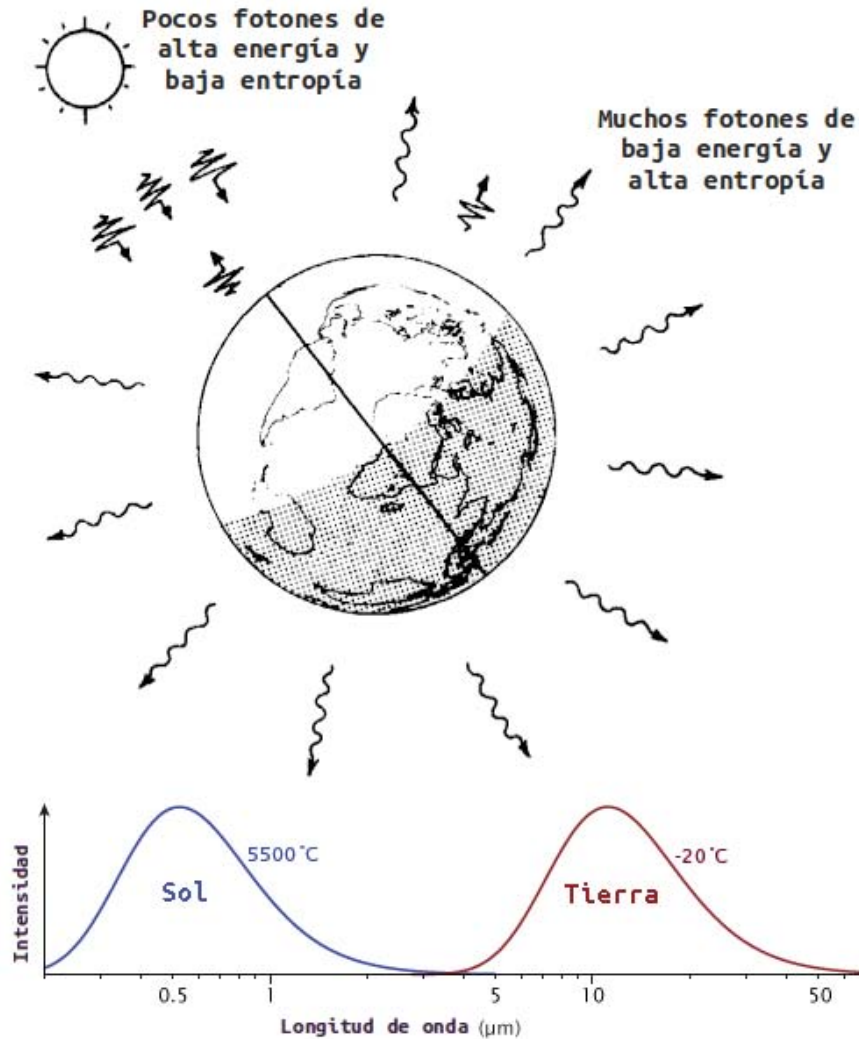


Figura 1.1: La Tierra mantiene un equilibrio radiativo al emitir de regreso al espacio la misma cantidad de energía que recibe del Sol, pero debido a que la radiación emitida está corrida hacia el rojo respecto a la incidente hay entonces un flujo neto de entropía negativo, i.e. sale más entropía de la que llega a nuestro planeta y por tanto la Tierra produce entropía al intercambiar radiación con el espacio exterior. Las temperaturas mostradas corresponden a la temperatura promedio de la superficie del Sol y a la de la atmósfera de la Tierra. Imagen construida a partir de la figura 1 de la referencia [18] y de la primer figura que aparece en el sitio <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/EnergyBalance/page2.php>

microestados disponibles. Un microestado, o estado microscópico, representa una configuración permitida para los componentes microscópicos de un sistema. Por ejemplo, las posiciones y velocidades a un tiempo dado de las moléculas de un gas contenido en la atmósfera representan una configuración; de todas las configuraciones posibles cierto número de ellas son adoptadas con mayor frecuencia por los componentes del sistema y es ello lo que determina las variables (temperatura y presión, por ejemplo) con las que se caracteriza el estado macroscópico del sistema (la atmósfera). Los estados macroscópicos que percibimos en la naturaleza tienen asociados un mayor número de microestados que otros y por eso suele decirse que la naturaleza se dirige hacia macroestados con mayor cantidad de microestados; el estado macroscópico que finalmente adopte el sistema dependerá de las condiciones a la frontera iniciales, la cinética permitida y las restricciones y perturbaciones externas.

El flujo de entropía debido al intercambio de radiación con el espacio exterior es lo que dirige y mantiene casi todos los procesos irreversibles que se llevan a cabo en la superficie y en la atmósfera terrestre. Según las estimaciones de Peixoto *et al.* [14] el 63 % de la producción de entropía debido al intercambio de radiación (sin tomar en cuenta la generada por la reflexión de la radiación solar) se debe a la absorción y disipación de los fotones solares del UV y el visible en la superficie terrestre mientras que este mismo proceso llevado a cabo en la atmósfera contribuye con el 29 %. El flujo de calor latente desde la superficie a la atmósfera asociado al ciclo del agua, la absorción de la radiación terrestre (de onda larga) en la atmósfera y el transporte de calor de regiones cálidas a frías por corrientes oceánicas y atmosféricas, incluyendo la pérdida en calor por la fricción entre las corrientes de aire y la superficie terrestre, son procesos irreversibles que también contribuyen, aunque en menor grado, a la producción de entropía de la Tierra en interacción con su ambiente solar [14, 15, 13]. La actividad biológica en la superficie de la Tierra es, sin duda, un factor muy importante en dicha producción de entropía.

La función termodinámica de la vida: disipación de fotones solares.

Los organismos fotosintéticos se encuentran dispersos casi en cualquier parte de la Tierra en la que haya agua y luz solar y conforman, por mucho, la mayor parte de la biomasa sobre la superficie terrestre. La fotosíntesis sustenta toda la vida en nuestro planeta y es el proceso a través del cual un fotón solar de alta energía del espectro visible es convertido, por medio de diferentes pigmentos orgánicos como la clorofila, carotenoides, ficolibinas,

etc., en 30 o más fotones infrarrojo (calor). Una pequeña parte de la energía de los fotones solares absorbidos es utilizada para extraer y fijar el carbono orgánico a partir del dióxido de carbono atmosférico. De esta manera los organismos fotosintéticos se mantienen y se propagan mediante la conversión de luz solar (de baja entropía) en calor (de mayor entropía) y por tanto contribuyen a la producción de entropía global de la Tierra [13].

La actividad de los organismos fotosintéticos influye de manera muy importante en el ciclo del agua. Grandes cantidades de agua son absorbidas por las raíces de las plantas y llevadas hasta las hojas para después ser transpirada hacia la atmósfera. En los océanos, el fitoplancton que se encuentra dentro de la zona eufótica (los primeros 50 m de los mares contados desde la superficie del agua) absorben la luz solar y la disipan en calor que es eficientemente absorbido por el agua aumentando así la temperatura de la superficie de los mares e incrementando la evaporación promoviendo huracanes, corrientes oceánicas, atmosféricas y, principalmente, el ciclo del agua [13]. Debido a que el ciclo del agua implica flujos de calor latente y difusión de moléculas de vapor de agua en la atmósfera, contribuye también a la producción de entropía global terrestre.

Basado en un resultado de Onsager (1931), el cual muestra que varios procesos irreversibles se pueden acoplar para aumentar la producción de entropía global de un sistema, Michaelian (2012) ha propuesto la hipótesis de que la vida está acoplada a algunos procesos irreversibles, principalmente al ciclo del agua, y que una de las funciones termodinámicas de la vida es ser un catalizador para la ocurrencia de dichos procesos ayudando así a aumentar la producción de entropía global de nuestro planeta. Diversa evidencia empírica apoya y encaja con esta hipótesis [13]. Por ejemplo, se sabe que el 90% de la energía libre de Gibbs disponible en la luz solar capturada por las hojas de las plantas es usada en la transpiración [19]. Kleidon (2008), ha estimado que sin las plantas las tasas promedio de evaporación sobre tierra firme disminuirían su valor de 2.4 mm/d a 1.4 mm/d, sugiriendo que las plantas pueden ser responsables de hasta el 42% de la evaporación actual [20].

Desde la perspectiva de esta hipótesis, los animales desempeñan la importante función de permitir que los organismos fotosintéticos puedan dispersarse sobre la superficie terrestre distribuyendo sus semillas, fertilizando y proporcionando nutrientes con sus excrementos y con su propio cuerpo (al morir) aumentando así el potencial para disipar fotones y acoplarse al ciclo del agua [13]. Entender la función termodinámica de la vida podría arrojar pistas sobre su propio origen.

El origen disipativo de la vida.

De acuerdo a la sección anterior la principal función termodinámica que hoy en día lleva a cabo la vida es la de disipar en calor la energía de los fotones solares mediante la acción directa de los organismos fotosintéticos [1]. La disipación de energía, a menudo llamada degradación de la energía, hace referencia a la reducción, mediante algún proceso irreversible, de la capacidad de la energía para hacer trabajo útil. Los organismos fotosintéticos disipan energía al convertir los fotones del visible en calor. El calor no tiene la misma capacidad de realizar trabajo que la luz visible porque no puede, por ejemplo, desplazar los electrones de la clorofila de un orbital molecular con cierta energía de enlace a otro con menor energía de enlace para así iniciar el proceso de fotosíntesis.

La teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida [2] considera que la capacidad que tiene la vida para producir entropía disipando energía no es incidental sino la verdadera razón de su existencia. Supone que la vida comenzó como un proceso irreversible que absorbía y disipaba la luz solar que incidía sobre la superficie de los mares en el Arqueano y que no existía como proceso independiente sino que desde sus inicios estuvo íntimamente ligada al ciclo hidrológico. Según esta teoría, las moléculas de DNA, RNA y sus componentes, en particular las bases nitrogenadas, desempeñaban en el origen de la vida, hace 3.85 mil millones de años aproximadamente, la misma función termodinámica que los organismos fotosintéticos hoy en día a través de sus pigmentos orgánicos. El DNA, el RNA y sus componentes, poseen una eficiente capacidad de disipar en calor los fotones UV-C, principal fuente de energía libre en la superficie terrestre en el Arqueano.

En el estudio del origen de la vida, la replicación de los ácidos nucleicos (DNA y RNA) mediante un mecanismo primitivo en el que no intervengan enzimas persiste como uno de los principales problemas a resolver. Desde la perspectiva de la teoría disipativa del origen de la vida, la capacidad disipativa de dichas moléculas pudo haber facilitado y promovido su replicación mediante un mecanismo no-enzimático, llamado mecanismo UVTAR (ver capítulo 3), gracias a la intensa incidencia de fotones UV-C y a las altas temperaturas de los mares en el Arqueano. Comprobar si tal mecanismo es factible daría bases firmes a esta nueva teoría.

El objetivo de este escrito es describir el trabajo con el que se ha comenzado a estudiar experimentalmente el mecanismo UVTAR.

DNA: Franklin, Crick & Watson
1953



Capítulo 2

El DNA

El ácido desoxirribonucleico, mejor conocido como DNA por sus siglas en inglés, es una de las moléculas fundamentales para la vida. Todo organismo conocido tiene contenida su información genética en el DNA, información necesaria para su sobrevivencia, por ello dilucidar su origen es de gran importancia para el estudio de la vida y su evolución en la Tierra.

En este capítulo se da una revisión general sobre la estructura del DNA, se hace una breve mención acerca de su posible origen y se explica la eficiente capacidad disipativa que ayudará a comprender el mecanismo de replicación no enzimática que pudo haber ayudado a la proliferación de esta molécula en el origen de la vida.

2.1. Composición y Estructura

Las moléculas básicas que conforman al DNA son tres: fosfato, desoxirribosa y bases nitrogenadas (hay 4 tipos de estas bases en el DNA: guanina (G), adenina (A), citosina (C) y timina (T)). Una molécula de desoxirribosa está unida, por un lado, a un grupo fosfato, y por otro lado a una base nitrogenada, conformando así un desoxirribonucleótido, comúnmente llamado dNMP por sus siglas en inglés: *deoxy-Nucleoside-5'-MonoPhosphate* (ver figura 2.1). Es la unión de varios desoxirribonucleótidos lo que conforma una cadena simple de DNA.

La forma nativa del DNA, es decir la forma en la que se encuentra dentro de todo ser vivo, es la de una *doble hélice* (figura 2.2). Esta se compone de dos cadenas simples de DNA unidas entre sí, una frente a la otra, gracias a enlaces de hidrógeno que se forman entre las bases de ambas cadenas.

La doble hélice goza de gran estabilidad en solución acuosa gracias, principalmente, a dos fuerzas no-covalentes: los *enlaces de hidrógeno* y el *api-*

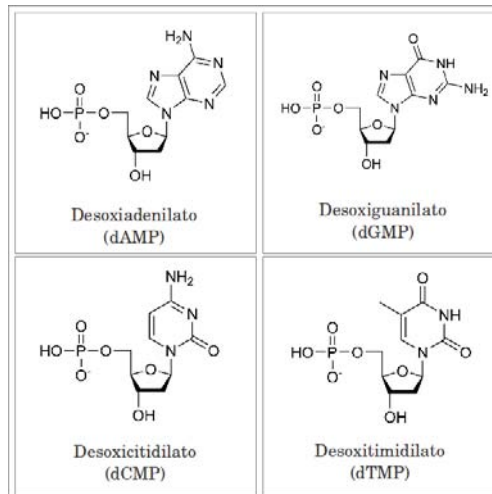


Figura 2.1: Los cuatro monómeros del DNA. A valores fisiológicos de pH, el grupo fosfato existe en forma desprotonada, lo cual confiere el carácter ácido al DNA. Imagen construida a partir de figuras de la fuente <http://es.wikipedia.org/wiki/Desoxirribonucleótido>

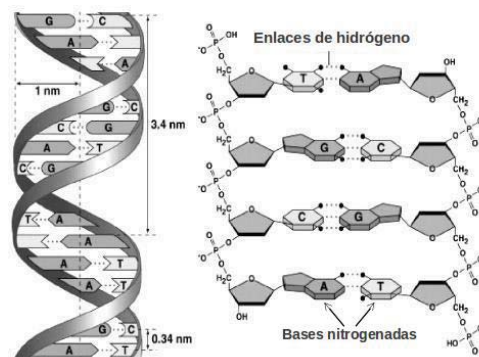


Figura 2.2: A la izquierda se ilustra la forma típica y las dimensiones de una doble hélice de DNA; a la derecha se muestran los pares de bases tipo Watson-Crick que se forman entre las bases nitrogenadas y que mantienen unidas a las cadenas de DNA.

lamiento de las bases. Por un lado los enlaces de hidrógeno se forman de manera natural entre los átomos electronegativos de las bases de una de las cadenas, como el nitrógeno y el oxígeno, con los átomos de hidrógeno de las bases de la otra cadena. Según el modelo de la doble hélice de Watson y Crick, se forman 3 enlaces de hidrógeno entre la *guanina* de una cadena con la *citósina* de la otra, mientras que sólo dos entre *timina* y *adenina*, y en esto se basa la complementariedad de las cadenas de DNA en la doble hélice. Por otro lado el apilamiento ocurre entre las bases de una misma cadena gracias a la interacción entre los electrones deslocalizados de sus orbitales moleculares π . Las interacciones con las bases vecinas por medio de fluctuaciones electrónicas, llamadas interacciones $\pi - \pi$, obliga a las bases a apilarse pero con un ángulo de desfase de 36° respecto a la base de abajo, de manera que diez bases apiladas forman una hélice completa en el DNA. Algunos estudios han revelado que el apilamiento de bases es por mucho la fuerza que más contribuye a la estabilidad de la doble hélice, y dicho apilamiento es también favorecido por la exclusión de moléculas de agua entre las bases debido al intrínseco carácter hidrofóbico de estas [21].

La estructura nativa de las cadenas sencillas de DNA es más compleja que la de cadenas dobles; puede estar formada por muchas regiones de bases apiladas, horquillas y segmentos de conformación más dinámica. Las cadenas simples adquieren estas estructuras locales de acuerdo a la secuencia. Un apilamiento completo de las bases de una cadena sencilla de DNA no ocurre sino por debajo de la temperatura ambiente [22]. Los polinucleótidos simples de adenina, poli(A), son los únicos de los que se sabe adquieren una estructura de hélice (ver figura 2.3). Los de timina, poli(T), son descritos como no-estructurados refiriéndose a que no adoptan una conformación regular o estable. En cuanto a los polinucleótidos de citosina y guanina, poli(C) y poli(G) respectivamente, sus estructuras tridimensionales han sido difíciles de interpretar [23].

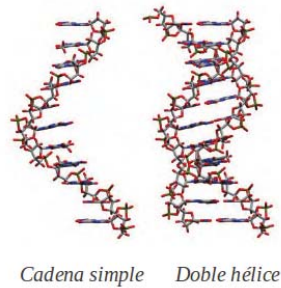


Figura 2.3: Hay regiones en las cadenas sencillas donde también se apilan las bases adquiriendo una conformación similar a la que adoptan cuando están en doble hélice, particularmente si tienen regiones abundantes de adenina. Imagen extraída de la referencia [24].

Aunque no es tan común, es posible hallar al DNA formando otro tipo de estructuras como triplex (hélices formadas por tres hebras) o cuádruplex (hélices con cuatro hebras). Las hélices de tres hebras se forman cuando una tercera cadena se une a una doble hélice en aquellas regiones abundantes en purinas o pirimidinas. La tercera cadena se une por medio de enlaces tipo Hoogsteen, de los cuales se ilustran dos ejemplos importantes en la figura 2.4.

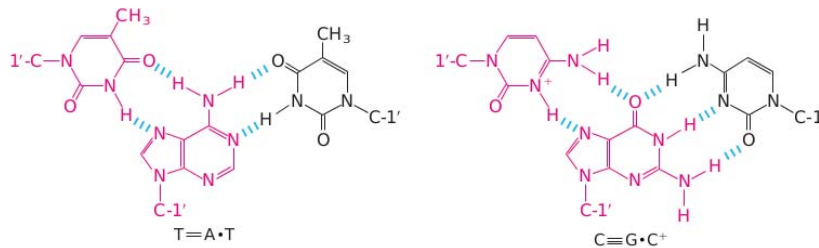


Figura 2.4: Los pares de bases tipo Hoogsteen se ilustran en rojo. Generalmente los triplex, originados por este tipo de enlaces, son más estables a valores de pH ácidos ya que el triplete $CG\cdot C^+$ necesita de un residuo de citosina protonado. Imagen: Lehninger

Por otro lado, en cadenas con altas proporciones de residuos de guanina se llegan a formar cuádruplex, y aunque aun no está bien definido bajo qué condiciones específicas se forman tales estructuras, los recientes estudios sugieren que su formación es dependiente tanto de una secuencia específica

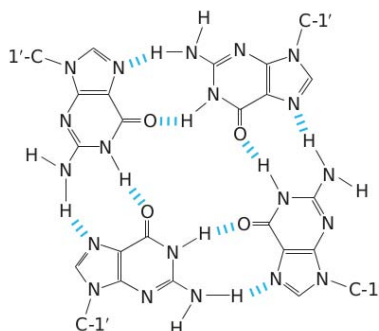


Figura 2.5: Patrón de apareamiento de guaninas en un cuadruplex. Imagen: Lehninger

de las bases (como la secuencia TTAGGG que estabiliza estructuras cuadruplex en los telómeros de los cromosomas en las células eucariotas) como de la concentración de sales en la solución.

2.2. Posible origen y presencia en la sopa primitiva

Es casi un consenso que el DNA apareció como resultado de un proceso evolutivo llevado a cabo dentro de los sistemas celulares que basaban su existencia en moléculas de RNA en etapas tempranas de la vida, es decir que se cree que el DNA surgió después que el RNA en el curso de la evolución y que incluso surgió después de que el RNA tenía ya una relación con las proteínas tal que algunas de estas estaban codificadas en el RNA y ayudaban a su metabolismo.

Sin embargo se ha demostrado que no sólo los componentes del RNA sino también los de DNA, incluidos oligos de DNA, pueden sintetizarse bajo posibles condiciones prebióticas y por tanto es muy probable que RNA y DNA hayan coexistido en la sopa primitiva desde antes de la aparición de los primeros sistemas celulares conformados por genomas de RNA, *i.e.* antes del llamado mundo del RNA. Buena parte de los estudios que demuestran la síntesis prebiótica de DNA apoya también a la teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida porque revelan el importante papel que

la luz UV, altas temperaturas y variaciones de temperatura, factores esenciales para el mecanismo UVTAR, desempeñan en esa síntesis. Por ejemplo, se ha reportado que se puede sintetizar adenina y guanina irradiando con luz UV una solución de ácido cianhídrico [25]. La acción de la luz UV sobre soluciones evaporadas de β -alanina y urea en presencia de minerales de montmorilonita produce timina y uracilo [26]. Desoxirribosa y uracilo, junto con algunos aminoácidos, pueden sintetizarse de manera anóxica a partir de una mezcla de agua, carbonato de calcio, formaldehído e hidracina, utilizando como fuente de energía libre luz UV-C de 254 nm [27].

Una mezcla de bases nitrogenadas y desoxirribosas, bajo la acción de luz UV y de calor, resulta en la formación de nucleósidos, particularmente desoxiadenosina [28]. Se reportó la síntesis de nucleótidos en la superficie del satélite BION-11 a partir de una mezcla de adenosina, desoxiadenosina, citidina o timidina y bifosfato de sodio expuesta a rayos UV y rayos gama [29]. La rotación del satélite produjo variaciones de temperatura, un efecto al cual le atribuyen una mayor producción de nucleótidos comparada con la que obtuvieron en el laboratorio donde sólo emplearon luz UV.

Oligonucleótidos de desoxitimidina se sintetizaron a partir de una mezcla deshidratada de desoxitimidina 5'-trifosfato, desoxitimidina 5'-fosfato, 4-amido-5-imidazol carboxiamida, cianamida y cloruro de amonio, calentada a 60°C durante 18 horas [30]. También se reportó policondensación abiogénica de nucleótidos de adenina adsorbidos en partículas minerales de kaolinita bajo acción de radiación ultravioleta [31].

El papel de la luz UV pudo ir más allá de la síntesis de los componentes fundamentales de los ácidos nucleicos y de su polimerización. Powner *et al.* [32] encontraron que la radiación prolongada con luz UV, seguida de un período de calentamiento sobre una mezcla de ribonucleótidos de pirimidina activados (producidos con una novedosa síntesis en la que se evita el problema de producir ribosas y pirimidinas libres para esta síntesis) convierte el ribonucleótido de citosina en el del uracilo¹. Extraordinariamente, las condiciones de irradiación destruyen isómeros del nucleótido de citosina, por lo que la luz UV también puede cumplir una función “sanitizante” para que el nucleótido de citosina, elemento natural de los ácidos nucleicos de los seres vivos, se produzca en ausencia de estereoisómeros concomitantes.

¹Se sabe que el uracilo decae a su estado base más rápido que la citosina después de haber sido excitados con luz UV de 267 nm [33]. Esto deja ver que la luz UV-C puede dirigir la transformación (evolución) de algunas moléculas hacia cierto destino, en este caso hacia un estado más estable y más disipativo porque al permanecer menos tiempo en el estado excitado el uracilo es menos propenso a sufrir reacciones fotoquímicas que lo degraden y al mismo tiempo puede disipar más fotones que la citosina en un mismo lapso de tiempo (ver sección 2.3).

En resumen, es muy probable que el DNA haya estado presente en la sopa primitiva como producto de una síntesis prebiótica, pero la visión actual es que su aparición en los seres vivos se debió no a una incorporación de esta molécula desde los ambientes prebióticos a los sistemas celulares sino a un proceso de evolución dentro de esos sistemas que llevó a cambiar su genoma de RNA a uno de DNA confiriendo así mayor estabilidad a la información genética [34].

2.3. Disipador de fotones UV-C en calor

El DNA interacciona fuertemente con la luz UV-C absorbiendo principalmente los fotones de 260 nm. Es bien sabido que esta interacción se debe a la sección de absorción de área de las bases nitrogenadas que lo forman: adenina, guanina, citosina y timina.

La gran mayoría de los fotones absorbidos por el DNA se disipan de manera no radiativa al convertir la energía de excitación en movimiento vibracional molecular, o sea en calor. La formación de dímeros de timina, y en general la de fotoproductos, tiene un rendimiento cuántico del orden de 10^{-4} [35] lo que quiere decir que de 1000 fotones absorbidos uno provoca una modificación en la molécula de DNA por formación de algún fotoproducto. Hay múltiples estudios enfocados a la dinámica de deexcitación de las moléculas de DNA y de sus monómeros. Todos ellos apuntan al hecho de que estas moléculas, tanto cadenas de DNA como nucleótidos y bases libres, decaen al estado base en un tiempo del orden de cientos de femtosegundos ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) gracias a un mecanismo llamado *conversión interna*, mediado por una intersección cónica entre las superficies de energía potencial del estado base y del excitado. Además, algunos otros estudios sugieren que la formación de dobles hélices reduce el tiempo que permanecen las moléculas en el estado excitado, confiriendo mayor estabilidad respecto a las cadenas simples ante posibles fotoreacciones que dañen la estructura del DNA. A continuación una serie de resultados que respaldan lo anterior.

En solución acuosa las bases libres llegan al estado excitado $^1\pi\pi^*$ después de absorber un fotón de 267 nm. La mayoría de las bases excitadas regresan directamente al estado base en tiempos del orden de femtosegundos mediante conversión interna. Del 100 % de las pirimidinas que llegan a dicho estado excitado, el 60 % regresa directamente al estado base por conversión interna, mientras que el 40 % restante pasa por un estado excitado intermedio ($^1n\pi^*$)

tardando entre 10 y 150 picosegundos (10^{-12} s) más en regresar al estado base [36]². Pero el estado base al que llegan después del proceso de conversión interna es uno con exceso de energía vibracional, es decir que llegan a un estado base que no está en equilibrio térmico con las moléculas del solvente que lo rodean. La conversión interna deposita más de 4 eV de energía a los modos vibracionales de una base dada [24]. El equilibrio térmico se alcanza de manera natural mientras las moléculas del solvente van “absorbiendo” el exceso de energía de las bases mediante interacciones a través de enlaces de hidrógeno, proceso conocido como *enfriamiento vibracional*. El agua ha sido el solvente en el que se ha detectado el enfriamiento vibracional más rápido, cuya duración característica para cualquiera de las bases es aproximadamente de 2 ps.

Los nucleósidos y nucleótidos de pirimidina principalmente, también regresan al estado base mediante conversión interna, y aquellos que pasan por el estado intermedio $^1n\pi^*$ tardan entre 3 y 6 veces más en decaer al estado base que las bases libres [36]. Por ejemplo, los respectivos tiempos de vida de los estados excitados para la adenosina, guanosina, citidina y timidina son 290, 460, 720 y 540 fs (± 40 fs) según los estudios de Pecourt et al. [37], ver figura 2.7. Los nucleótidos de adenina (AMP) y de timina (TMP) decaen en 0.33 ± 0.03 ps y 0.74 ± 0.12 ps, respectivamente [38]. Una solución acuosa de nucleótidos de citosina (CMP) y de guanina (GMP) decaen en 2.0 ± 0.3 ps [39].

²Después de llegar al estado $^1n\pi^*$, una pequeña fracción de las bases pasa a otro estado excitado intermedio, $^3\pi\pi^*$, tardando microsegundos (10^{-6} s) para llegar al estado base [24].

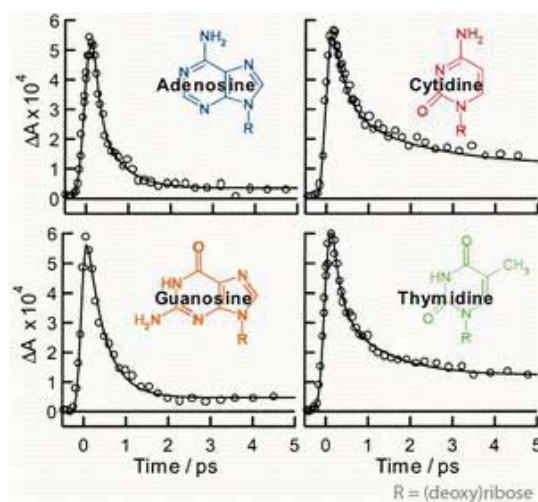


Figura 2.6: Decaimiento de los 4 nucleósidos del DNA. La señal representa la población de moléculas en estado excitado; en los primeros 2 ps después de la excitación, la señal cae aproximadamente al 50 % o menos de su valor más alto. Pecourt et al. [37]

La configuración espacial de las bases en el DNA crea nuevas rutas de decaimiento que no se observan en las bases libres o en los nucleótidos. Se han hecho estudios en oligonucleótidos (cadenas sencillas de longitud corta) que muestran dos componentes de decaimiento: uno ultrarrápido que dura menos de 1 ps y otro mucho más lento con duración de hasta cientos de picosegundos. El decaimiento más rápido se atribuye a conversión interna, como sucede en las bases libres y los nucleótidos, y el más lento a formación de excímeros³. Los oligos de adenina (dA)₆ y (dA)₁₈ revelan una primera componente de decaimiento aproximada a 200 fs, y una segunda componente mayor a 100 ps [40]. Según los resultados de Crespo-Hernández et al. [38] la señal de mayor duración en los oligos (dA)₁₈ es de 126 ± 8 ps, siendo responsable de esta señal entre 37 y 65 % de la población de moléculas excitadas con luz de 266 nm. Ellos mismos reportan que el decaimiento de oligos (dT)₁₈ es casi idéntico al de sus nucleótidos (TMP), es decir con una componente de decaimiento de 0.72 ± 0.12 ps, y que sólo el 10-15 % de la señal original muestra un decaimiento más lento de 103 ± 18 ps atribuido a la formación de dímeros de timina.

³Excímero es el término utilizado para designar a un estado electrónico excitado con sustancial carácter de transferencia de carga que involucra dos moléculas iguales. Se le denomina exciplex al mismo fenómeno pero cuando las moléculas involucradas son distintas.

Bucher et al. [41] han hecho estudios con 14 diferentes oligonucleótidos de cadena sencilla de entre dos y cinco bases de longitud, para los cuales utilizaron 2'-desoxiuridina (U), 2'-desoxiadenosina (A), 5-metil 2'-desoxicitidina (mC)⁴ y desoxiguanosina (G), y encontraron también dos componentes de decaimiento: el primero ocurría durante los primeros 10 ps posteriores a la estimulación con un pulso de luz de 295 nm, el cual sólo era absorbido por G y mC ; la segunda componente se extendía desde 20 hasta 300 ps, siendo el primer valor el correspondiente al dímero mCG y el último, de 300 ps, al dímero GA. Supusieron que la primera componente correspondía a una conversión interna con duración de 1-2 ps, seguida de enfriamiento vibracional que, en promedio, duraba 6 ps, y que la segunda señal se debía a estados excitados de larga duración en los que el apilamiento de bases permite separación y deslocalización de cargas generando así estados iónicos en algunas de las bases vecinas, las cuales decaen al estado base neutro por recombinación de cargas. También estimaron la fracción de moléculas que eran responsables de la segunda señal y encontraron valores de entre 0.23 y 0.45 para los diferentes oligos⁵.

Por otro lado el apareamiento de bases permite que el decaimiento al estado base sea de menor duración en las doble hélices que en las cadenas sencillas. Jinquen Chen et al. [43] mostraron que el 60% de las doble hélices $(dA)_{10} \cdot (dT)_{10}$ excitadas con un pulso de luz de 295 nm, decaen con una constante de tiempo de 4.7 ± 0.5 ps, y el 40% restante con una constante de 62 ± 17 ps (figura 2.8). Ellos creen que la señal que decae con la constante de tiempo más corta se debe al enfriamiento vibracional de las doble hélices que sigue a la conversión interna ultrarrápida que lleva a las moléculas directamente del primer estado excitado al estado base “hot” (estado base con exceso de energía vibracional). Este enfriamiento resulta ser más lento comparado con el de 2.7 ps que reportan Su et al. [44] para diferentes oligos de adenina $(dA)_n$ de cadena sencilla, o con el de 2.38 ± 0.12 ps reportado por Crespo-Hernández et al. [38] para los oligos $(dT)_{18}$. En cambio, la componente de 62 ps es más rápida comparada con la de los mismos oligos. Por ejemplo Bucharov et al. [40] reportan decaimientos con constantes mayores a 100 ps para los oligos $(dA)_6$ y $(dA)_{18}$, y Crespo-Hernández y su grupo [38] de-

⁴La metil-citosina es una base nitrogenada que se encuentra con una frecuencia de 4-5% en el DNA de los mamíferos y juega un papel importante como marcador epigenético.

⁵Estos resultados corresponden a experimentos hechos con agua pesada (D_2O) por lo que las constantes de decaimiento y la fracción de la población de moléculas responsables de la señal más lenta deberían ser menores en presencia de agua (H_2O) según lo sugieren los resultados de De la Harpe et al. [42] en su estudio sobre el efecto del deuterio en los estados excitados de oligonucleótidos.

terminaron constantes de 126 ± 8 ps para $(dA)_{18}$ y de 103 ± 18 ps para $(dT)_{18}$.

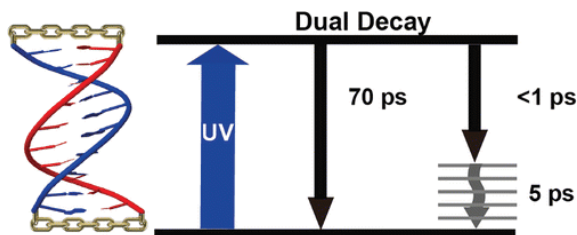


Figura 2.7: Esquema del doble decaimiento de una muestra del duplex $(dA)_{10} \cdot (dT)_{10}$ estabilizados por moléculas de hexaetilenglicol en ambos extremos de las cadenas. El 60% de las moléculas excitadas pasa directamente al estado base “hot” en menos de un picosegundo por conversión interna, y llegan al equilibrio térmico con el solvente en los próximos 5 ps por enfriamiento vibracional. El resto de las moléculas pasan por estados excitados intermedios decauyendo al estado base con una constante de tiempo aproximada a 70 ps. Imagen: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja4049459>

Uno de los estudios de Bucher y su grupo sobre la deexcitación de cadenas de DNA reporta que los oligos complementarios $d(A_6GA)$ y $d(U^mCU_6)$ decaen con una constante lenta de 490 ps y 65 ps, respectivamente, mientras que la doble hélice formada por ambos decae en 42 ps. El enfriamiento vibracional correspondiente a las doble hélices resultó de 6 ps [45]. Dado que los oligos estaban disueltos en agua pesada se podría esperar que las constantes sean más pequeñas en el caso en que estuvieran disueltas en agua ya que se sabe que existe un efecto isotópico del solvente en el enfriamiento vibracional de dobles hélices de DNA [38, 42]. Los estudios de De la Harpe et al. [42] con cadenas dobles $d(GC)_9 \cdot d(CG)_9$ muestran que tanto la forma de las doble hélices, sea del tipo B-DNA o Z-DNA, como el tipo de enlaces en los pares de bases, tipo Watson-Crick o Hoogsteen, prácticamente no influyen en la dinámica de decaimiento. Encontraron que la constante de decaimiento para la estructura tipo Z es $\sim 20\%$ más lenta que la del tipo B, y $\sim 15\%$ más rápida para la de enlaces tipo Hoogsteen respecto a los de Watson-Crick. Sorpresivamente sus estudios revelan sólo una constante de decaimiento, comparada con las dos constantes reportadas en los estudios antes citados. Además son las constantes más cortas reportadas para cualquier doble hélice: 6.3 ± 0.6 ps para la forma B-DNA; 7.6 ± 0.8 ps para Z-DNA; y 5.3 ± 0.6 ps para las estructuras con enlaces tipo Hoogsteen. Otro estudio de los mismos autores demuestra que el 61% de los duplex $d(C_4G_4) \cdot d(C_4G_4)$ recupera su estado base con una constante de 3.1 ± 0.7 ps y el resto con una constante más lenta de 22 ± 5 ps.

En conclusión, la formación de dobles hélices no sólo confiere la ventaja de decaer al estado base más rápido que las cadenas sencillas complementarias sino que al mismo tiempo reduce la posibilidad de que las moléculas sufran algún daño debido a la formación de estados reactivos de transferencia de carga [45]. La eficiente capacidad disipativa de estas moléculas, junto con su estabilidad ante posibles fotorreacciones bajo radiación UV, pudo ser esencial para su replicación en tiempos del origen de la vida, como se explica en el siguiente capítulo.

Capítulo 3

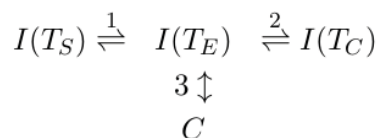
UVTAR. Mecanismo propuesto para la replicación no enzimática de DNA y RNA en el origen de la vida.

La continuidad de la vida se basa en la herencia del material genético. Los seres vivos contamos con un complejo mecanismo que replica el material genético para poder heredarlo; en el proceso intervienen enzimas especializadas e indispensables para esta tarea, como las DNA-polimerasas, RNA-polimerasas, helicasas, topoisomerasas, etc. Actualmente la información genética de todo ser vivo está almacenada en moléculas de DNA, pero esto pudo no haber sido siempre así. De hecho la hipótesis del mundo del RNA [46] propone que el material genético de las primeras formas de vida en la Tierra era el ácido ribonucleico (RNA). Esta hipótesis enfrenta dos problemas; el primero es el cómo se originaron de manera abiótica las primeras moléculas de RNA y el segundo es cómo se replicaban. Si bien aún no hay una solución completa al problema del origen de las moléculas de RNA, recientemente se han hecho grandes avances, como los del grupo de Suhterland [32], que hacen adoptar cierto optimismo de que pronto se encontrará una ruta de ensamblaje de ribonucleótidos y de oligos de RNA [47]. Por otra parte, es prácticamente imposible que enzimas tan especializadas como las RNA-polimerasas existieran en tiempos del origen de la vida, por lo que es necesario hallar un mecanismo de replicación no-enzimática factible bajo las condiciones del Arqueano que explique cómo después de la aparición de las primeras moléculas de RNA podían estas replicarse y así entender cómo proliferaban las moléculas que eventualmente serían esenciales para la vida.

Cualquier mecanismo propuesto para la replicación del DNA o RNA en los comienzos de la vida debería cumplir al menos con dos requisitos: 1) un proceso de desnaturalización que haya permitido a las moléculas de DNA o RNA adoptar la forma lineal para poder servir como moldes para su replicación y 2) uno o varios catalizadores que pudieran haber estado presentes en la Tierra primitiva gracias a los cuales se sintetizaran las nuevas moléculas de DNA o RNA. A diferencia del DNA que de manera nativa se halla formando dobles hélices compuestas por cadenas simples complementarias, el RNA generalmente se encuentra en cadenas sencillas conformando estructuras secundarias complejas plegándose sobre sí mismas gracias al apareamiento de bases entre regiones complementarias de las propias cadenas. La replicación requiere que ese tipo de estructuras secundarias se desnaturalicen (*i.e.* se rompan los puentes de hidrógeno que las mantienen estables) para que el RNA pueda adquirir la forma de una cadena lineal y así poder ser replicada. La presencia de catalizadores (*e.g.* iones metálicos y superficies minerales) parece ser indispensable para la replicación porque las reacciones de condensación de ribonucleótidos que llevan a la formación de polímeros de RNA ocurren a tasas comparables con las tasas de hidrólisis de esos mismos polímeros.

La razón para la proliferación en la Tierra primitiva de nucleótidos y otros pigmentos orgánicos capaces de absorber fotones del rango UV-C puede hallarse en un resultado de Prigogine (1967) sobre las reacciones autocatalíticas derivado dentro del marco de la termodinámica de procesos irreversibles. Una reacción autocatalítica es aquella en la que al menos uno de sus productos actúa como catalizador para la reacción, y tales reacciones, como cualquier otro tipo de reacción química, surgen para disipar un potencial químico. Según Prigogine, cuando una reacción autocatalítica se lleva a cabo dentro de un sistema que se mantiene fuera del equilibrio, la concentración del componente que sirve como catalizador para la reacción aumenta por encima de la concentración que tendría si la misma reacción se llevara a cabo con el sistema cerca del equilibrio. Siguiendo a Prigogine y considerando la producción de pigmentos orgánicos como una reacción fotoquímica autocatalítica que promueve la disipación del flujo incidente de fotones solares, Michaelian (2013) [48] ha mostrado que la concentración de los componentes del DNA y RNA, y en general la concentración de moléculas capaces de disipar el flujo de fotones solares (aminoácidos aromáticos, porfirinas, aminoácidos tipo micoporinas, etc.) aumentaría sobre la superficie de la Tierra por encima de la concentración esperada bajo condiciones de equilibrio. El flujo de energía del espectro fotónico procedente de la superficie del Sol $I_S(\lambda)$, el cual, con fines ilustrativos, puede asumirse como el correspondiente a un cuerpo negro, *i.e.* $I(T_S)$ con $T_S = 5760$ K, es convertido, mediante la absorción y disipación por

los pigmentos en el agua, en el espectro emitido por la superficie de la Tierra (también asumida como un cuerpo negro) $I(T_E)$ con $T_E = 287$ K. La reacción fotoquímica ocurre cuando los fotones procedentes del Sol forman los pigmentos orgánicos, cuya concentración es C , que a su tiempo actúan como disipadores de esos mismos fotones, por tanto la reacción es autocatalítica en el primer proceso de disipación $I(T_S) \rightarrow I(T_E)$. A su vez, la radiación emitida por la superficie de la Tierra es absorbida en la atmósfera por las nubes y reemitida hacia el espacio pero a una temperatura más baja, conformando así el segundo proceso de disipación $I(T_E) \rightarrow I(T_C)$ con $T_C = 259$ K. Un esquema de esta reacción se ilustra abajo.



Cuando el sistema se encuentra lejos del equilibrio, las tasas de los regresos de las reacciones 1 y 2 pueden considerarse esencialmente iguales a cero. Con el mismo razonamiento que Prigogine usó para las reacciones puramente químicas, Michaelian demuestra que la concentración de los pigmentos orgánicos incrementa debido a su capacidad catalítica de disipar el espectro fotónico solar en el de emisión de la Tierra.

En 1973, Carl Sagan hizo notar que la rápida disipación de los fotones UV por parte de los ácidos nucleicos pudo proveer una importante ventaja selectiva al RNA y al DNA sobre otras moléculas orgánicas fácilmente sintetizables bajo la condición de radiación UV de la Tierra primitiva [3]. La teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida [1, 2] propone un mecanismo explícito mediante el cual no sólo las cadenas de RNA sino también las de DNA pudieron replicarse en la sopa primitiva, sin ayuda de enzimas, gracias a su capacidad disipativa. El mecanismo ha sido llamado *Reproducción de DNA/RNA Asistida por luz UV y Temperatura*, o **UVTAR** por sus siglas en inglés, porque está basado en dos de las condiciones ambientales imperantes en la Tierra primitiva: 1) la intensa radiación UV de entre 240 y 290 nm que llegaba directamente a la superficie de la Tierra debido tanto a la falta de ozono en la atmósfera primitiva como a la fuerte emisión de este tipo de radiación por parte del Sol, y 2) a las altas temperaturas en la superficie de los mares, cercanas a $\sim 80^\circ\text{C}$, que facilitaban la desnaturalización de algunas cadenas de ácidos nucleicos.

El mecanismo UVTAR tomó lugar una vez que la temperatura de la superficie de los mares primitivos descendió lo suficiente como para permitir que el apareamiento de bases entre las cadenas molde y los nucleótidos libres complementarios pudiera llevarse a cabo y con ello la replicación. Se ha estimado que la temperatura superficial de los mares descendió por debajo de los 100°C hace 4.4 mil millones de años [49]. La evidencia geoquímica en forma de cocientes de isótopos de oxígeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) hallada en el sur de Africa indica que la superficie de la Tierra era cercana a 80°C hace 3.8 mil millones de años [5] y que descendió a $70\pm 15^\circ\text{C}$ durante el período comprendido entre 3.5-3.2 mil millones de años atrás [6]. Estas temperaturas que predominaban en el tiempo que se creó surgió la vida (hace 3.8 mil millones de años) pudieron haber permitido la replicación del RNA y DNA según el mecanismo UVTAR. El mecanismo, ilustrado en la figura 3.1, se puede resumir en dos pasos:

- I. Durante el transcurso de los días arqueanos las cadenas dobles u otras estructuras secundarias de DNA y RNA se desnaturalizaban gracias al calor que ellas mismas generaban al disipar los fotones UV-C. Además se podían formar nuevos nucleótidos y oligos ya que la luz UV provee la energía libre necesaria para llevar a cabo la síntesis de estos compuestos, como lo muestran algunos estudios, e.g. [29, 31].
- II. En las noches, cuando bajaba la temperatura de los mares por evaporación, radiación y conducción de calor hacia la atmósfera, las cadenas desnaturalizadas y los nuevos oligos formados por la acción de la luz UV servían como moldes para su propia replicación, la cual era probablemente promovida por algunos iones divalentes como Mg^{2+} y Zn^{2+} , siendo ambos iones cofactores de las RNA-polimerasas y DNA-polimerasas, actuales enzimas que se encargan de replicar el RNA y el DNA, respectivamente ¹. La polimerización, y en especial la formación de dobles hélices o estructuras con apareamiento de bases por puentes de hidrógeno tipo Watson-Crick o Hoogsteen, confería estabilidad a las mismas bases nitrogenadas, y en particular a las pirimidinas, ante reacciones fotoquímicas. Además se sabe que los ácidos nucleicos tienen cierta afinidad química con algunos aminoácidos aromáticos [51] los cuales también absorben en el rango UV-C y por tanto la formación de complejos *ácidos nucleicos-aminoácidos aromáticos* que captaran

¹Bridson y Orgel [50] han encontrado que el Zn^{2+} puede catalizar la polimerización de ribonucleótidos activados de guanina (ImpG) sobre oligos molde de citosina (oligoC); sin embargo no cataliza la polimerización de ribonucleótidos de adenina (ImpA) sobre moldes de uracilo (oligoU).

más fotones UV-C podría haber aumentado el proceso de disipación fotónica y ser así termodinámicamente seleccionada.

Así, al final de cada jornada arqueana, la concentración de DNA y RNA en la sopa primitiva pudo haber aumentado y con ello el potencial para disipar los fotones solares incidentes.

El mecanismo propuesto es *selectivo* por dos razones: 1) sólo aquellas cadenas dobles de DNA o estructuras secundarias de RNA cuya temperatura de desnaturalización y renaturalización quedara dentro del rango de temperaturas de la sopa primitiva podían desnaturalizarse durante los días y replicarse durante las noches; aquellas con temperatura de desnaturalización más alta que la temperatura de los mares (*e.g.* con alto porcentaje de pares de bases GC) no podían desnaturalizarse por completo y por tanto no tenían la oportunidad de replicarse por completo; 2) las cadenas de DNA o RNA con quiralidad D tenían más probabilidad de desnaturalizarse que aquellas con quiralidad L debido a que en la tarde la temperatura de la superficie de los mares era más alta y la luz en la superficie se hallaba ligeramente polarizada hacia la derecha [53].

Es importante hacer notar que el mecanismo UVTAR ha sido propuesto para explicar la replicación de los ácidos nucleicos para etapas previas a la formación de los primeros sistemas celulares, es decir cuando el RNA y DNA existían libres flotando en la superficie de los mares primitivos. Sin embargo este mecanismo también puede explicar la replicación para cuando empezaban a formarse las células primitivas cuyas membranas fueran transparentes a la radiación UV-C y permeables a nucleótidos y oligos pequeños de DNA y RNA necesarios para la replicación, pero no permeables a las cadenas largas que se replicaban.

La teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida reconoce el comienzo de la vida como un proceso irreversible ligado directamente a la disipación de la fuente de energía libre más intensa y disponible en la superficie de la Tierra, el potencial fotónico. El mecanismo de replicación propuesto no requiere, en principio, de una reproducción fiel de la información contenida en el RNA o DNA, de hecho no requiere que en sus orígenes esas moléculas hayan tenido que guardar alguna información específica [48].

Reproducción de DNA/RNA Asistida por luz UV y Temperatura (UVTAR)

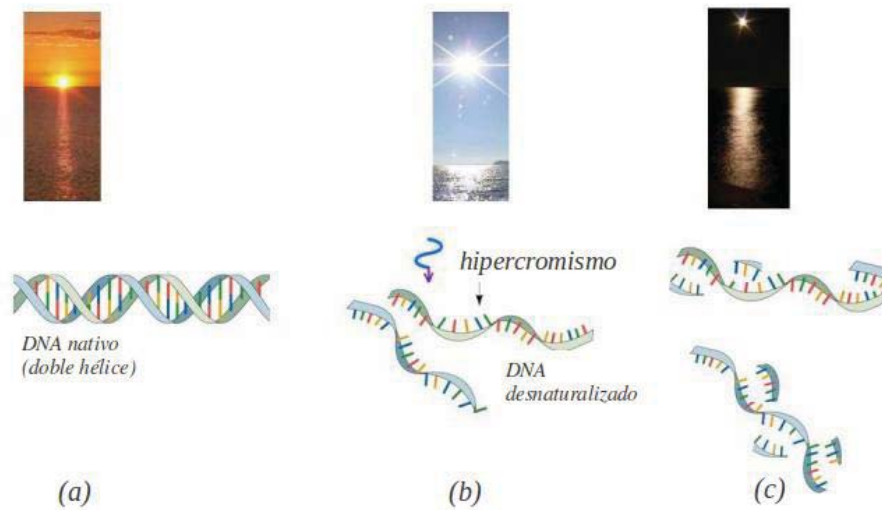


Figura 3.1: Esquema del mecanismo UVTAR. (a) Cadenas dobles u otras estructuras secundarias de DNA/RNA suspendidas en la superficie de la sopa primitiva durante las primeras horas del día. (b) Por las tardes, la temperatura de la superficie de la sopa primitiva se elevaba (en parte por la absorción de fotones UV por la cadenas de ácidos nucleicos) por encima de la temperatura de desnaturalización de algunas de las cadenas de DNA/RNA provocando que estas se separaran. (c) Durante la noche la sopa primitiva se enfriaba por debajo de la temperatura de desnaturalización y las cadenas simples de DNA/RNA funcionaban como moldes para la elaboración de cadenas complementarias. El proceso entero de replicación estaba dirigido por la producción de entropía resultado de la absorción y disipación de fotones UV. Imagen adaptada de la referencia [52].

Capítulo 4

Probando experimentalmente el primer paso del mecanismo UVTAR. Desnaturalización de DNA por luz UV

En el capítulo anterior se explicó que el mecanismo UVTAR pretende brindar una explicación a la replicación temprana del DNA y RNA en la sopa primitiva. En este capítulo se reportan los resultados del experimento que pone a prueba el primer paso de dicho mecanismo. Específicamente el experimento consistió en someter a radiación UV-C diferentes muestras de DNA en solución acuosa y a temperatura constante comprobando que puede ser desnaturalizado bajo la acción de dicha radiación y renaturalizarse al suspenderla. Debido a su fácil manejo y cuidado en el laboratorio sólo se ha utilizado DNA en este experimento, sin embargo es plausible esperar los mismos resultados con RNA ya que su proceso de desnaturalización y renaturalización es esencialmente igual al del DNA.

4.1. La desnaturalización en el DNA

Se dice que una muestra de DNA se ha desnaturalizado cuando las dos cadenas que forman a cada doble hélice se han separado por completo una de la otra (ver fig 4.1). La desnaturalización se logra gracias al rompimiento de los puentes de hidrógeno formados entre las bases, por lo que en realidad este proceso no sólo se lleva a cabo en las dobles hélices sino en cualquier otra estructura secundaria de DNA o RNA como hairpins (horquillas), self-dimers (cadenas dobles formadas por oligos idénticos), triplex, cuadruplex, etc.

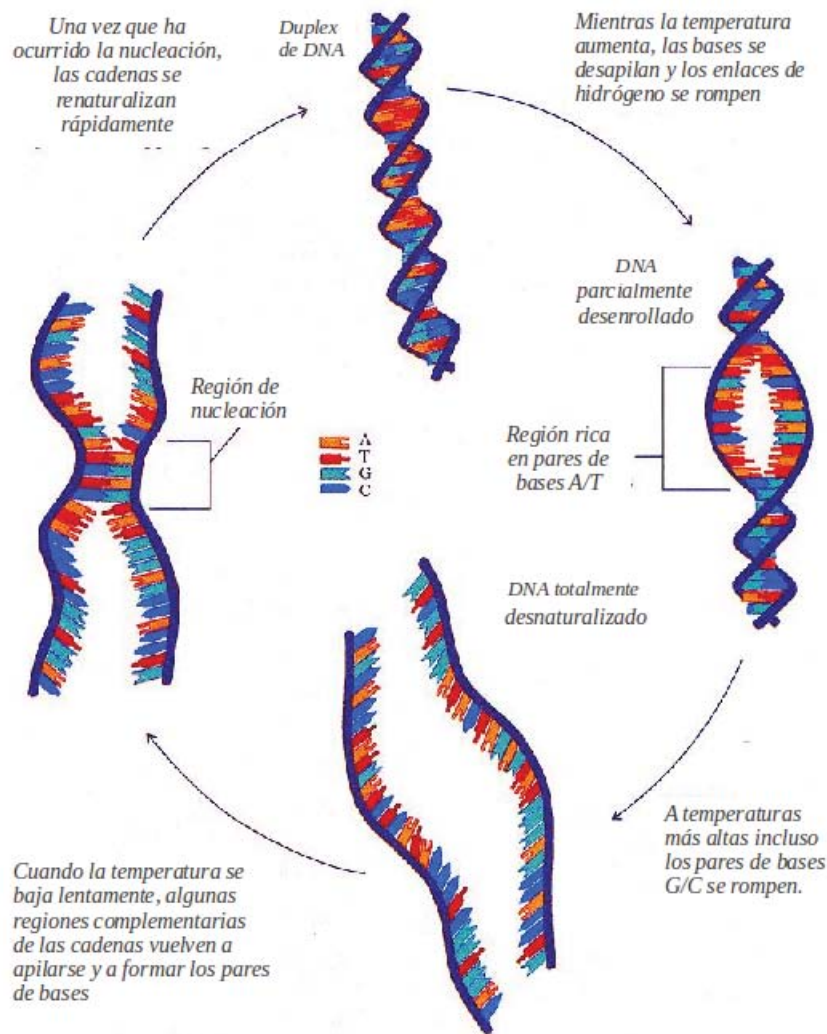


Figura 4.1: Representación de la desnaturalización y renaturalización de una doble hélice de DNA por aumento de temperatura. Imagen adaptada a partir de: sandwalk.blogspot.mx/2007/12/dna-denaturation-and-renaturation-and.html

Desde un punto de vista biológico la desnaturalización del DNA es el preludio de dos procesos celulares centrales para el mantenimiento de los seres vivos: la *replicación* y la *transcripción* del DNA. Por un lado la replicación consiste en hacer copias de la información genética de los organismos para que cada célula nueva contenga dicha información y también para poder heredar parte de esa información a la progenie; y por otro lado la transcripción

del DNA es el proceso mediante el cual se genera una molécula de RNA, tomando como molde una de las cadenas del DNA, para luego ser utilizada en la elaboración de las enzimas necesarias para el funcionamiento del metabolismo celular.

Dentro de las células de cada organismo el DNA es desnaturalizado por un grupo de enzimas denominadas *helicinas*. Estas se unen a la doble hélice en sitios específicos y comienzan a romper los puentes de hidrógeno entre las bases gracias al aporte de energía de moléculas de ATP. Sin embargo, la desnaturalización del DNA en el laboratorio se puede lograr de diversas maneras y se ha vuelto un paso esencial en todos los procesos de ingeniería genética. Es sabido que a bajos niveles de pH (p.e. 3.1) o a concentraciones suficientemente bajas de cationes (entre 10^{-2} y 10^{-4} M para Na^+ , y entre 10^{-5} y 10^{-8} M para Mg^{2+}) se puede provocar la separación de las cadenas de la doble hélice a temperatura ambiente [54], pero uno de los métodos que induce una desnaturalización reversible y que es usado en la técnica por excelencia para amplificar una muestra de ácidos nucleicos, la técnica PCR, es el aumento de la temperatura de la solución que contiene al DNA.

Generalmente a temperaturas mayores a 90°C el DNA de cualquier organismo queda desnaturalizado por completo y aunque la desnaturalización depende del pH y de la cantidad de cationes presentes en la solución, también depende del apilamiento de los pares de bases en las cadenas. La fuerza de las interacciones entre las bases apiladas depende de las mismas bases: es más fuerte cuando los pares de bases apilados son de G/C y más débil cuando son de A/T ¹. Mientras aumenta la temperatura, las dobles hélices comienzan a desenrollarse en aquellas regiones en donde están unidas más débilmente. En esas regiones se forman “burbujas” de cadenas sencillas y generalmente sus secuencias son abundantes en apilamientos A/T. Las regiones ricas en apilamientos G/C son más estables y se desnaturalizan a temperaturas más altas (figura 4.1).

Se puede registrar el grado de desnaturalización de una muestra de DNA monitoreando la evolución de la absorción a, o alrededor de, 260 nm respecto al aumento de temperatura: conforme la temperatura aumenta la absorción a 260 nm también, es decir que las cadenas de DNA muestran un *efecto hipercrómico* respecto a la desnaturalización (ver figura 4.2).

Vekshin [55] ha desarrollado un modelo para explicar el efecto hipercrómico

¹Algunos detalles de este argumento se discuten en <http://sandwalk.blogspot.mx/2007/12/dna-denaturation-and-renaturation-and.html>

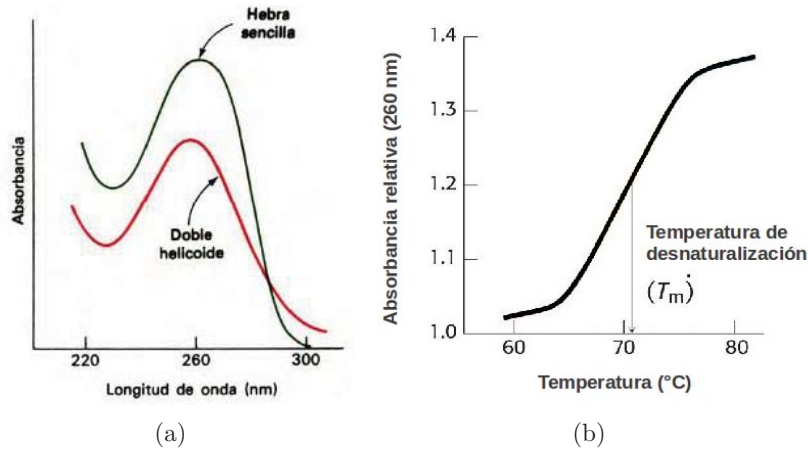


Figura 4.2: a) Efecto hipercrómico: La absorción en el rango del UV-C es menor en las cadenas dobles respecto a las cadenas simples complementarias que las conforman; b) Esquema de una curva de desnaturalización: el aumento de temperatura en una solución de DNA nativo es acompañado de un aumento en la absorción a 260 nm.

co en polímeros biológicos basado en la suposición de que en un apilamiento molecular los cromóforos se "escudan" entre sí de la luz. El escudamiento o *efecto de apantallamiento*, como se le identificará en adelante, lleva a una reducción en el coeficiente promedio de extinción de los cromóforos y a un ensanchamiento del espectro. En una macromolécula en la que el apilamiento de los cromóforos es tal que la distancia entre ellos es más pequeña que la longitud de onda de la luz con la que son irradiados, la probabilidad de que cada cromóforo absorba un fotón es menor a, y depende de, la probabilidad de absorción del cromóforo que le antecede respecto a la dirección en la que viaja la luz; por ello el efecto de apantallamiento es un fenómeno de absorción estadístico y no está relacionado a las interacciones moleculares. La aplicabilidad del modelo de apantallamiento ha sido demostrado para ácidos nucleicos.

Al ser irradiadas con luz UV-C, las bases nitrogenadas del DNA y RNA experimentan transiciones electrónicas entre sus orbitales $\pi - \pi^*$. Tales transiciones ocurren paralelamente al plano de las bases, y dependen de la longitud de onda incidente (ver figura 4.3). Una absorción efectiva de la luz ocurre cuando esta incide perpendicular al plano de las bases; cuando el haz de luz se dirige a lo largo de dicho plano la absorción es pequeña o no ocurre. En las dobles hélices de DNA el apilamiento de las bases reduce la probabilidad

de que cada una de ellas absorba un fotón debido a la presencia de las que le anteceden respecto a la dirección de propagación del haz. Cuando las dobles hélices se desnaturalizan ocurre un desfase en el apilamiento, como se muestra en la figura 4.3, y con ello crecen las probabilidades de la absorción de fotones para las bases. Este es el origen del efecto hipercrómico en el DNA.

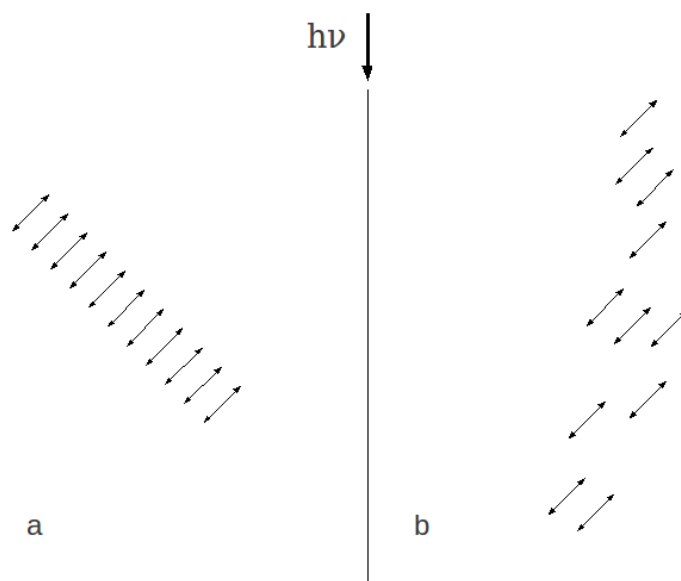


Figura 4.3: Variantes de la organización de los dipolos en un arreglo molecular: a) apilamiento (como en el caso del DNA en cadena doble), b) apilamiento desfasado (como en las cadenas sencillas una vez que el DNA se ha desnaturalizado). Imagen basada en la figura 3.1 de la referencia [56].

La longitud de persistencia es un parámetro que representa la dimensión para la cual un polímero se comporta como una barra o columna rígida. Para el caso del DNA en cadena doble a temperatura ambiente y disuelto en solución iónica, la longitud de persistencia es de 50 nm [57]. La longitud de cada espiral en una doble hélice es de 3.4 nm, aproximadamente (figura 2.2, capítulo 2). Esto significa que dentro del rango de la longitud de persistencia del DNA hay, por mucho, 14 nucleótidos con orientaciones estrictamente paralelas entre sí y al vector eléctrico de la luz. Los demás nucleótidos que conforman la espiral están rotados a ángulos múltiplos de 36° y no participan en el efecto de apantallamiento (para una longitud de onda dada hay una dirección del momento de transición responsable de la absorción, otras direcciones no contribuyen a la absorción de tal longitud de onda; ver figura 4.4). Sabiendo entonces cuántas bases por vuelta de hélice pueden participar

en el apantallamiento, Vekshin calculó los coeficientes de extinción promedio de las bases en el apilamiento y con ello estimó que para el DNA el hipercromismo resultante es aproximadamente de 45 % [55, 56], lo cual coincide con los resultados experimentales.

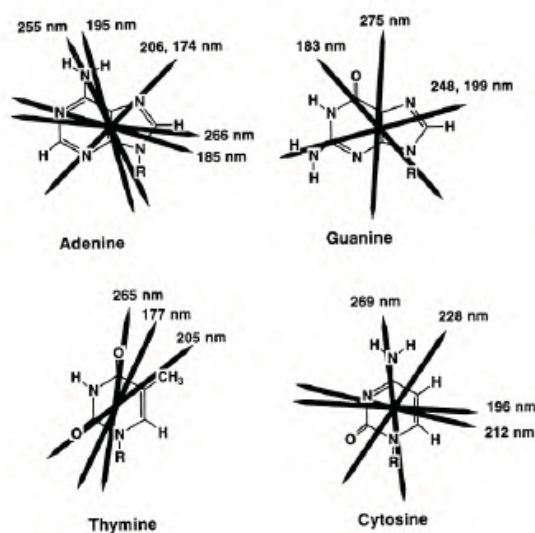


Figura 4.4: Representación de los momentos dipolares para las diferentes bases nitrogenadas del DNA. Cada vector representa la transición electrónica entre los orbitales $\pi - \pi^*$ correspondiente a las longitudes de onda que producen dichas transiciones. Imagen: *Biopolymers* 61(3), 2001/2002.

4.2. Experimento: Propósito y Antecedentes

El experimento que se describirá a continuación se realizó con el objetivo de desnaturizar una muestra de DNA en solución acuosa irradiándola con luz UV y renaturalizarla suspendiendo la irradiación por cierto intervalo de tiempo, llevando a cabo todo este proceso a una temperatura constante adecuada.

Que el DNA pueda ser desnaturizado por la luz UV no es una propuesta nueva. De hecho es bien sabido que el cáncer de piel generado por prolongadas exposiciones a los rayos UV-A y UV-B involucra precisamente una desnaturización de nuestro DNA al formarse dímeros de timina: los puentes de hidrógeno que las timinas forman con sus bases complementarias de la

otra cadena se rompen al absorber fotones UV y de este modo se produce la desnaturalización en un par de bases. Sin embargo, el objetivo de este experimento ha sido desnaturalizar el DNA sin causar cambios en las bases de las cadenas, es decir sin la formación de fotoproductos como dímeros de timina, para permitir la renaturalización durante períodos de obscuridad, y al mismo tiempo conseguir un número mucho mayor de bases desnaturalizadas que permita una posterior replicación, aunque sea parcial, de las cadenas de DNA.

Por un lado, en 1965 Hagen et al. [58] reportaron que la radiación UV puede desnaturalizar el DNA. Sometieron dos muestras de DNA nativo, es decir de DNA en doble hélice, a irradiaciones sucesivas de luz UV de 253.7 nm, mientras las muestras se mantenían a temperatura ambiente. Después de cada irradiación se aumentaba la temperatura a 90°C sólo a una de las muestras, con el objetivo de desnaturalizar el DNA con calor. Registraron los valores de absorción de cada muestra y las compararon; después de 2 horas de irradiación no se detectó diferencia entre los espectros de absorción del DNA nativo y del desnaturalizado por calor, por lo que concluyeron que la luz UV había desnaturalizado la muestra de DNA nativo.

Por otro lado, Marmur y Doty publicaron en 1961 [59] que una muestra de DNA nativo desnaturalizado por calor, y luego enfriado rápidamente a temperatura ambiente (lo cual provoca formación de estructuras distintas a la del DNA nativo por formación de pares de bases no específicos o entre cadenas que no son enteramente complementarias), puede renaturalizarse tal que recupera sus características físicas y químicas de la muestra nativa si su temperatura es de nuevo elevada a aquella que quede aproximadamente 25°C por debajo de la temperatura de desnaturalización. Además mostraron que la tasa de renaturalización aumenta si la concentración iónica es mayor a 0.4 M de Na^+ , y que el porcentaje total del DNA renaturalizado aumenta entre más cortas y homogéneas son las secuencias del DNA. Por ejemplo, el DNA de mamíferos proveniente de células con alto contenido de esta molécula se renaturalizan poco; el DNA bacteriano con un reducido contenido de DNA por célula experimenta una renaturalización extensiva; y las bacterias más pequeñas, junto con los bacteriófagos, los cuales tienen el contenido más bajo de DNA, muestran una renaturalización casi completa.

Por tanto existe evidencia de los dos fenómenos importantes del objetivo de este experimento: la desnaturalización por luz UV y la renaturalización a temperatura constante. Sin embargo el aspecto innovador de esta propuesta es conseguir que ambos fenómenos ocurran a la misma temperatura y a valores altos de esta para ser consistentes con las posibles condiciones de la Tierra

primitiva. Se busca que el proceso de desnaturalización/renaturalización sea reproducible para dar sustento a la sospecha de que este proceso ocurría durante cada ciclo día/noche en el Arqueano dando posibilidades a una replicación no-enzimática. Finalmente, se busca obtener una medida cuantitativa de la desnaturalización por luz UV-C para estimar la viabilidad de este proceso en la sopa primitiva.

4.3. Material

Mientras la solución de DNA se irradiaba con luz UV a temperatura constante, se medía la extinción (absorción + dispersión) de ciertas longitudes de onda, especialmente alrededor de 260 nm, al pasar a través de la solución. El equipo y material utilizado se enlistan a continuación.

4.3.1. Equipo y montaje experimental

I. *Lámpara de deuterio-halógeno tungsteno.*

DT-MINI-2GS; UV-VIS-NIR Light Source; Ocean Optics.

La lámpara de deuterio emite un espectro continuo entre 210 y 400 nm, abarcando casi por entero el espectro ultravioleta, y también emite en el visible, con un pico característico a ~ 656 nm, y parte del infrarrojo cercano. La lámpara de halógeno tungsteno emite también de modo continuo desde 450 nm, *i.e.* entre el azul y violeta, hasta aproximadamente 1100 nm, en el rango del infrarrojo. En la figura 4.5 se muestran los espectros de emisión de ambas lámparas. La potencia de la lámpara de deuterio es de 3.8 W mientras que la de halógeno es de 1.2 W. El diámetro de la apertura de salida de luz es de 0.5 mm.

II. *Compartimento de muestras controlable por temperatura para espectroscopía de fibra óptica.*

Qpod; Quantum Northwest.

Este compartimento puede mantener, aumentar o disminuir de manera rápida y precisa la temperatura de la muestra bajo estudio usando el efecto Peltier e incluye un pequeño agitador magnético para homogeneizar la muestra. El controlador de temperatura (TC 125, Ocean Optics) opera desde -30° hasta 105°C , con un error de $\pm 0.05^\circ\text{C}$.

III. *Espectrómetro.*

HR4000CG-UV-NIR; Ocean Optics.

Es capaz de detectar longitudes de onda entre 195 y 1120 nm, con una resolución de 0.25 nm. Las lecturas hechas por el espectrómetro son

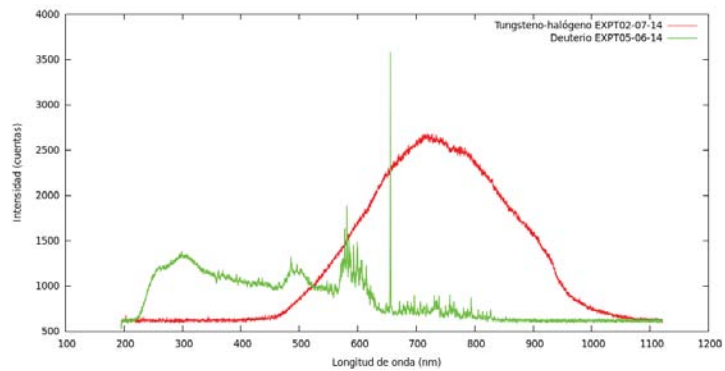


Figura 4.5: Espectro de emisión de las lámparas de deuterio y tungsteno-halógeno DT-MINI-2GS (Ocean Optics) a temperatura ambiente.

enviadas, vía USB, a un ordenador para visualizarlas en el programa de análisis Spectra Suite.

IV. *Celdas de cuarzo.*

Contenedor de muestras de sección cuadrada de 1 x 1cm. El cuarzo es transparente a la luz UV por lo que las celdas de este tipo son ideales para este experimento.

V. *Agitador magnético.*

Permite homogeneizar la temperatura de la solución dentro de las celdas de cuarzo y mantiene relativamente constante el flujo de DNA a través del haz de luz.

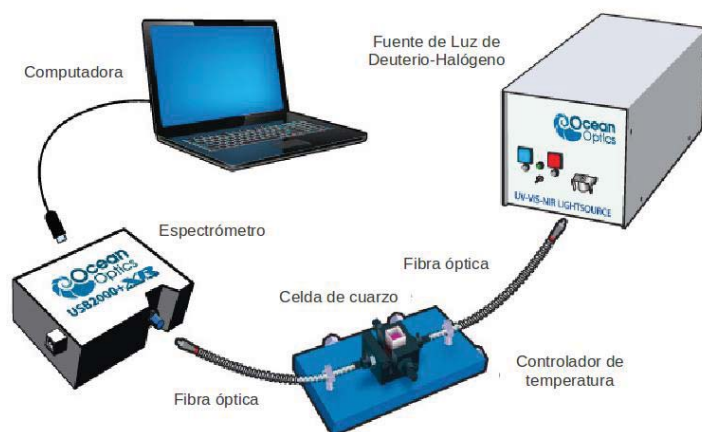


Figura 4.6: Representación del montaje usado para verificar el efecto de desnaturalización de la luz UV sobre el DNA. La celda de cuarzo que contiene la muestra de DNA se coloca dentro del controlador de temperatura (centro, abajo). Por un lado del controlador se conecta la lámpara de deuterio y por el lado opuesto el espectrómetro, el cual manda los datos a la computadora. Imagen modificada de <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=10118>.

4.3.2. Reactivos

I. Muestras de DNA.

DNA genómico de levadura de cerveza (*S. cerevisiae*);

DNA genómico de esperma de salmón;

DNA sintético de 25 pb (pares de bases):

5'-CTATGGAGCGGATATACCATGGACG-3'

3'-GATACCTCGCCTATATGGTACCTGC-5';

DNA sintético de 48 pb:

5'-GGTCGCAGAGGCACATGGGTATATATATACGTATGCGGCGTGCCATCC-3'

3'-CCAGCGTCTCCGTGTACCCATATATATATGCATACGCCGCACCGTAGG-5'.

II. Agua mili-q.

Algunas pruebas fueron realizadas con DNA disuelto sólo en agua. El agua mili-q se utiliza generalmente para cultivo celular y se caracteriza por estar libre de nucleasas, enzimas que degradan los ácidos nucleicos y que afectarían los resultados del experimento. El pH de este tipo de agua es de 7.0 a temperatura ambiente.

III. *Tampón PBS.*

La mayor parte de las pruebas se realizaron con DNA disuelto en solución PBS o tampón fosfato salino el cual es usado para mantener el pH constante durante las pruebas. Su pH a temperatura ambiente es de 7.3 y está compuesto por *cloruro de potasio* (KCl) 2.7 mM, *cloruro de sodio* (NaCl) 136.9 mM, *fosfato de potasio monobásico* (KH₂PO₄) 1.5 mM y *fosfato de sodio dibásico* (Na₂HPO₄) 8.9 mM. Los iones K⁺ y Na⁺ que contiene permiten formar y estabilizar las estructuras en doble hélice al contrarrestar las cargas negativas del esqueleto del DNA.

4.4. Método

4.4.1. Preparación de la solución de DNA

Las muestras de DNA sintético en cadena doble (de 25 y 48 pb) se prepararon a partir de oligos complementarios. Dentro de una celda de cuarzo se disolvieron cantidades equimolares de cada oligo en tampón PBS, luego se calentó la mezcla a 85°C durante 10 minutos y finalmente se bajó la temperatura a una tasa de 1°C/min para permitir una óptima formación de dobles hélices. Cada oligo fue diseñado para evitar la formación de dímeros de timina al irradiarlos con luz UV y para que su temperatura de desnaturalización no estuviera próxima a la temperatura de ebullición del agua.

De la muestra de DNA biológico de esperma de salmón, con concentración stock de 10 mg/ml, se disolvieron 3 μ l en 2 ml de agua purificada; y del DNA de levadura de cerveza (*S. cerevisiae*), con la misma concentración stock, se disolvieron 10 μ l en 1 ml de solución tampón PBS².

4.4.2. Irradiación de la solución

Antes de cada corrida se obtuvo una curva de desnaturalización del DNA utilizado para determinar su temperatura de desnaturalización y a partir de ella elegir las diferentes temperaturas a las que se realizarían las pruebas.

Después de fijar la temperatura de la solución se esperaba a que alcanzara el equilibrio térmico, el cual quedaba determinado a partir del momento en que la extinción a 260 nm alcanzaba un valor prácticamente constante.

²Agradecemos el obsequio de ambas muestras biológicas a la Dra. Laura Ongay y a Yolanda Camacho del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Luego se procedía a realizar lo que en adelante llamaremos **pruebas de luz**:

- I. *Período de luz*: se dejaba incidir la radiación de la lámpara por un tiempo determinado mientras se registraba la evolución de la extinción de luz a 260 nm.
- II. *Período de obscuridad*: se suspendía la entrada de radiación sobre la solución y se dejaba reposar así por cierto período de tiempo (generalmente de la misma duración al período de luz) para permitir que el efecto causado por la luz se revirtiera.

Esta simple prueba de luz se repetía para saber si el efecto causado por la luz y la obscuridad eran reproducibles. La importancia de las pruebas de luz radica en que simularían el comportamiento de las cadenas de DNA durante el día y la noche en la sopa primitiva en los días del Arqueano.

4.4.3. Recolección de datos: extinción de luz.

La *extinción de luz* se calcula como:

$$Ext_{\lambda} = -\log_{10} \left(\frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \right) \quad (4.1)$$

donde S_{λ} es la intensidad de la longitud de onda λ a través de la muestra; D_{λ} la intensidad de λ cuando no hay luz pasando a través de la muestra (i.e. el “ruido” correspondiente a λ); y R_{λ} la intensidad de λ a través del solvente (espectro de referencia). De acuerdo a su definición la extinción es adimensional. Cuando la extinción de cierta longitud de onda toma el valor igual a 1 quiere decir que la muestra sólo ha dejado pasar el 10 % de la luz de esa longitud de onda, cuando es igual a 2 es porque sólo ha dejado pasar el 1 %, cuando es igual a 3 es que se ha dejado pasar el 0.1 %, y así sucesivamente.

Las mediciones consistieron en obtener espectros de extinción de las soluciones de DNA a determinados intervalos de tiempo, generalmente cada 14 segundos, mientras cada muestra era irradiada con la luz de lámpara de deuterio y su temperatura se mantenía constante. Al principio de cada corrida se obtenía un espectro de extinción del *solvente* (espectro de referencia) y este se restaba de manera automática en el programa a cada espectro de extinción de *solvente + DNA*, de acuerdo a la ecuación 4.1. Los datos fueron obtenidos mediante el programa Spectra Suite de Ocean Optics, el cual recibía los datos directamente del espectrómetro y fueron guardados en un archivo para su posterior análisis.

Los espectros de extinción son resultado de dos fenómenos a nivel molecular: el primero es la *absorción de luz* entendida como la atenuación de cualquier onda electromagnética que interaccione con determinado material. Los átomos o moléculas de cada material absorben los fotones de sólo ciertas longitudes de ondas electromagnéticas, llevando a sus electrones a estados excitados para luego regresar a su estado base por distintos mecanismos (fosforescencia, fluorescencia, conversión interna o formación de fotoproductos) por lo que cada material tiene asociado un espectro de absorción (ver figura 4.7). Para el caso del DNA, nos enfocamos a la absorción que ocurre a longitudes de onda de entre 200-300 nm, la cual se da gracias a la conocida interacción entre este tipo de luz y las bases nitrogenadas del DNA [60, 61]. El segundo componente de la extinción es la *dispersión*, entendida como el cambio de dirección de propagación de un haz incidente sobre una muestra. La dispersión ocurre porque el campo eléctrico de la onda de luz incidente obliga a los electrones de las moléculas dispersoras a oscilar con la frecuencia de la onda de luz, y tal oscilación, que da origen a un momento dipolar inducido, es fuente a su vez de una onda con idénticas características a la onda incidente pero propagándose en diferente dirección. En nuestro caso la dispersión es originada por las moléculas de DNA³, ya sea en cadena doble o en cadena sencilla, y afecta a todas las longitudes de onda incidentes pero de distinta manera, según se trate de dispersión tipo Rayleigh o Mie.

La teoría de dispersión, tanto la de Rayleigh como la de Mie, aborda en primera aproximación la dispersión causada por partículas esféricas, por lo que la dimensión que se suele usar para caracterizar a dichas partículas es su diámetro (d). La dispersión de Rayleigh ocurre cuando el tamaño de las partículas dispersoras es muy pequeña comparada con la longitud de la onda incidente (λ) y predomina cuando $d < \lambda/20$. La longitud de onda y el diámetro de la partícula determinan la dispersión (S_R) según la relación: $S_R \sim d^6/\lambda^4$. Por otro lado la dispersión de Mie la origina cualquier tamaño de partícula pero predomina cuando $d > \lambda/20$. Al contrario que la dispersión de Rayleigh, la de Mie (S_M) no depende de la longitud de onda, sólo del diámetro de la partícula tal que $S_M \sim d^2$.

³Las moléculas de agua y los iones del tampón utilizado también dispersan la luz. Sin embargo, al restar la extinción del espectro de referencia a cada uno de los espectros de las soluciones de DNA, sólo la dispersión debido al DNA es la que prevalece.

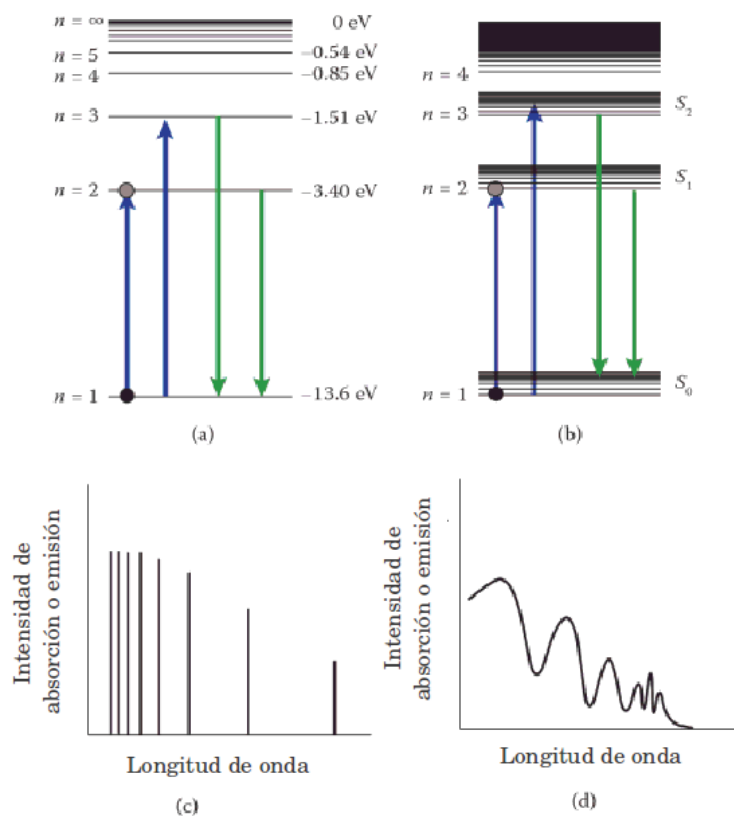


Figura 4.7: Origen de los espectros de absorción. Las transiciones electrónicas entre los niveles de energía de un (a) átomo (los números corresponden al átomo de hidrógeno) o (b) de una molécula, determinan los espectros de emisión y absorción. Un átomo revela niveles discretos, excepto a altas energías donde los niveles están muy próximos entre sí, y por ello los espectros constan de líneas de emisión o absorción, como en el panel (c). En cambio en una molécula se revelan niveles adicionales debido a bandas vibracionales y/o rotacionales de las mismas moléculas, por lo que sus espectros se conforman de curvas continuas, panel (d). Imagen adaptada de la figura 9.11 (p.234) de la referencia [62].

4.5. Resultados y su análisis

4.5.1. Espectros de extinción.

Espectros típicos de extinción de los tipos de DNA estudiados se muestran en la figura 4.8.

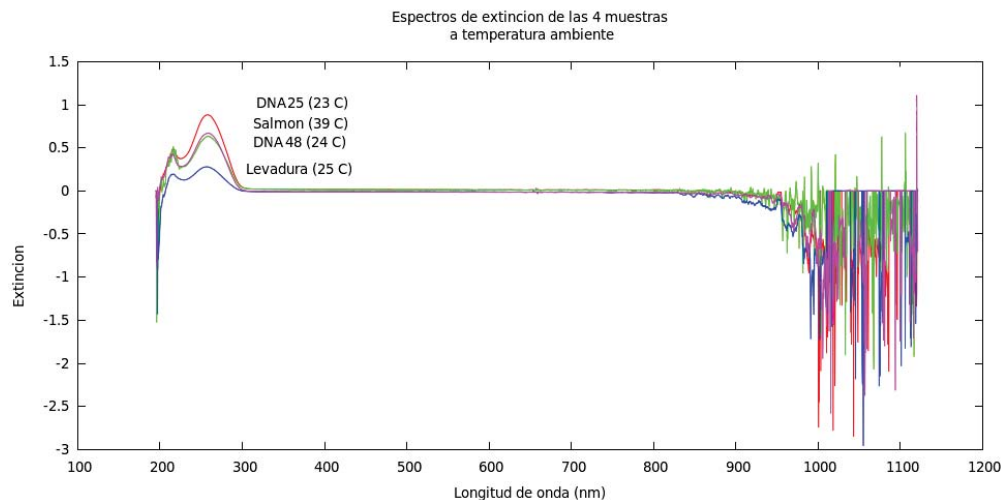


Figura 4.8: Espectros de extinción de luz correspondientes a 4 muestras de DNA: de levadura, de espermatozoos de salmón, sintético de 25pb y sintético de 48pb. Los espectros abarcan el rango comprendido entre 210 y 1100 nm.

Como se muestra en las gráficas de la figura 4.8, una de las características de la extinción del DNA es una curva parecida a una campana en el ultravioleta medio, entre 200 y 300 nm, la cual toma un valor máximo cerca de 260 nm; otra característica es el valor mínimo de absorción que se presenta alrededor de 225 nm. La lámpara de deuterio emite débilmente en las regiones comprendidas entre 200-220 nm y 900-1120 nm (ver figura 4.5) lo cual causa muchas variaciones en los espectros de extinción a lo largo de esas regiones, por ello nuestro análisis se ha enfocado a la región comprendida entre 220 y 800 nm.

La figura 4.9 muestra que en la región 300-800 nm los espectros de las muestras sintéticas de DNA se superponen entre sí, y lo mismo sucede con los espectros de las muestras biológicas. Este hecho es notable porque los DNA sintéticos son cadenas cortas y los biológicos cadenas mucho más largas, por lo que de estos resultados se puede inferir que la extinción en esa región del espectro depende del tamaño de las cadenas presentes en la solución y

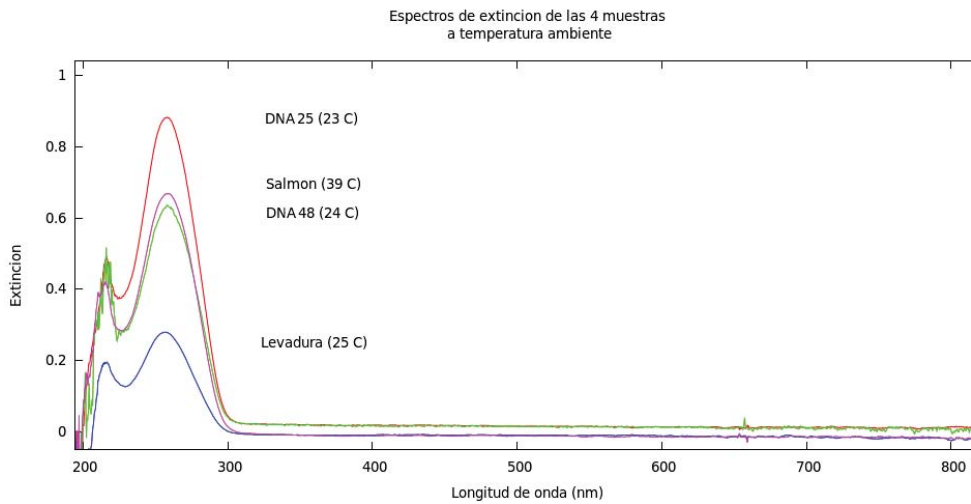


Figura 4.9: Todos los picos de este tipo de muestras están alrededor de 260 nm y unos son más altos que otros debido a que las concentraciones de cada tipo de DNA son distintas: a mayor concentración mayor valor de extinción alrededor de 260 nm.

también de las concentraciones de pares de bases, produciendo una mayor extinción las moléculas de cadenas cortas respecto a las más largas. La figura 4.10 muestra un acercamiento que hace más evidente esta superposición entre los espectros.

La señal entre 300-800 nm es producto de la dispersión de las moléculas de DNA. La teoría de dispersión considera sólo partículas esféricas (la caracterización de la dispersión debido a partículas no-esféricas se vuelve muy complicada) y las cadenas de DNA no tienen tal forma, pero a manera de ejercicio podemos considerarlas como tales sólo para dar una idea de qué longitudes de onda podrían experimentar dispersión de Rayleigh o Mie. Para la solución de DNA de 25pb las longitudes de onda mayores a 170 nm, es decir todo el rango de detección del espectrómetro usado, sufrirán dispersión tipo Rayleigh. Para las moléculas de 48pb la dispersión de Rayleigh predominará entre 200 y 326 nm, mientras que la de Mie en el resto del espectro, es decir entre 326 y 1120 nm. Para las muestras de DNA de origen biológico es más difícil determinar qué tipo de dispersión predominará debido a que desconocemos el tamaño promedio de las moléculas de DNA pero como mínimo su longitud debe ser del orden de miles de pares de bases. Dado que en solución acuosa las cadenas dobles no permanecen como columnas rígidas sino que se doblan en distintas partes adoptando formas más relajadas, la

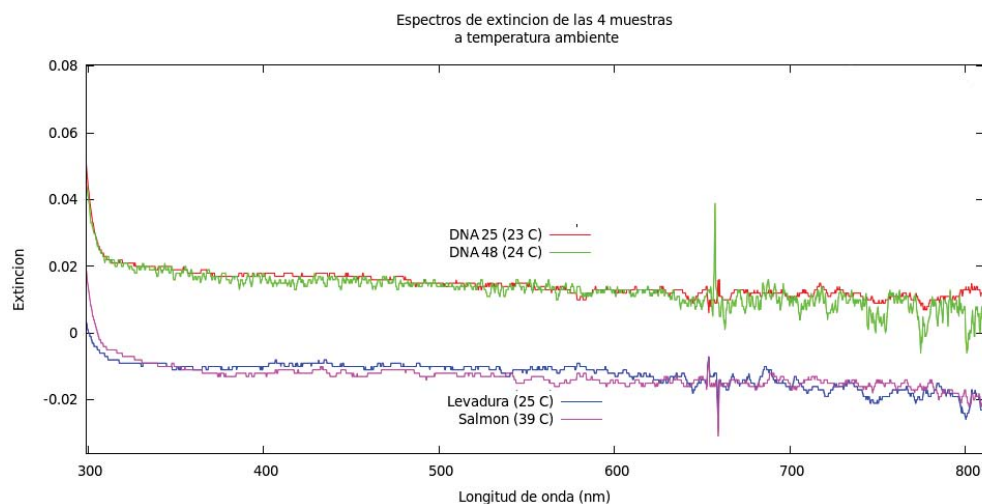


Figura 4.10: Aunque hay diferencias evidentes en la región 300-800 nm, los espectros de los DNA sintéticos coinciden entre sí; lo mismo para el caso de las muestras de DNA de origen biológico.

longitud determinada por los miles de pares de bases que las conforman no será la dimensión característica sino una menor, por ejemplo la equivalente a cientos de pares de bases. Tomando como dimensión característica la longitud de persistencia de una doble hélice, *i.e.* 50 nm correspondiente a 150pb, las longitudes de onda menores a 1000 nm experimentarán dispersión de Mie. O sea que todas las longitudes de onda detectadas por el espectrómetro usado sufrirán dispersión de Mie debido a las muestras de DNA biológico. Lo anterior podría ser la causa de la diferencia en la región 300-800 nm entre las muestras sintéticas y las biológicas (figura 4.10).

En resumen, la parte de los espectros que interesa a nuestro análisis se limita a las longitudes de onda de entre 200 y 800 nm. En la región del UV medio, entre 200 y 300 nm, no sólo se revela la fuerte absorción por parte de las bases del DNA sino que también está presente, aunque en menor medida, una parte de luz dispersada que depende de la dimensión característica de las cadenas; y a partir de 300 nm la dispersión es la total responsable de la señal.

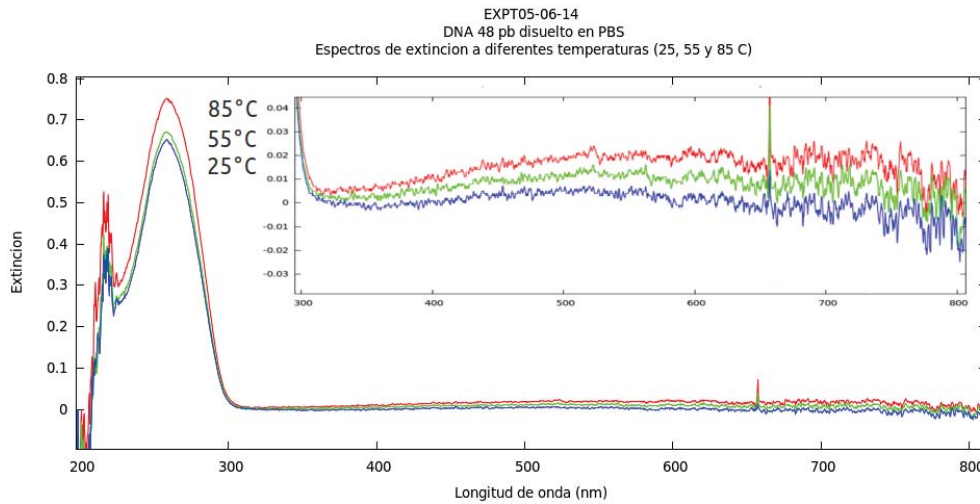


Figura 4.11: Efecto del aumento de temperatura en los espectros de la solución de DNA de 48pb. Cada espectro corresponde a la temperatura indicada a un lado del espectro.

4.5.2. Efecto de la temperatura en los espectros de extinción.

Dado que la hipótesis del experimento consiste en que el calor producido por las moléculas de DNA al disipar la energía de los fotones del UV-C propicia la desnaturalización del mismo DNA por un aumento local de la temperatura, se presenta ahora el efecto del aumento de la temperatura en los espectros de extinción para luego tratar de identificar este mismo efecto pero en las pruebas a temperatura fija bajo irradiación con luz UV-C.

Como se mencionó al principio del capítulo, el aumento de temperatura a una solución de DNA produce la desnaturalización de las moléculas y tal fenómeno se manifiesta como un aumento en el pico de absorción alrededor de 260 nm. Dicho aumento es conocido como efecto hipercrómico y es ampliamente usado para registrar en tiempo real la desnaturalización del DNA. Las gráficas siguientes muestran no sólo el efecto de la temperatura en la extinción de las longitudes cercanas a 260 nm, sino también para las del visible y del infrarrojo cercano, las cuales corresponden a luz dispersada.

En la figura 4.11 se puede observar que el aumento en la temperatura claramente produce un aumento en la extinción en casi todas las longitudes de onda que inciden sobre la solución de DNA de 48pb, sin embargo no es un

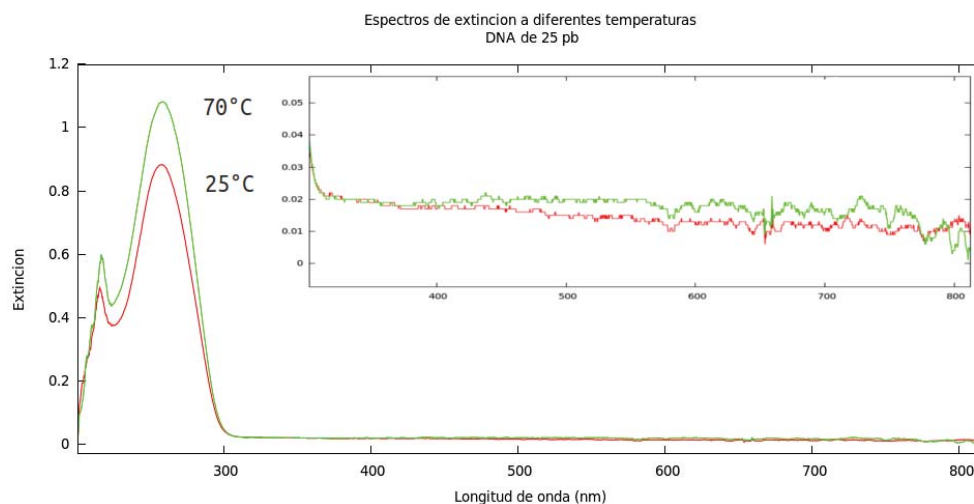


Figura 4.12: Efecto de la temperatura en la muestra de DNA de 25pb. En este caso el aumento en la extinción en la región del visible es un poco distinta respecto al efecto visto en la muestra de 48pb porque para longitudes de onda largas, sobretudo las cercanas a 800 nm, la extinción decrece.

aumento uniforme a lo largo del espectro. Por ejemplo, el máximo crecimiento se da alrededor del pico de 260 nm, el menor aumento ocurre cerca de 300 nm, y a partir de 400 nm, conforme la longitud de onda crece, la extinción crece lenta y gradualmente.

La figura 4.12 muestra el mismo efecto en el DNA de 25pb. El espectro aumenta notablemente en toda la región 220-300 nm, registrando el máximo crecimiento en el pico de absorción, ~ 260 nm. La dispersión de luz aumenta a partir de 400 nm y empieza a descender cerca de 800 nm.

Respecto al DNA de esperma de salmón (figura 4.13) el efecto es básicamente el mismo, sólo que en este caso el aumento en la extinción parece ser constante a lo largo de todo el rango del visible.

La figura 4.14 corresponde al DNA de levadura. El efecto para las longitudes de onda mayores a 300 nm es menos notable probablemente porque la diferencia de temperaturas entre ambos espectros es de sólo 30°C .

Como se explicó en el capítulo anterior, al desnaturalizarse las cadenas de DNA las bases nitrogenadas pueden absorber más fotones UV-C, lo que explica el aumento en la extinción alrededor de 260 nm. Pero el aumento en la región 300-800 nm es más bien resultado de cambios en la estructura de las moléculas dispersoras y del aumento del número de ellas; durante la desnaturalización aumenta el número de centros de dispersión al doble y también

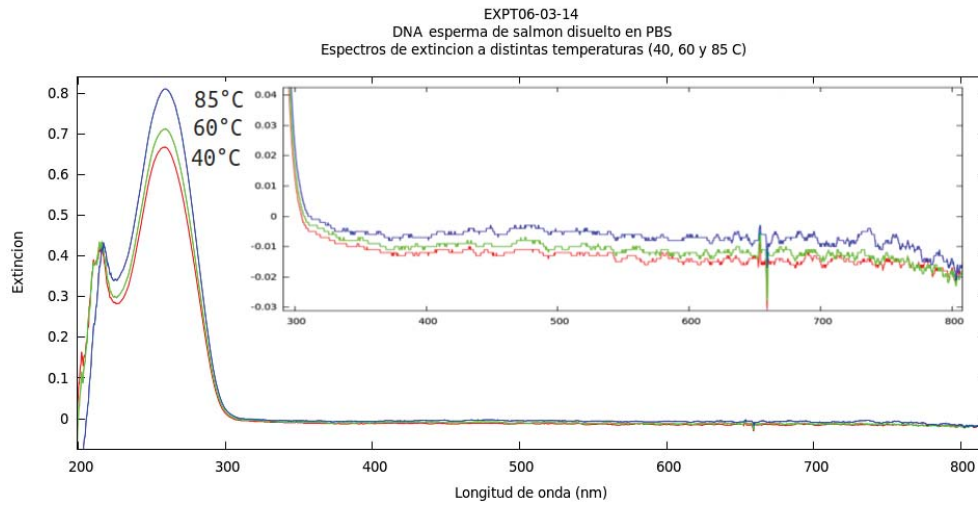


Figura 4.13: Efecto del aumento de temperatura sobre la solución de DNA de esperma de salmón.

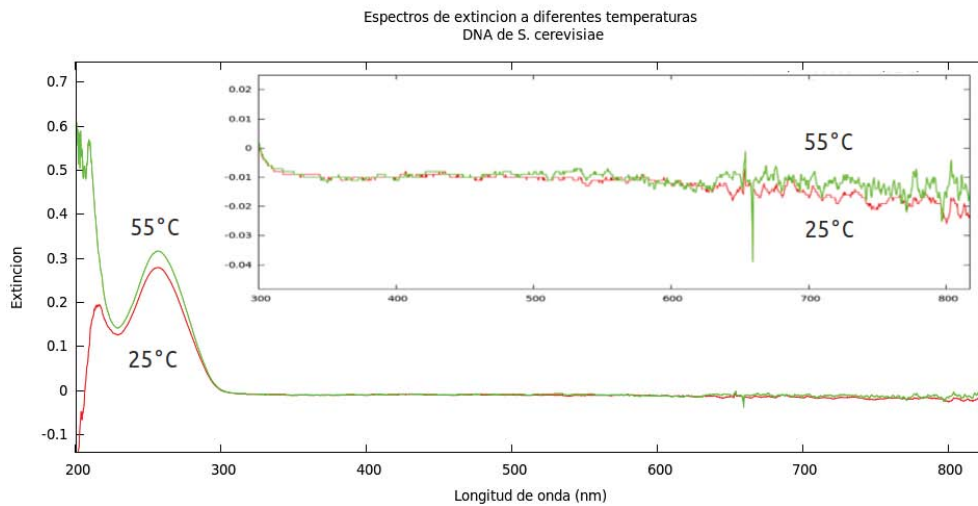


Figura 4.14: En el caso del DNA de levadura de cerveza, aunque el aumento de temperatura sólo fue de 30°C se puede notar también un efecto en la extinción en la región del visible.

van cambiando de forma porque las cadenas sencillas son más flexibles que las dobles ⁴ (para una visualización de este proceso ver la figura 4.16 en la siguiente sección). Por tanto la desnaturalización, en este experimento, no sólo podrá ser registrada por un aumento en la extinción a 260 nm sino también por el aumento, aunque en menor grado, en la región del visible.

4.5.3. Curvas de desnaturalización por aumento de temperatura.

Las *curvas de desnaturalización* brindan información importante sobre el desenrollamiento del DNA y a partir de ellas se puede calcular la *temperatura de desnaturalización*, temperatura para la cual el conjunto de las cadenas de DNA de la muestra están desenrolladas sólo en la mitad de su longitud, y tal temperatura normalmente corresponde al punto medio de la “S” típica de una curva de desnaturalización.

En esta sección se presentan las curvas de desnaturalización correspondientes a los diferentes tipos de DNA utilizados en el experimento, las cuales sirvieron para inferir una temperatura adecuada a la cual llevar a cabo las pruebas de desnaturalización con luz UV a temperatura constante. Además se presentan curvas que registran el cambio de la extinción de luz para longitudes de onda mayores a 300 nm, donde se supone no hay influencia de la absorción de las moléculas de DNA sino sólo de la dispersión de luz que ellas mismas provocan.

⁴La longitud de persistencia para las cadenas sencillas de DNA está entre 6 y 10 nm, i.e 20-30 bases [62] por lo que son más flexibles que las dobles hélices. La longitud de persistencia disminuye cuando la temperatura aumenta.

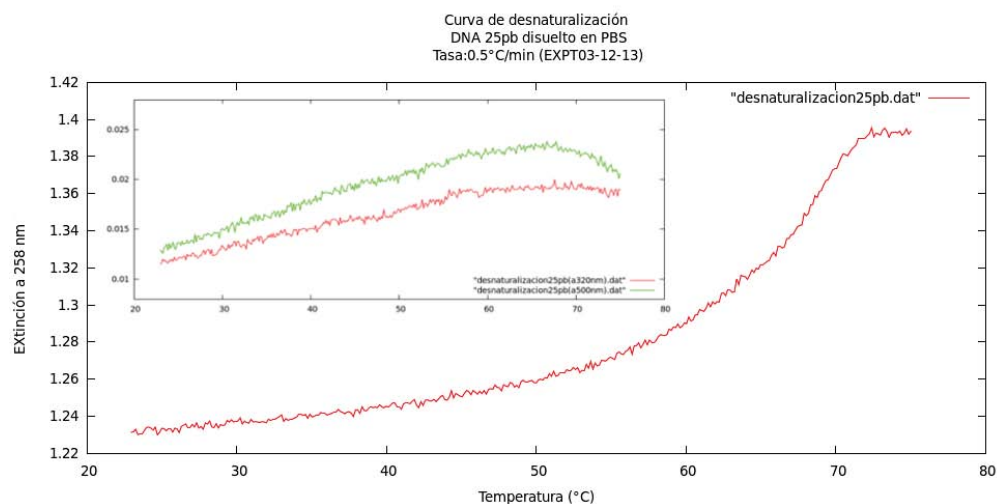


Figura 4.15: DNA 25pb. El cambio de la extinción a 258 nm respecto al aumento de temperatura muestra el proceso de desnaturalización de las cadenas. Este mismo proceso también se puede registrar siguiendo el cambio de la extinción a longitudes de onda mayores a 300 nm. En este caso la gráfica incrustada arriba a la izquierda muestra el cambio de extinción a 320 nm (inferior) y a 500 nm (superior) respecto al aumento de temperatura.

Con la muestra de DNA de 25pb se obtuvieron gráficas interesantes que reflejan cómo ocurre el proceso de desnaturalización a nivel molecular. En la figura 4.15 la curva de desnaturalización (la gráfica más grande) muestra que después de 72°C la extinción a 258 nm (i.e. la absorción) se mantiene constante, pero la extinción a 500 nm (i.e. la dispersión) comienza a bajar a partir de 68°C, aproximadamente. Esto se puede explicar, por un lado, porque se sabe que conforme la temperatura aumenta la absorción crece debido al efecto hipercrómico, y llega a un valor constante cuando las cadenas se han desnaturalizado por completo; por otro lado la dispersión también crece cuando la temperatura aumenta porque durante la desnaturalización las cadenas cambian su forma de tal manera que crecen algunas de sus dimensiones, provocando mayor dispersión. Cuando se ha completado el proceso de desnaturalización, las cadenas sencillas, que son mucho más flexibles que las cadenas dobles, van adoptando estructuras más compactas y por tanto con dimensiones características más pequeñas, dando lugar a una menor dispersión. La figura 4.16 ofrece una manera de visualizar este proceso.

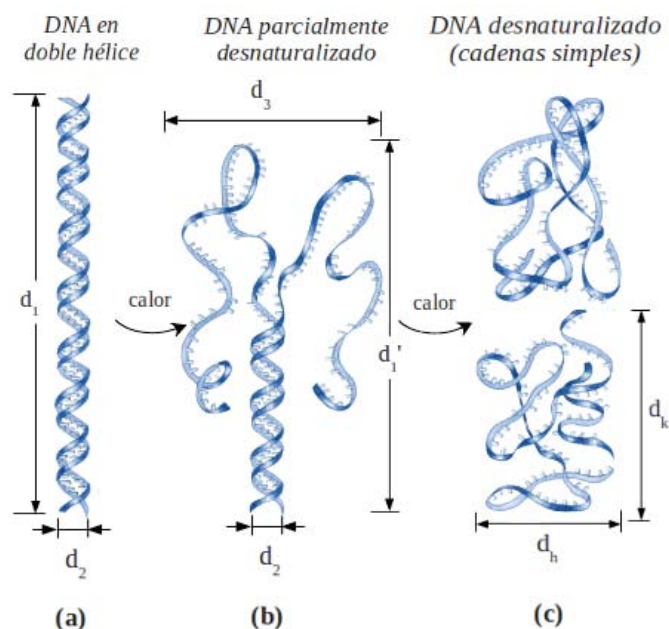


Figura 4.16: Representación de la desnaturalización del DNA por efecto de temperatura. (a) Estructura nativa del DNA previo a la desnaturalización; d_1 y d_2 son las principales dimensiones responsables de la dispersión de la luz (extinción de longitudes de onda mayores a 300 nm). (b) Al aumentar la temperatura, la absorción (extinción alrededor de 260 nm) crece debido al efecto hipercrómico; la dispersión también crece porque aparecen nuevas dimensiones asociadas a las cadenas parcialmente desnaturalizadas, como d_3 , mientras que otras cambian, como d_1 a d'_1 . Algo no mostrado en esta figura es la formación de “burbujas” en aquellas regiones ricas en pares de bases AT, lo cual da origen a más dimensiones responsables de dispersión. (c) Al completarse la desnaturalización la absorción llega a su máximo valor. Las cadenas simples adoptan estructuras más compactas por lo que las dimensiones responsables de la dispersión son más pequeñas (como d_h y d_k). Nótese que en esta última etapa el número de centros de dispersión es el doble de los que había en (a). Imagen adaptada de biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Nucleic_Acids/nucacid_structure.html

El hecho de que la dispersión a 500 nm disminuya a partir de 68°C mientras que la correspondiente a 320 nm se mantenga más constante (ver gráfica incrustada en la figura 4.15) se debe a la dependencia de la dispersión de ciertas longitudes de onda respecto a las dimensiones características de las partículas dispersoras, es decir que, aunque las cadenas simples adopten formas más compactas, las dimensiones asociadas a ellas no afectan la dispersión

a 320 nm pero sí la de 500 nm y de longitudes mayores (datos no mostrados).

El comportamiento del DNA de 48pb (figura 4.17) es muy similar al de 25pb, sólo que cuando la absorción ha llegado a su valor máximo la dispersión no decrece sino que permanece constante. Este comportamiento tiene la misma explicación que la correspondiente a la dispersión de 320 nm del DNA de 25pb, es decir que por compactas que puedan ser las estructuras que adopten las cadenas simples una vez que ha terminado la desnaturalización, la dispersión de esas longitudes de onda no se ve modificada y así exhibe un valor constante.

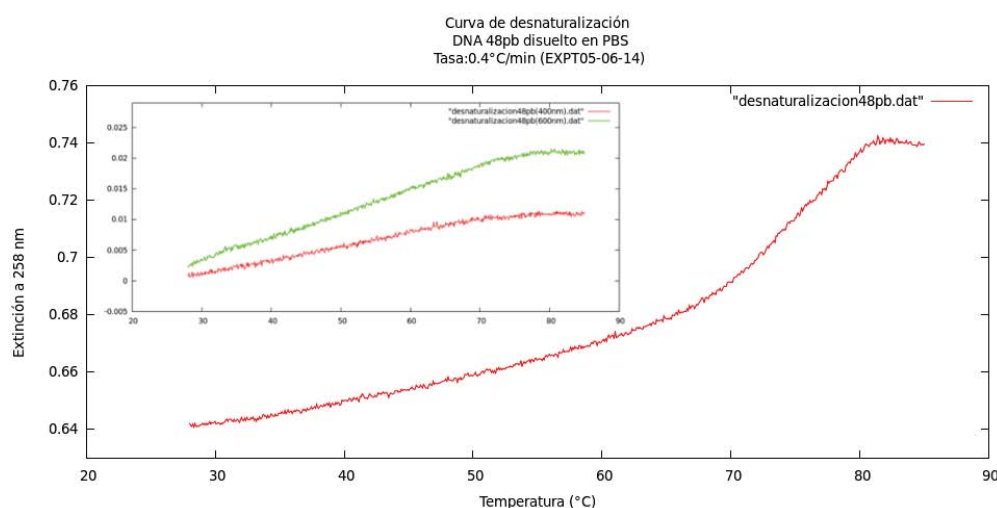


Figura 4.17: DNA de 48 pb: curva de desnaturalización (extinción a 258 nm vs. temperatura) y evolución de la extinción de luz de 400 y 600 nm (arriba a la izquierda).

Cuando se utilizan tasas rápidas de aumento o disminución de temperatura ($> 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) la extinción a longitudes de onda > 300 nm crece muy lentamente, o se mantiene constante, mientras que la extinción a 260 nm cambia notablemente; este efecto se ilustra en la figura 4.18. En ella se grafica el comportamiento de la extinción a 260 nm respecto al correspondiente a 550 nm al subir rápidamente ($5.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$) la temperatura de la solución de DNA de 48pb desde 24 hasta 85°C (curva roja, a la izquierda). Mientras la temperatura de la solución aumentaba la extinción a 260 nm creció y la de 550 nm se mantuvo prácticamente constante. A partir del momento en que la solución llegó a 85°C la extinción a 550 nm comenzó a crecer gradualmente. Esto es una posible indicación de que cuando se aumenta rápidamente

la temperatura de la solución las bases de las doble hélices se desaparean pero no se separan físicamente, por lo que siguen dispersando la luz como un solo centro de dispersión; sólo dejando reposar la solución se permite que las cadenas complementarias desnaturalizadas por el calor logren alejarse una de la otra y así comienzan a dispersar la luz como centros diferentes, como lo sugiere la parte superior de la gráfica roja (figura 4.18). En cambio, al bajar la temperatura desde 85 a 28°C a una tasa mucho más lenta (0.4° C/min) el cambio en la extinción a 550 nm es más significativo (figura 4.18, curva azul, a la derecha). Esto hace sospechar que es necesario dejar reposar la solución cierto tiempo para que las cadenas lleguen a adquirir estructuras estables que las haga estar en equilibrio con las moléculas del solvente.

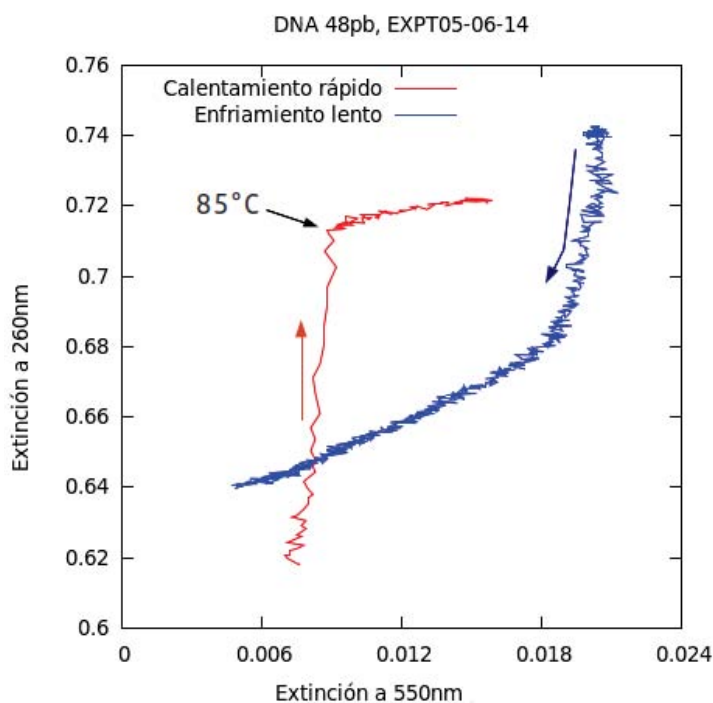


Figura 4.18: DNA 48pb. Efecto de la rapidez con que se aumenta o disminuye la temperatura de la solución de DNA en la evolución de la extinción a 260 nm y a 550 nm. La curva roja corresponde a un aumento a 5°C/min desde 24 hasta 85°C. Se indica el momento en que la solución llegó a 85°C y apartir de ese momento se mantuvo la temperatura constante. El ascenso de temperatura sigue el sentido de la flecha roja. La curva azul corresponde al descenso de la temperatura desde 85 hasta 28°C a una tasa de 0,4°C/min. El descenso se da en el sentido indicado por la flecha azul.

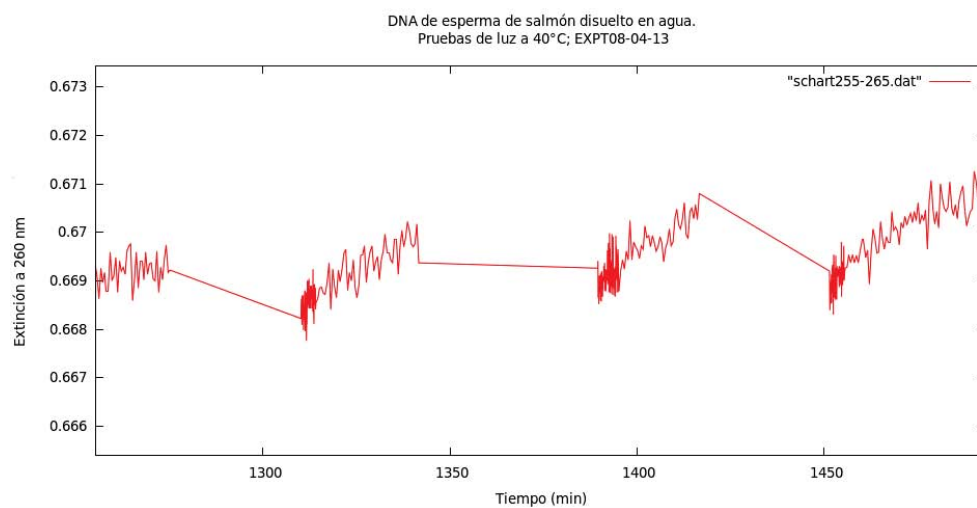
En conclusión, se puede obtener una visión a nivel molecular más completa del proceso de desnaturalización estudiando no sólo la extinción alrededor de 260 nm sino también la extinción a longitudes de onda mayores a 300 nm.

4.5.4. Desnaturalización de DNA por irradiación con luz UV-C a temperatura constante.

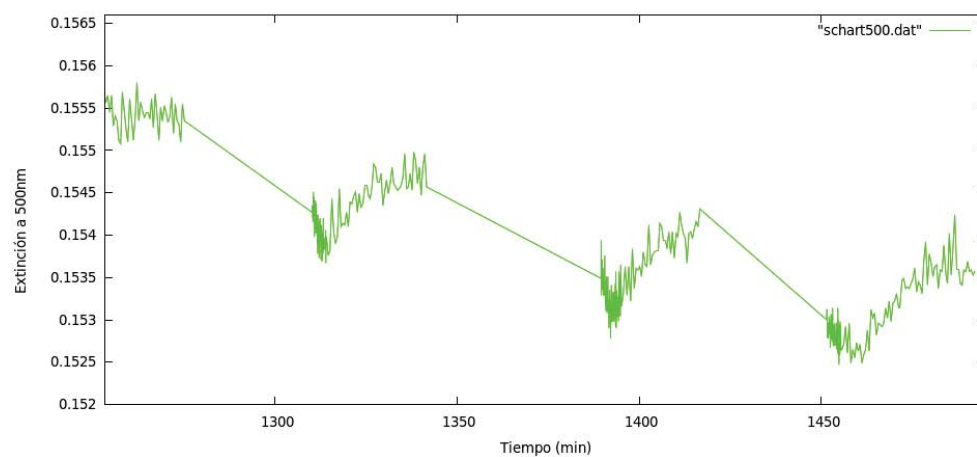
En esta sección se muestran gráficas que registran en tiempo real el efecto de desnaturalización que causa la luz UV-C cuando es absorbida por una muestra de DNA en solución; de algunas de esas gráficas se puede inferir que al suspender la irradiación el DNA se renaturaliza.

DNA de esperma de salmón.

En la figura 4.19 se muestran las gráficas de las pruebas de luz hechas con una solución de DNA de esperma de salmón mantenida a 40°C. En ellas se observa la evolución en el tiempo de la extinción a 260 nm y a 500 nm. Después de llegar al equilibrio térmico, determinado por el momento a partir del cual la extinción a 260 nm se mantenía constante, la solución fue sometida a tres períodos de luz de 30 min con períodos de obscuridad intermedios de igual duración. Durante cada irradiación las extinciones de ambas longitudes de onda crecen gradualmente y cada vez que se restablece la irradiación comienzan en un nivel más bajo que el que tenían antes de suspenderla. De acuerdo a los resultados de la sección anterior, lo observado en la gráfica (a) de la figura 4.19 es resultado de la desnaturalización (durante los períodos de luz) y de la renaturalización (en los períodos de obscuridad) del DNA. Mientras el DNA se desnaturaliza, las bases que se han desapareado tienen más probabilidades de absorber más fotones porque disminuye el efecto de apantallamiento descrito por Vekshin [55], y por tanto aumenta la extinción a 260 nm. Como se explica en la figura 4.16, la misma desnaturalización provoca cambios en las dimensiones características de las cadenas de DNA permitiendo que adopten estructuras transitorias que dispersen más luz, ello explica el aumento de la extinción a 500 nm (figura 4.19(b)) y en general la de longitudes de onda >300 nm (datos no mostrados).



(a)



(b)

Figura 4.19: DNA de esperma de salmón: (a) evolución de la extinción a 260 nm, y (b) a 500 nm, durante las pruebas de luz a 40°C. En estas gráficas y en las subsecuentes, las líneas rectas, de pendiente negativa generalmente, corresponden a los períodos de oscuridad (i.e. suspensión de la irradiación) y por tanto no representan datos medidos. $\sigma(Ext_{260})=0.2\%$, $\sigma(Ext_{500})=0.4\%$. σ : Desviación estandar relativa. Agitador magnético encendido. $[DNA]< 0,023\mu M$ en cadena doble.

Cada vez que se restablece la irradiación, la extinción a 500 nm comienza en un nivel incluso más bajo del que tenía al principio del período de luz anterior, sugiriendo que las cadenas no sólo se renaturalizan sino que también van adoptando formas cada vez más compactas conforme transcurre el tiempo

en cada período de obscuridad. Se verá que este comportamiento se presenta en todas las muestras de DNA utilizadas en este experimento.

Las gráficas en la figura 4.19 muestran claramente que el efecto de la luz UV-C es reversible.

DNA de levadura (*S. cerevisiae*)

Este DNA fue disuelto en solución PBS (ver sección 4.3.2) y con él se realizaron pruebas de luz a 40° y a 55°C. Las gráficas de la figura 4.20 muestran los resultados de dos pruebas hechas a 40°C, una con el agitador magnético encendido y en su máximo nivel, y la otra con el agitador apagado (ver sección 4.3.1). La importancia de estas gráficas es que revelan la influencia de la agitación de la solución en los procesos de la desnaturalización y renaturalización. Por un lado la actividad del agitador magnético facilita la desnaturalización durante los períodos de luz porque el movimiento del fluido promueve la separación de las bases apareadas y ese mismo movimiento es el que dificulta la renaturalización durante los períodos de obscuridad ya que reduce las posibilidades de que las regiones desnaturalizadas por la luz encuentren de nuevo a su complementario (ver las curvas superiores azules en las figuras 4.20(a) y 4.21(a)). Cuando el agitador está apagado, la renaturalización es favorecida. Dicho efecto es particularmente notable en la última prueba de luz hecha con el agitador magnético apagado (figura 4.20(a), curva superior roja, alrededor del minuto 1200). Al contrario de los primeros períodos de luz, los cuales fueron precedidos por períodos de obscuridad de 30 min aproximadamente, el último período de luz siguió a un período de obscuridad de 50 min, lo cual permitió una mayor renaturalización y confirma la relevancia que tiene el tiempo en este proceso [59]. Por otro lado, el agitador magnético también permite un flujo constante de moléculas de DNA a través del haz proveniente de la lámpara. Cuando el agitador está apagado y conforme pasa el tiempo, cada vez más moléculas de DNA salen de la zona iluminada por el haz porque tienden a precipitarse debido a la ausencia de movimiento en la solución, esto explica la tendencia decreciente de la extinción a 500 nm en las curvas inferiores grises de las figuras 4.20(b) y 4.21(b). En cambio, con el agitador prendido la dispersión permanece más constante a lo largo de toda la prueba (curvas superiores verdes en las figuras 4.20(b) y 4.21(b)).

En las pruebas de luz a 55°C, figura 4.21, la renaturalización parece no llevarse a cabo debido a dos factores: los períodos de obscuridad no fueron lo suficientemente prolongados (su duración fue menor a 30 min) y la temperatura es más alta, en consecuencia la tasa de renaturalización es más lenta [59]. Estas gráficas también muestran el efecto del agitador magnético. Al

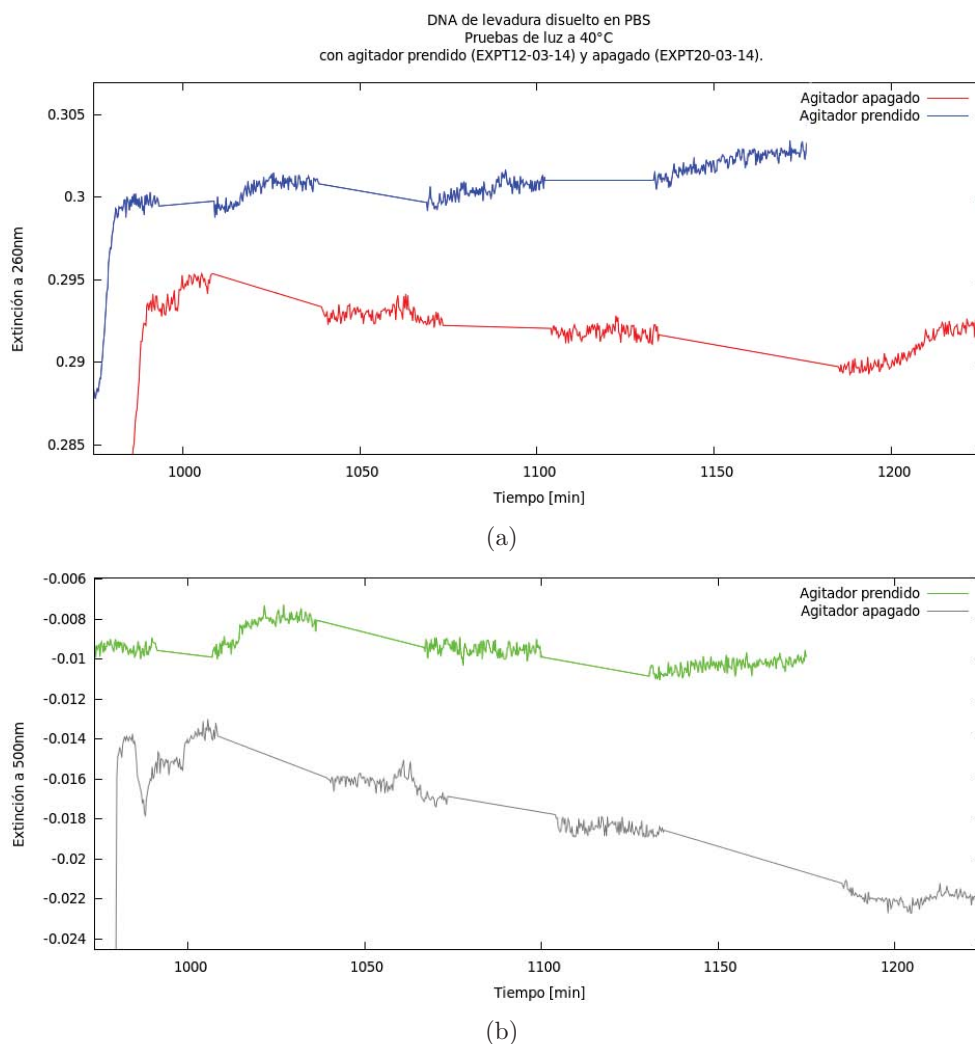
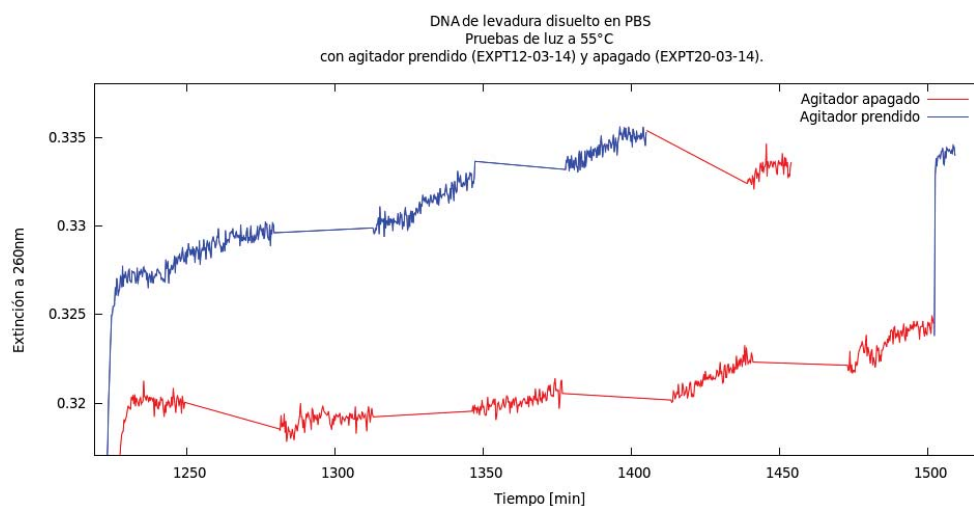
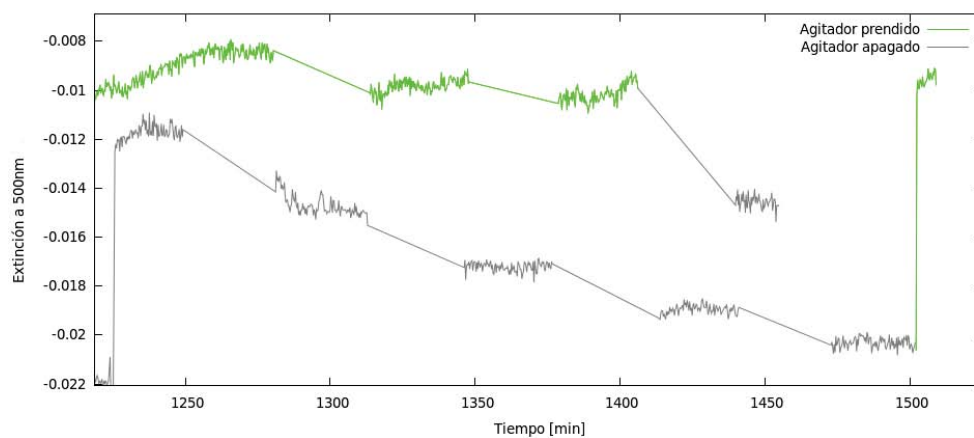


Figura 4.20: DNA de levadura: (a) evolución de la extinción a 260 nm, y (b) a 500 nm, durante las pruebas de luz a 40°C. Tanto en estas gráficas como en las de la figura 4.19 (curvas azul y verde) correspondientes a las pruebas con agitador prendido, han sido desplazadas tanto en tiempo como en extinción con el objetivo de presentarlas en un mismo gráfico junto con las curvas de agitador apagado para facilitar su comparación; lo importante para este experimento no son los valores reales de la extinción sino sus cambios. En (b) la extinción toma valores negativos porque la solución de referencia tenía menos concentración de iones que las soluciones con DNA; esto tampoco influye en las conclusiones que se derivan del análisis de estas gráficas. El error asignado a las lecturas de extinción negativa es el correspondiente a su valor absoluto. $\sigma(Ext_{260})=0.24\%$, $\sigma(Ext_{500})=5.4\%$ curva verde, $\sim 3.2\%$ curva gris. $[DNA] < 0,015\mu M$ en cadena doble.

final de cada prueba se cambió la condición del agitador; cuando el agitador se apaga y se deja reposar a la solución sin irradiación la extinción a 260 y a 500 nm disminuyen (figura 4.21, parte final de las curvas superiores azul y verde en (a) y (b)). Con el agitador apagado se facilita la renaturalización y además se disminuye el número de moléculas que fluyen a través del haz. El efecto contrario se observa cuando de un momento a otro se enciende el agitador (figura 4.21, parte final de las curvas inferiores roja y gris en (a) y (b)) el cual favorece la desnaturalización y provoca un aumento en el flujo de moléculas de DNA a través del haz.



(a)



(b)

Figura 4.21: DNA de levadura: (a) evolución de la extinción a 260 nm, y (b) a 500 nm, a lo largo de las pruebas de luz a 55°C. La parte final de cada curva se grafica con color distinto para indicar que la condición del agitador magnético fue cambiada intencionalmente para investigar su efecto. $\sigma(Ext_{260})=0.22\%$, $\sigma(Ext_{500})=5.4\%$ curva superior, $\sim 3.4\%$ curva inferior. $[DNA]< 0,015\mu M$ en cadena doble.

DNA sintético de 48 pb.

Con este tipo de DNA, también disuelto en solución PBS, se realizaron pruebas a 65°C y a 85°C. Ambas pruebas dan indicio de desnaturalización

pero no de renaturalización debido a que también en este caso las temperaturas de la pruebas fueron altas y por tanto la tasa de renaturalización lenta, además de que los períodos de oscuridad fueron cortos (30 min).

En la figura 4.22 se muestran las pruebas a 65°C. Los primeros tres períodos de luz duraron sólo 1 min y entre ellos hubo períodos de oscuridad de 15 min. Estas primeras pruebas se hicieron con el fin de comprobar que la extinción a 260 nm no cambiara para así asegurar que cualquier variación en la lectura de la extinción durante los períodos de luz siguientes fuera causada sólo por la luz incidente. Los siguientes dos períodos de luz duraron 30 min con períodos de oscuridad intermedios de igual duración. Por un lado, la figura 4.22(a) muestra que durante estas pruebas la extinción a 260 nm aumenta, es decir que el DNA se desnaturaliza, y aparentemente no hay renaturalización. Por otro lado, en los análisis anteriores se había observado que la tendencia de la extinción a 500 nm durante los períodos de oscuridad es decreciente. De acuerdo a la figura 4.22(b) esa tendencia es interrumpida durante los períodos de luz, donde la extinción a 550 nm crece ligeramente o permanece constante. Este comportamiento puede entenderse tomando en cuenta que los múltiples choques entre las moléculas de agua con las de DNA provocan que estas últimas vayan adoptando formas cada vez más compactas y durante los períodos de luz ese proceso se ve interrumpido por la desnaturalización del DNA y por ello en estos períodos la extinción a 550 nm crece, como se puede apreciar en las dos pruebas realizadas entre los minutos 950-1050, o se mantiene constante, como en la última prueba.

Aunque la curva de desnaturalización del DNA de 48pb (figura 4.17) indica que a 80°C la desnaturalización se ha completado, las pruebas de luz a 85°C (figura 4.23) muestran que la extinción a 260 nm crece durante los períodos de luz. En este caso ese crecimiento puede deberse a un *hipercromismo residual*. Algunos estudios han mostrado que los enlaces de hidrógeno, e incluso la estructura en hélice, no son necesarios para observar el efecto hipercrómico ya que dicho efecto puede ser detectado en RNA y en cadenas sencillas de DNA [63]. Se puede entender este fenómeno tomando en cuenta que aun cuando el DNA ya está desnaturalizado sigue habiendo un efecto de apantallamiento entre las bases nitrogenadas de las cadenas sencillas por que en ciertas regiones persiste un apilamiento de bases por la interacción entre sus orbitales moleculares. Sin embargo, en las cadenas sencillas las bases tienen más libertad de rotar respecto al esqueleto de la cadena conformado por los grupos fosfato y las desoxirribosas; al rotar se deshace el apilamiento y aumenta entonces la probabilidad de que cada base nitrogenada absorba un fotón. Por tanto, conforme pasa el tiempo y la temperatura local aumenta debido al calor producido por la actividad disipativa del DNA, el efecto de apantallamiento disminuye dando lugar a una mayor absorción de luz,

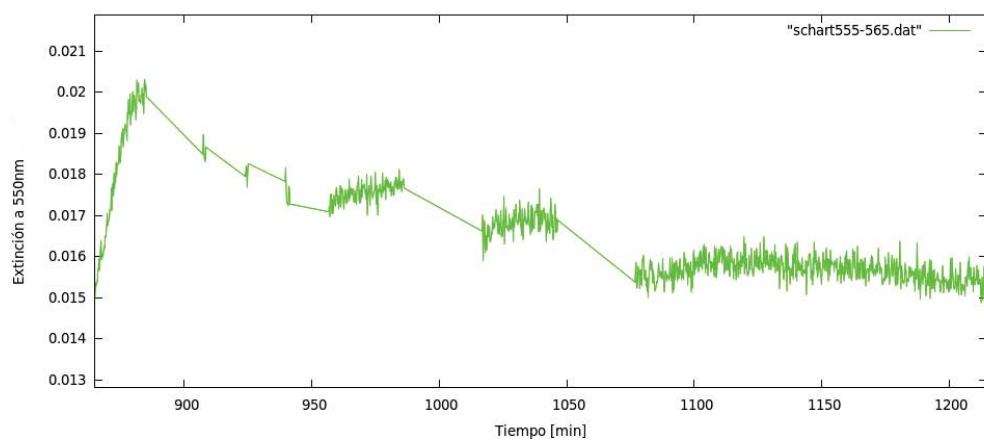
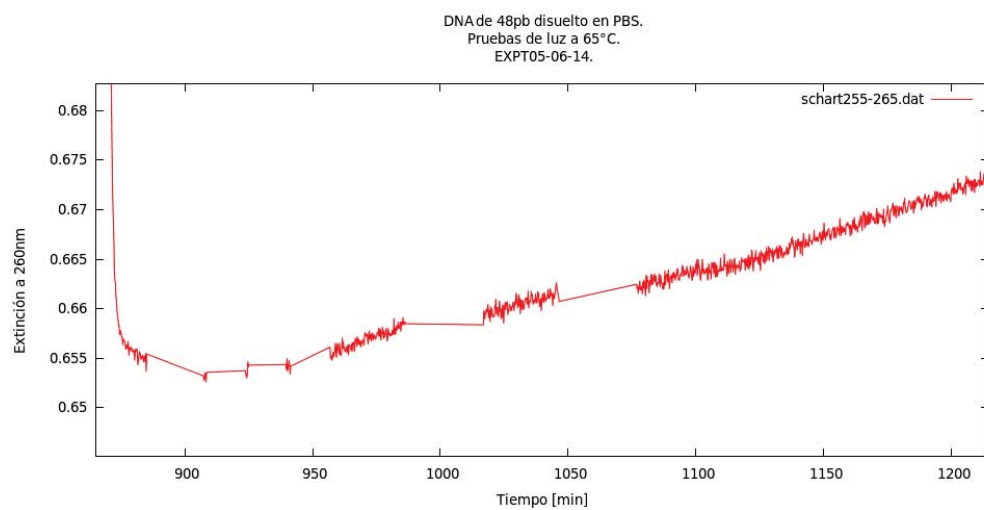


Figura 4.22: DNA de 48pb: (a) evolución de la extinción a 260 nm, y (b) a 550 nm, durante las pruebas de luz a 65°C. $\sigma(Ext_{260})=0.19\%$, $\sigma(Ext_{500})=3.5\%$. $[DNA]=0.7\mu M$ en cadena doble.

lo cual se ve reflejado en el crecimiento de la extinción a 260 nm. Como en este caso las cadenas no sufren cambios en las dimensiones responsables de la dispersión, esta no se ve afectada y por ello la extinción a 550 nm permanece constante a lo largo de las pruebas (figura 4.23(b)).

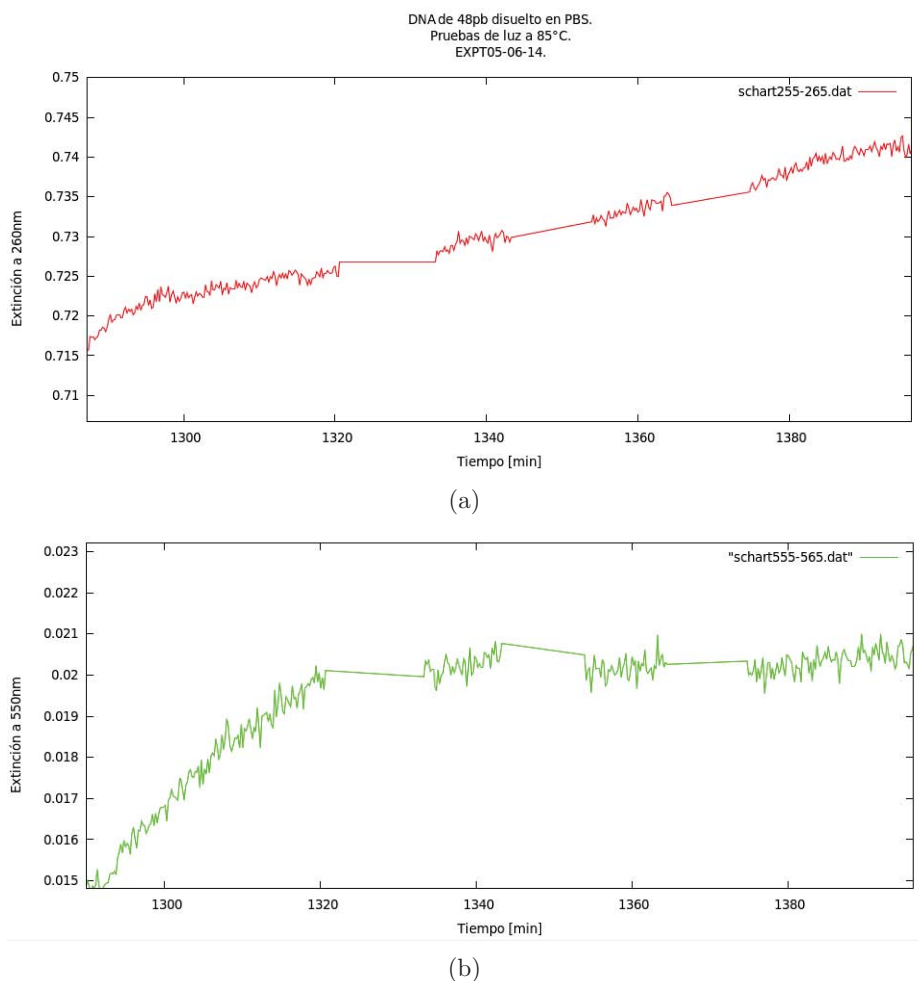


Figura 4.23: DNA de 48pb: evolución de la extinción a 260 nm (a), y a 550 nm (b), durante las pruebas de luz a 85°C. $\sigma(Ext_{260})=0.19\%$, $\sigma(Ext_{500})=2.7\%$. $[DNA]=0.7\mu M$ en cadena doble.

La desnaturalización y renaturalización debido a la luz UV también se observaron con el DNA de 25pb. Los resultados se muestran en la siguiente sección.

4.5.5. Descensos repentinos en la extinción.

Aquí se describen los resultados de un fenómeno que produjo descensos o caídas súbitas en la extinción a 260 nm, principalmente. Este efecto que parece ser reproducible y reversible sólo se detectó durante las pruebas de luz con las muestras de DNA sintético de 25 y 48 pb.

DNA sintético de 25 pb.

Con este tipo de DNA, disuelto también en solución PBS, se hicieron pruebas de luz a 70°C; los resultados se muestran en las gráficas de la figura 4.24. El análisis de esas gráficas se ha dividido en dos partes. Por un lado, en la región que queda a la izquierda de la línea punteada (gráfica (a)) se puede observar el efecto de desnaturalización de la luz UV y también de renaturalización durante los períodos de oscuridad. Es sobresaliente el efecto del tiempo en la renaturalización: mientras el primer período de luz apagada con duración de 20 min (realizado alrededor del minuto 1050) llevó a una disminución de la extinción a 260 nm de 0.005 ± 0.005 , en el segundo período de oscuridad cuya duración fue de 1hr 40 min (realizado desde poco antes del minuto 1100 hasta casi el minuto 1200) la extinción perdió 0.027 ± 0.005 unidades. La disminución de 0.005 unidades durante los 20 min del primer período de oscuridad dan una tasa de disminución en la extinción de 2.5×10^{-4} unidades/min. Multiplicando esta tasa por los 100 min que duró el segundo período de oscuridad, resulta una disminución de 0.025 unidades, valor próximo al medido de 0.027 ± 0.005 unidades y que de hecho queda dentro del rango de su incertidumbre. Esto sugiere entonces que durante los dos primeros períodos de oscuridad las cadenas se renaturalizaban a la misma tasa. Tanto en la gráfica (a) como en la (b) de la figura 4.24 se observa que en la segunda prueba de luz (entre los minutos 1050-1100) las extinciones a 260 y 550 nm crecen luego de restablecerse la irradiación, y minutos después empiezan a decrecer. Sin embargo durante la prueba hubo un aumento neto en esas extinciones, lo cual es indicio de desnaturalización.

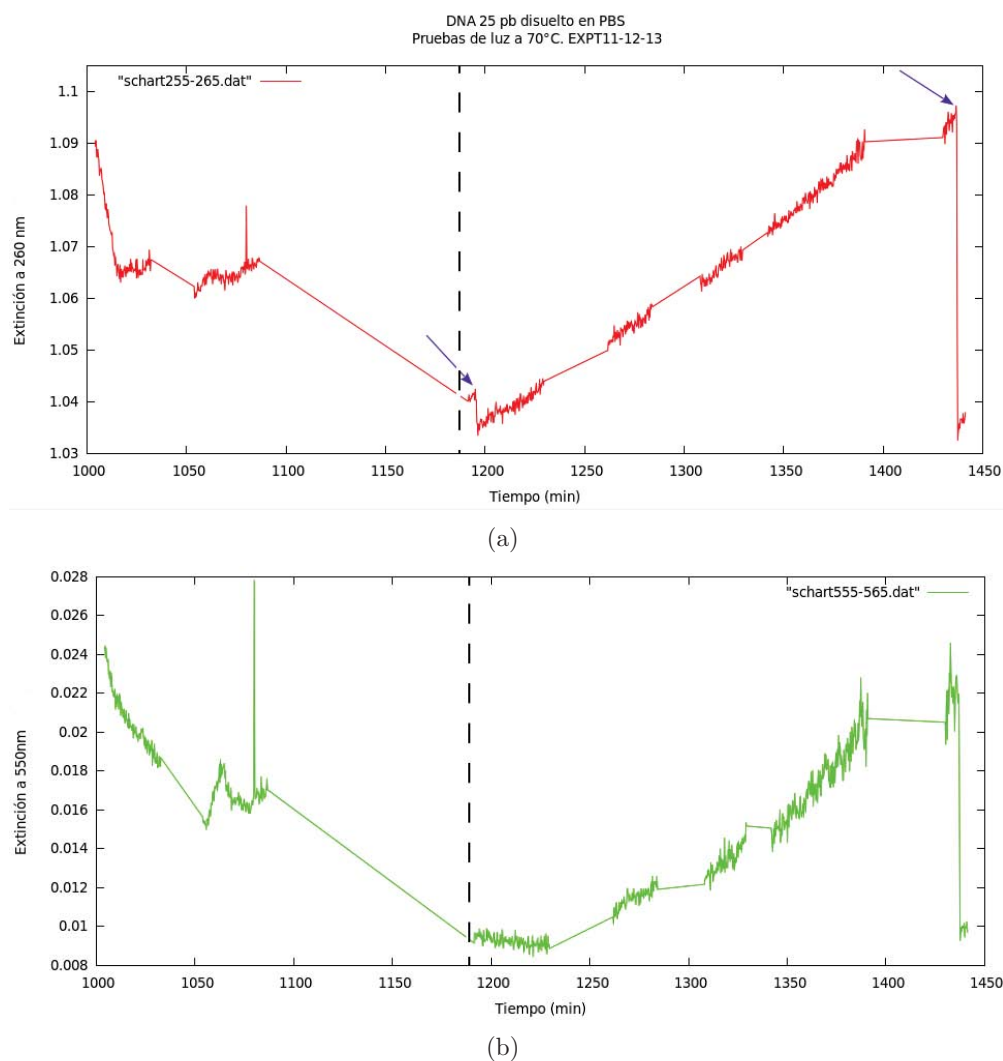


Figura 4.24: Las primeras dos pruebas de luz (entre los minutos 1000-1200) revelan el efecto de desnaturalización/renaturalización. El pico que sobresale en el segundo período de luz (entre los minutos 1050-1100) se registra a todas las longitudes de onda y con la misma magnitud, lo que hace sospechar que fue producto de una variación electrónica. Justo antes del minuto 1200 y después del 1400 ocurren dos descensos bruscos en la extinción a 260 nm, señalados con flechas. Sólo la última caída se manifiesta en la extinción a 550 nm. $\sigma(Ext_{260})=0.26\%$, $\sigma(Ext_{550})=3.02\%$. $[DNA]=2.2\mu M$ en cadena doble.

Por otro lado, en la región que queda a la derecha de la línea punteada se observa un efecto que no apareció en las soluciones de levadura ni de

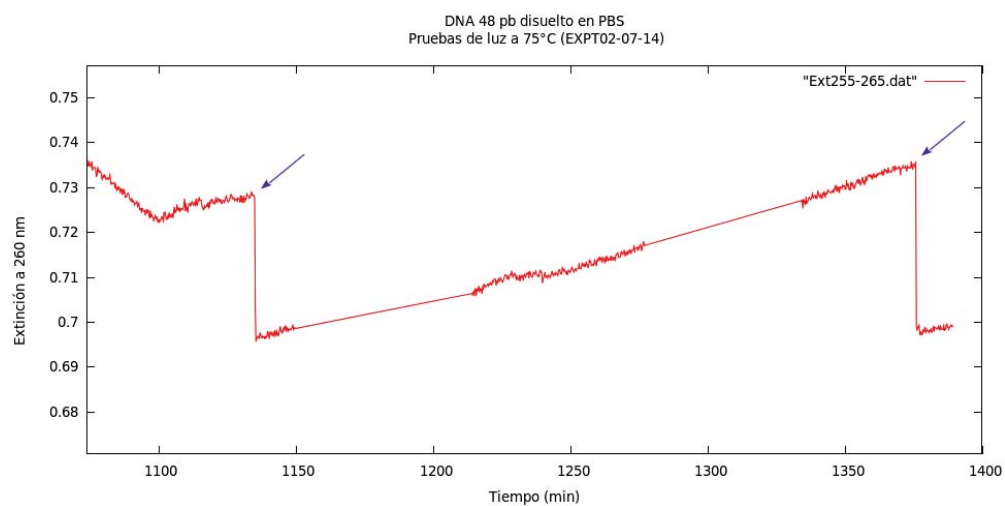
esperma de salmón. En la gráfica (a) se indica con una flecha una súbita disminución (o caída) en la extinción a 260 nm ocurrida 4 min después de haber restablecido la irradiación luego del segundo período de obscuridad, y a partir de ese momento la extinción crece, aparentemente, con una única pendiente. Nótese que los períodos de obscuridad parecen no tener ningún efecto sobre este comportamiento. En la última prueba de luz se observa otra repentina caída en la extinción y de mayor magnitud que la primera. La segunda caída ocurrió aproximadamente 7 min después de restablecer la irradiación y duró 34 segundos, a comparación de los 18 segundos que duró la primera caída. A 550 nm, gráfica (b), la primera caída no aparece pero la segunda sí. El valor de la segunda caída en la gráfica (b) representa $\sim 20\%$ del de la gráfica (a).

DNA sintético de 48 pb.

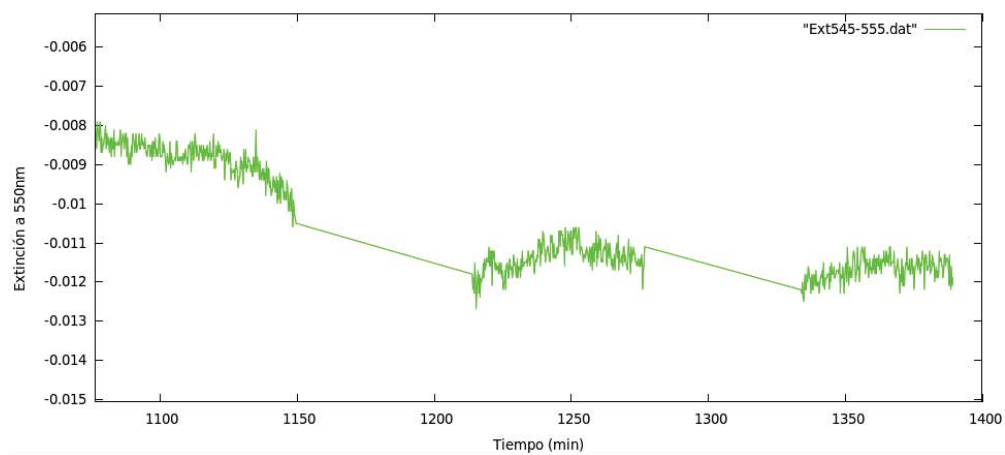
Los descensos en la extinción se observaron también con el DNA sintético de 48pb, disuelto en solución PBS, al realizar pruebas de luz a 75°C (figura 4.25). Luego de que la solución llegó a 75°C (minuto 1100), la extinción a 260 nm comenzó a crecer gradualmente; media hora después ocurrió la primer caída. Esta caída duró 32 segundos aproximadamente. Después la extinción creció siguiendo una sola pendiente y, aunque hubo dos períodos de obscuridad intermedios, toma los valores que aparentemente hubiese tomado si no se hubiera suspendido la irradiación; esta segunda caída duró 14 segundos. Una diferencia notable entre este par de caídas y aquellas observadas con el DNA de 25pb es que las del DNA de 48pb sólo se observan en la extinción a 260 nm, gráfica (a) de la figura 4.25, y no a 550 nm, gráfica (b), ni a ninguna otra longitud de onda mayor a 300 nm (datos no mostrados).

Los descensos bruscos en la extinción ocurren después de horas de irradiación y la causa aun no es completamente entendida. En un principio se supuso que podían ser consecuencia de una transición de la forma B del DNA a la forma Z (transición B-Z). La forma Z es también una doble hélice pero se enrolla hacia la izquierda, a diferencia de la forma B que lo hace hacia la derecha. En conjunto la forma Z es una doble hélice más estrecha y alargada que la forma B. El Z-DNA es una forma transitoria *in vivo* producida por la RNA polimerasa durante la transcripción de genes, en los puntos de inicio de la transcripción.

Se sabe que aquellas regiones del DNA en cuya secuencia se alternan purina-pirimidina (*p.e.* dG-dC o dA-dT) son susceptibles de experimentar una transición B-Z. Se ha demostrado que esta transición se lleva a cabo en oligos *poli(dG - dC)·poli(dG - dC)* en solución acuosa cuando la concentración de sal a 25°C y a pH neutro aumenta a 2.5M NaCl, 1.8M NaClO₄ o



(a)



(b)

Figura 4.25: DNA 48pb: (a) descensos bruscos en la extinción a 260 nm durante pruebas de luz hechas a 75°C. (b) Tales descensos no fueron detectados a 550 nm. $\sigma(Ext_{260})=0.19\%$, $\sigma(Ext_{550})=5.41\%$. $[DNA]=0.7\mu M$ en cadena doble.

0.7M MgCl₂ [64]. Esta transición es reversible y acompañada por cambios en la absorción ultravioleta [64, 65].

Kuhnlein et al. [66] mostraron que el DNA del bacteriófago PM2, un DNA circular, superenrollado y de cadena doble, experimenta una transición B-Z cuando la concentración de sal aumenta a 2.5-3.5M NaCl. Pero cuando lo irradiaron con luz UV la transición ocurrió a concentraciones de sal más bajas. Por ejemplo, al exponer al DNA de PM2 a 120 J/m² de irradiación UV, la transición ocurrió a una concentración entre 2 y 3.1M NaCl, y al exponerlo a 600 J/m² ocurrió a una concentración de entre 1 y 2.3M NaCl. Los mismos autores también encontraron que un aumento en la temperatura lleva a una transición B-Z a concentraciones de sal menores. Aparentemente el estudio de Kuhnlein et al. es el único en el que se ha reportado la transición B-Z bajo radiación UV y en él no se da a conocer ningún aspecto referente a la cinética de la transición.

Las muestras de DNA sintéticas de 25 y 48pb contienen regiones en las que se alternan purinas y pirimidinas (ver sección 4.3.2) y por tanto es posible que experimenten una transición B-Z. Una transición de este tipo podría explicar las caídas en la extinción a 260 nm ya que la forma Z absorbe menos que la forma B [64, 65, 39]. Sin embargo no es claro porqué esta transición causaría cambios en la extinción a longitudes mayores a 300 nm sólo en el DNA de 25pb y no en el de 48pb, ni porqué este fenómeno súbito ocurriría de manera colectiva afectando no sólo a las cadenas que están siendo irradiadas sino también a las que quedan fuera del haz de luz, como aparentemente pasa.

4.6. Conclusiones

Aquí se ha reportado un método de desnaturalización y renaturalización de DNA basado en períodos de irradiación con luz UV interrumpidos por períodos de obscuridad mientras la temperatura de la solución de DNA permanece constante. Los resultados presentados corresponden a pruebas realizadas con muestras tanto de origen biológico de longitudes del orden de kilo-pb (miles de pares de bases) como de origen sintético de longitudes mucho más pequeñas (25 y 48 pb) y confirman que después de que el DNA es desnaturalizado, al menos parcialmente, por efecto de la radiación UV el proceso de renaturalización ocurre de manera eficiente a temperaturas entre 40° y 55°C (como en el caso del DNA de levadura y de esperma de salmón) permitiendo que las moléculas recuperen la estructura nativa que poseían antes de someterlas a la radiación. Pero también muestran que aún a temperaturas mayores a la de desnaturalización, el DNA puede renaturalizarse si se deja reposar sin radiación el tiempo suficiente para que las cadenas complementa-

rias se rencuentran (como en el caso del DNA sintético de 25 pb a 70°, figura 4.24).

Para comprobar que los aumentos en la extinción fueron cuasados verdaderamente por el efecto la luz UV-C sobre el DNA y no por un efecto electrónico, se prepararon dos soluciones idénticas con DNA de 48 pb y se sometieron a las mismas pruebas pero irradiando sólo una de ellas con la luz de la lámpara de deuterio, la cual emite un continuo en el rango UV-C, e irradiando la otra con luz de tungsteno-halógeno, que sólo emite en el visible (ver figura 4.5). Estas pruebas se presentan en el apéndice A y muestran que con la luz de tungsteno no hay cambios atribuibles a los períodos de irradiación o de obscuridad, por lo que se concluye que los aumentos en la extinción cuando se irradia con luz UV-C son producto de la acción de ésta sobre las cadenas de DNA.

Sin duda, los resultados que se han mostrado dan esperanzas al mecanismo UVTAR [2] que pretende dar una explicación de la replicación de los ácidos nucleicos en el Arqueano. Tal mecanismo aborda la replicación de DNA y RNA sin la intervención de enzimas y está basado solamente en ciclos de irradiación UV y en variaciones de temperatura. La radiación UV, con longitudes de onda entre 240 y 270 nm, y las altas temperaturas (de hasta 80°C en la superficie de los mares, según los estudios de Knauth y Lowe del 2003 [5]) fueron dos condiciones físicas dominantes en nuestro planeta en el tiempo que se cree surgió la vida, hace 3.8 mil millones de años aproximadamente [3, 5].

Finalmente, los descensos repentinos en la extinción a 260 nm registrados durante las pruebas de luz con las muestras sintéticas de DNA de corta longitud, pueden ser resultado de una transición B-Z viable bajo la acción conjunta de la luz UV y altas temperaturas.

Tasas de desnaturalización

Se puede tener una estimación cuantitativa del grado de desnaturalización provocada por la luz UV considerando el incremento en la extinción debido a la desnaturalización completa de las cadenas por al aumento en la temperatura (obtenido de las curvas de desnaturalización). Por ejemplo, la curva de desnaturalización del DNA de esperma de salmón (no mostrada) sugiere una relación lineal entre la desnaturalización y el incremento de temperatura, aunque con constantes de proporción distintas para las temperaturas que

quedan por encima y por debajo de 65°C. Las pruebas de luz a 40°C registran un aumento de 0.002 unidades en la extinción a 260 nm (figura 4.19) que, asumiendo la relación lineal, corresponden a una desnaturalización de 1.25 %. Dado que los períodos de irradiación de estas pruebas duraron 30 minutos, se puede decir entonces que la tasa de desnaturalización a esta temperatura fue de 2.5 %/hr. Para el DNA de levadura se ha estimado una tasa similar.

El mismo cálculo para el DNA de 48 pb (figura 4.22) muestra que a 65°C la tasa de desnaturalización fue de aproximadamente 4.6 %/hr. Para el DNA de 25 pb a 70°C, figura 4.24, la desnaturalización inducida por la luz UV-C fue de 20.1 %/hr, aproximadamente.

Ya que, como se discutirá en la siguiente sección, el flujo de luz UV-C en el Arqueano era mucho mayor al usado en este experimento, las tasas de desnaturalización estimadas aquí pueden ser consideradas como un límite inferior de las tasas de desnaturalización en la sopa primitiva.

4.7. Discusión

De entre los problemas que faltan por resolver para construir una narrativa científica que explique el surgimiento de la vida en la Tierra es la replicación de los ácidos nucleicos en ausencia de enzimas en las etapas más tempranas de la vida.

Los mecanismos de replicación considerados hasta ahora involucran, por un lado, la presencia de moléculas de RNA con capacidad autocatalítica (ribozimas) y por otro lado la de ciclos repetitivos dirigidos solamente por procesos físicos y químicos. A pesar de los esfuerzos y de los buenos avances hasta ahora logrados, no ha habido sólida evidencia que haga pensar que uno de ellos haya sido el mecanismo de replicación dominante en el origen de la vida. Recientemente se han revisado los problemas que en particular enfrenta la posible replicación dirigida por procesos químicos y físicos, y se ha concluido que esta puede ser muy viable en las protocélulas que constituían a los primeros organismos [47].

Si bien se cree que el DNA apareció después que el RNA en el curso de la evolución biológica, la evidencia experimental hace sospechar que ambas moléculas coexistieron en la sopa primitiva antes de la formación de los primeros sistemas celulares, y la teoría de disipación termodinámica para el origen de la vida reconoce que la capacidad disipativa que tienen estas moléculas de convertir los fotones solares UV en fotones infrarrojo pudo haber sido esen-

cial para su replicación mediante el mecanismo UVTAR. Según esta teoría, el DNA y RNA pudieron eventualmente formar una simbiosis abriendo nuevas posibilidades a la reproducción, a la evolución y, por tanto, al proceso de disipación fotónica [2].

Aunque los resultados presentados aquí han sido obtenidos con soluciones de DNA, el mecanismo UVTAR, del cual deriva directamente esta investigación, ha sido originalmente formulado para explicar la proliferación tanto de DNA como de RNA en la sopa primitiva [2]. Dadas las similitudes químicas, ópticas y disipativas entre estas dos moléculas, es plausible esperar resultados parecidos para el RNA.

¿Qué tan viable es que el mecanismo de desnaturalización y renaturalización activado por la luz UV y sostenido por altas temperaturas haya podido llevarse a cabo en la Tierra primitiva?

Podemos comparar algunas de las posibles condiciones físicas de la Tierra primitiva hace 3.8 mil millones de años aproximadamente con aquellas con las que se obtuvieron los resultados de este experimento.

Para comenzar, Sagan [3] calculó para el Arqueano un flujo de luz UV-C, integrado sobre el rango 240-270 nm, de 3.3 W/m^2 , aunque se sospecha que este flujo haya sido más próximo a 4.3 W/m^2 [67]. La lámpara utilizada para las pruebas de luz de este experimento emitía un flujo de luz UV-C de 2.9 W/m^2 en el mismo rango de longitudes de onda. Sin embargo, como el volumen que el haz de luz barre al incidir sobre la solución es de 0.107 cm^3 mientras que el volumen total de la solución de 1.0 cm^3 , el flujo promedio de luz UV-C a través de la solución era de sólo 0.31 W/m^2 , menos de una décima parte de lo que posiblemente llegaba a la superficie de la tierra. Por tanto, el flujo de luz UV-C en el Arqueano pudo haber favorecido aún más la desnaturalización del DNA y el RNA.

La temperatura superficial en la Tierra, y por ende la de la superficie de los mares, pudo ser cercana a 80°C hace 3.8 mil millones de años [5] y descender hasta 70°C cerca de 3.2 mil millones de años atrás [6]. Por supuesto, las regiones polares pudieron estar más frías y las ecuatoriales más calientes. Los resultados muestran que la desnaturalización y renaturalización son factibles a temperaturas entre 70 y 80°C , y también a temperaturas más bajas, como a 40 y 55°C , tanto para cadenas largas como para cadenas cortas de DNA.

Respecto a la concentración de ácidos nucleicos, Miller [68] calculó una concentración de adeninas de $15 \mu\text{M}$ para la sopa prebiótica a partir de las tasas de producción de moléculas orgánicas calculadas por él mismo y Stri-

bling [69]. Sin embargo, se pueden esperar concentraciones más altas ahora que se conocen nuevas rutas de síntesis de nucleótidos que se llevan a cabo bajo condiciones de no equilibrio termodinámico y en las que la disipación de fotones UV-C juega un papel importante, como la reportada por Powner y su grupo [32]. Las concentraciones (expresadas en contenido de adeninas) de las muestras usadas para las pruebas de luz están en el rango 15-100 μ M.

Se cree que para el final del Hadeano, hace 3.8 mil millones de años, el pH de los océanos era de ~ 6.8 [10] y que la salinidad era entre 1.5 y 2 veces mayor al valor actual [9]. Las soluciones de DNA utilizadas para el experimento tenían un pH de 7.3 y salinidad de 0.3 veces la de los mares actuales. Si bien una salinidad mayor hace que se requieran temperaturas más altas para desnaturalizar el DNA, el intenso flujo de luz UV-C en el Arqueano pudo haber provisto la energía suficiente para la desnaturalización de las cadenas de DNA en la sopa primitiva.

En conclusión, las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo las pruebas de luz sugieren que el primer paso del mecanismo UVTAR pudo haber sido factible en la Tierra primitiva.

Para finalizar, es importante hacer énfasis en que el motor del proceso de desnaturalización/renaturalización bajo ciclos de irradiación UV-C es la conversión de los fotones UV-C de alta energía en fotones infrarrojo de menor energía. Esto da esperanzas a que la disipación del potencial fotónico solar sea considerado como un elemento fundamental para entender el origen y la evolución de la vida.

Apéndice A

Corrida control con DNA de 48 pb.

Una manera de comprobar que el aumento en la extinción a 260 nm se debe a la acción de la luz UV-C sobre las cadenas de DNA es llevar a cabo una corrida en la que se someta una solución de DNA a la radiación de una lámpara de deuterio, que emite en el UV-C y en el visible, y luego otra corrida idéntica sometiendo esa misma solución a radiación de una lámpara de tungsteno-halógeno, la cual emite predominantemente en el visible. En la sección 4.5.3 se mostró que cuando la extinción a 260 nm aumenta, la extinción a longitudes de onda mayores a 300 nm también aumenta. Si el efecto en la extinción a 260 nm se debe en realidad a la luz UV-C entonces debería detectarse alguna diferencia, para longitudes de onda del visible, entre las pruebas de luz hechas con la lámpara de deuterio y aquellas realizadas con la de tungsteno. Bajo esta lógica se llevaron a cabo dos corridas iguales con DNA de 48 pb disuelto en agua sometiénolo a la radiación de cada lámpara. Los espectros de emisión de ambas lámparas se muestran en la figura A.1.

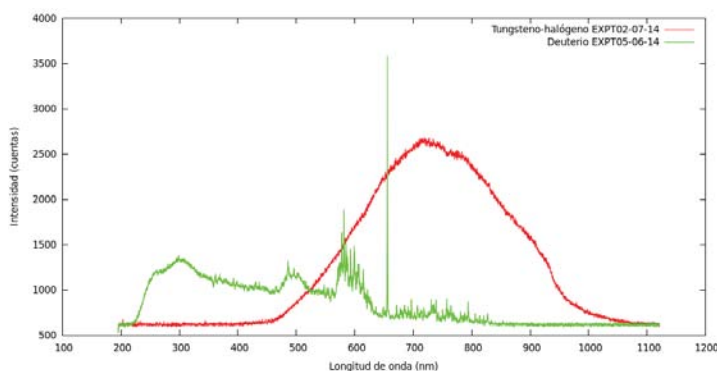


Figura A.1: Espectro de emisión de las lámparas de deuterio y tungsteno-halógeno DT-MINI-2GS (Ocean Optics) a temperatura ambiente.

En ambas corridas la solución fue sometida a períodos de luz y oscuridad de 30 minutos cada uno, manteniendo su temperatura a 40°C . Los resultados se muestran en las gráficas A.2 y A.3. Según dichas gráficas, con la lámpara de deuterio la extinción a 260 nm aumenta durante los períodos de luz (al menos durante los tres últimos, ver figura A.2) y comienza en un nivel más bajo cada que se reestablece la irradiación luego de cada período de oscuridad, lo cual sugiere, como ya se ha mencionado, que el DNA se desnaturaliza con la luz UV-C y se renaturaliza al suspender la irradiación. A lo largo de las pruebas de luz la extinción a 600 nm registró un cambio neto notablemente mayor con la luz de deuterio que el cambio registrado con luz de tungsteno (figura A.3).

Las gráficas en la figura A.3 son prueba de que es la luz UV-C lo que causa el aumento en la extinción a 260 nm cuando se usa la lámpara de deuterio como fuente de luz, y por tanto apoyan la idea de que dicho tipo de radiación provoca la desnaturalización del DNA en solución acuosa.

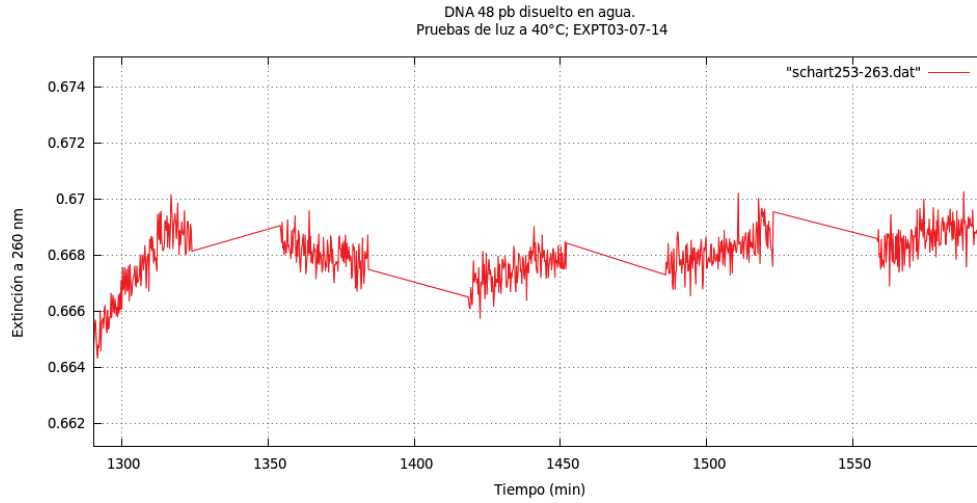


Figura A.2: Evolución de la extinción a 260 nm de la muestra de DNA de 48 pb irradiada con luz de lámpara de deuterio.

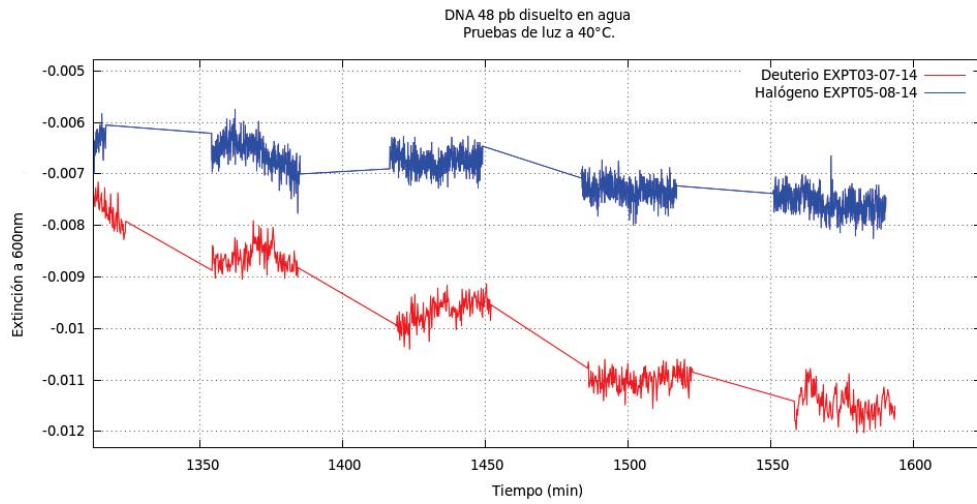


Figura A.3: Evolución de la extinción a 600 nm de la muestra de DNA de 48 pb irradiada con luz de deuterio (gráfica inferior) y de tungsteno-halógeno (superior).

Apéndice B

Incertidumbres al medir la extinción de luz.

El espectrómetro usado para medir la extinción de la radiación incidente sobre las soluciones de DNA cuenta con un dispositivo de carga acoplada (*charge-coupled device* o *CCD* por sus siglas en inglés) de 3648 pixeles en arreglo lineal. Cada pixel está destinado a recibir los fotones de determinada longitud de onda y convertir la señal óptica en una electrónica que luego es enviada al software de operación del espectrómetro.

Las fuentes de error o incertidumbre asociadas a los detectores CCD pueden deberse a efectos tanto dependientes como independientes de la señal fotónica incidente [70]. Por un lado, el error que depende de esta señal es consecuencia de la variación del número de fotones que arriban al detector por unidad de tiempo, y por supuesto no depende de la temperatura del detector. En cambio, el error que no depende de la señal es causado por el modo intrínseco de operación de los pixeles y generalmente sí depende de la temperatura del detector.

Para determinar las incertidumbres asociadas a las lecturas de extinción de luz se debe tomar en cuenta que para una longitud de onda dada, la extinción (Ext) de dicha onda se define como:

$$Ext = -\log_{10}T \tag{B.1}$$

donde T representa la transmisión de la onda a través de la solución y es definida según el cociente de la ecuación 4.1, capítulo 4.

Según la teoría de propagación de errores, la incertidumbre asociada a la extinción (s_{Ext}) es dada por:

$$s_{Ext} = \left(\frac{d}{dT}Ext(T)\right)s_T = \frac{0,434}{T}s_T \tag{B.2}$$

que de acuerdo a la ecuación B.1 se puede reescribir como:

$$s_{Ext} = \frac{0,434}{10^{-Ext}} s_T. \quad (B.3)$$

Expresando la incertidumbre como error relativo y reacomodando términos, la ecuación B.3 queda como:

$$\frac{s_{Ext}}{Ext} = \frac{0,434}{Ext} \cdot 10^{Ext} \cdot s_T \quad (B.4)$$

por tanto, conociendo la incertidumbre asociada a la transmisión (s_T) se puede determinar s_{Ext} . Según los estudios de Rothmand et al. [71] y de Galbán et al. [70], cuando no hay dependencia de la señal fotónica incidente la incertidumbre en la transmisión es dada por:

$$(s_T)_{independiente} = k_1 \quad (B.5)$$

donde k_1 es una constante. Así, para el caso independiente de la señal fotónica, la ecuación B.4 queda como:

$$\frac{(s_{Ext})_{independiente}}{Ext} = \frac{0,434}{Ext} \cdot k_1 \cdot 10^{Ext}. \quad (B.6)$$

Cuando sí hay dependencia de la señal fotónica incidente, la incertidumbre en la transmisión es dada por:

$$(s_T)_{dependiente} = k_2 \sqrt{T + T^2} \quad (B.7)$$

donde k_2 también es una constante. De acuerdo a la definición de extinción, ecuación B.1, la ecuación B.7 puede reescribirse como:

$$(s_T)_{dependiente} = k_2 \cdot \sqrt{10^{-Ext} + 10^{-2 \cdot Ext}}. \quad (B.8)$$

y así, para el caso dependiente de la señal fotónica, el error asociado a la extinción quedará determinado por:

$$\frac{(s_{Ext})_{dependiente}}{Ext} = \frac{0,434}{Ext} \cdot k_2 \cdot \sqrt{10^{-Ext} + 10^{-2 \cdot Ext}} \cdot 10^{Ext} \quad (B.9)$$

o bien por:

$$\frac{(s_{Ext})_{dependiente}}{Ext} = \frac{0,434}{Ext} \cdot k_2 \cdot \sqrt{1 + 10^{Ext}}. \quad (B.10)$$

Las constantes k_1 y k_2 pueden ser usadas como indicadores de la precisión de un detector y sus valores pueden ser obtenidos tomando medidas consecutivas (> 20) de una solución absorbente adecuada a una o varias longitudes de onda [72].

Utilizando dicromato de potasio diluido como absorbente, registrando la absorción de la longitud de onda 350 nm, principalmente, y utilizando como fuente de luz una lámpara DT-MINI-2GS de Ocean Optics, Galbán y su grupo [70] han obtenido valores para las constantes k_1 y k_2 que determinan la incertidumbre del espectrómetro USB 4000 de Ocean Optics a temperatura ambiente y dentro del rango lineal de la extinción (0–1.8). USB 4000 tiene integrado un detector CCD idéntico al del espectrómetro utilizado en nuestro experimento (HR4000CG-UV-Vis, Ocean Optics) por lo que esas constantes ($k_1 = 5 \times 10^{-4}$ y $k_2 = 8 \times 10^{-4}$) son adecuadas para estimar las incertidumbres asociadas a nuestras mediciones. De acuerdo a la teoría de propagación de errores, dichas incertidumbres serán completamente determinadas por:

$$\frac{s_{Ext}}{Ext} = \sqrt{\left(\frac{(s_{Ext})_{independiente}}{Ext}\right)^2 + \left(\frac{(s_{Ext})_{dependiente}}{Ext}\right)^2} \quad (B.11)$$

que al sustituir B.6 y B.10 queda explícitamente como:

$$\frac{s_{Ext}}{Ext} = \sqrt{\left(\frac{0,434 \cdot 5 \times 10^{-4} \cdot 10^{Ext}}{Ext}\right)^2 + \left(\frac{0,434 \cdot 8 \times 10^{-4} \cdot \sqrt{1 + 10^{Ext}}}{Ext}\right)^2}. \quad (B.12)$$

En la figura B.1 se muestra la relación entre el error relativo porcentual ($\sigma = (s_{Ext}/Ext) \cdot 100\%$) y la extinción en el rango lineal de nuestro espectrómetro.

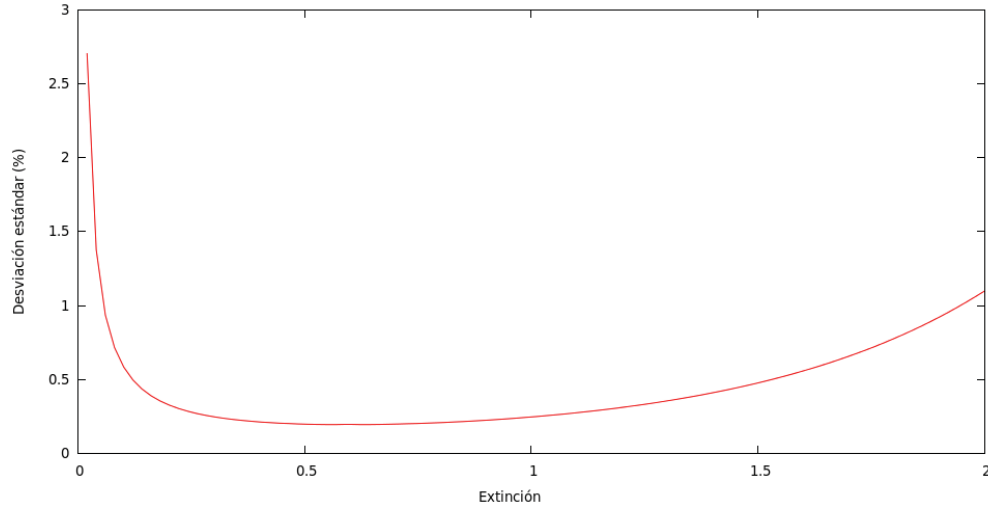


Figura B.1: Desviación estándar porcentual vs. Extinción.

Apéndice C

Código para análisis de datos.

Los archivos de los espectros de extinción se ven como sigue:

```
SpectraSuite Data File
+++++
Date: Thu Mar 20 16:23:48 CST 2014
User: karo
Dark Spectrum Present: Yes
Reference Spectrum Present: Yes
Number of Sampled Component Spectra: 1
Spectrometers: HR4C5695
Integration Time (usec): 1775000 (HR4C5695)
Spectra Averaged: 3 (HR4C5695)
Boxcar Smoothing: 10 (HR4C5695)
Correct for Electrical Dark: No (HR4C5695)
Strobe/Lamp Enabled: No (HR4C5695)
Correct for Detector Non-linearity: No (HR4C5695)
Correct for Stray Light: No (HR4C5695)
Number of Pixels in Processed Spectrum: 3648
>>>>Begin Processed Spectral Data<<<<<
194.79 -0.623
195.05 -0.623
195.32 -0.623
195.59 -0.000
...
254.87 0.284
255.14 0.285
255.40 0.285
255.67 0.286
255.94 0.286
...
1119.61 -1.898
1119.85 -0.000
1120.09 -0.000
1120.32 -0.000
1120.56 -0.000
1120.80 -0.000
1121.04 -0.908
>>>>End Processed Spectral Data<<<<<
```

En el encabezado de los archivos se especifican los valores de las funciones disponibles para la obtención de datos. Las dos columnas comprendidas entre *Begin Processed Spectral Data* y *End Processed Spectral Data* corresponden a la longitud de onda registrada (i.e. al canal del espectrómetro) y su respectiva lectura de extinción.

Las gráficas que se presentan en la sección 4.5.4 y 4.5.5 se obtuvieron graficando los archivos de Extinción vs. tiempo generados con el siguiente código, escrito en lenguaje Fortran, que calcula la extinción promedio entre determinado rango de longitudes de onda y el tiempo al que fue registrada dicha extinción.

```

program Extinción vs. tiempo
implicit none

! ----- Declaración de variables
real*8 WL, Ext !para leer la longitud de onda (WL) y la extinción (Ext) de cada archivo,
real*8 Sext, Pext !para calcular el promedio de la extinción (Pext),
real*8 tiempo
integer*4 hr, min, sec !para leer el tiempo de cada archivo y calcularlo en minutos,
integer*4 i, k, n !contadores de los tres procesos de cálculo.

character*1 h
character*1 numb1
character*2 numb2
character*3 numb3
character*4 numb4

! ----- Algoritmo
do k = 0, 1038 !este contador corre sobre el número de archivos a analizar.

! --- Las siguientes líneas ordenan la correcta lectura de los archivos
if(k .lt. 10) then
write(numb1,'(i1)') k
open(unit=5, file="Levadura0000"//numb1//".txt")
else if(k .lt. 100) then
write(numb2,'(i2)') k
open(unit=5, file="Levadura000"//numb2//".txt")
else if(k .lt. 1000) then
write(numb3,'(i3)') k
open(unit=5, file="Levadura00"//numb3//".txt")
else if(k .ge. 1000) then
write(numb4,'(i4)') k
open(unit=5, file="Levadura0"//numb4//".txt")
endif

! --- Se abre un nuevo archivo donde se guardarán los datos de Extinción vs. tiempo.
open(unit=13, file="schart.dat")

```

! — Esta sentencia omite la lectura de los primeros dos renglones del encabezado de cada archivo

```
do i= 1, 2
  read(5,1001)h
enddo
```

! — Se lee el tiempo (en el tercer renglón del encabezado) y se convierte a minutos

```
read(5,1012)hr, min, sec
tiempo = (60.*60.*float(hr)+60.*float(min)+float(sec))/60.
if(hr .lt. 12)tiempo = tiempo + 60.*24.
1012 format(17x,i2,1x,i2,1x,i2)
```

! — Se omite la lectura de los renglones restantes del encabezado

```
do i= 4, 17
  read(5,1001)h
enddo
1001 format(a1)
```

n = 0 *!este contador corre sobre el número de canales (longitudes de onda) a promediar;*
Sext = 0.0 *!esta variable guarda la suma de las extinciones para luego ser dividida por n.*

! — La siguiente iteración calcula el promedio de extinción para el rango de longs. de onda 255-265 nm. El contador "i" corre sobre el número de canales del espectrómetro.

```
do i = 1, 3648
  read(5,*)WL, Ext
  if(WL .ge. 255.0 .and. WL .lt. 265.0) then
    n = n + 1
    Sext = Sext + Ext
  endif
enddo

Pext = Sext/float(n)
```

! — Output; en el archivo creado se guardan, en dos columnas, los datos calculados

```
close(5)
write(13,1002)tiempo, Pext
1002 format(3f12.5)
enddo
```

```
end
```


Referencias

- [1] K. Michaelian. Thermodynamic Function of Life. *arXiv:0907.0040v2 [physics.gen-ph]*, 2009.
- [2] K. Michaelian. Thermodynamic dissipation theory for the origin of life. *Earth Syst. Dynam.*, 2:37–51, 2011.
- [3] C. Sagan. Ultraviolet Selection Pressure on the Earliest Organisms. *J. Theor. Biol.*, 39:195–200, 1973.
- [4] F. Tian, O. B. Toon, A. A. Pavlov, and H. De Sterck. A hydrogen rich Early Earth Atmosphere. *Science*, 308:1014–1017, 2005.
- [5] L. P. Knauth and D. R. Lowe. High Archean Climatic Temperature inferred from oxygen isotope geochemistry of cherts in the 3.5 Ga Swaziland group, South Africa. *Geol. Soc. Am. Bull.*, 115:556–580, 2003.
- [6] D. R. Lowe and M. M. Tice. Geological evidence for Archean atmospheric and climate evolution: Fluctuating level of CO₂, CH₄ and O₂ with an overriding tectonic control. *Geology*, 32:493–496, 2004.
- [7] C. Sagan and C. Chyba. The Early Faint Sun Paradox: Organic shielding of Ultraviolet-Labile Greenhouse Gases. *Science*, 276:1217–1224, 1997.
- [8] I. Cnossen, J. Sanz-Forcada, F. Farata, O. Witasse, T. Zegers, and N.F. Arnold. The habitat of early life: Solar X-ray and UV radiation at Earth surface 4-3.5 billion years ago. *J. Geophys. Res.*, 112, 2007. doi: 10.1029/2006JE002784.
- [9] L. Paul Knauth. Temperature and salinity history of the Precambrian ocean: implications for the course of microbial evolution. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 219:53–69, 2005.
- [10] J. W. Morse and F. T. Mackenzie. Hadean ocean carbonate geochemistry. *Aquat. Geochem.*, 4:301–319, 1998.

- [11] H. J. Cleaves, J. H. Chalmers, A. Lazcano, S. A. Miller, and J. L. Bada. A Reassessment of Prebiotic Organic Synthesis in Neutral Planetary Atmospheres. *Origins Life Evol. B.*, 38:105–115, 2008.
- [12] J. Oró. Mechanism of synthesis of adenine from hydrogen cyanide under possible primitive Earth conditions. *Nature*, 191:1193–1194, 1961.
- [13] K. Michaelian. Biological catalysis of the hydrological cycle: life’s thermodynamic function. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 16:2629–2645, 2012.
- [14] J. P. Peixoto, A. H. Oort, M. de Almeida, and A. Tome. Entropy budget of the Atmosphere. *J. Geophys. Res.*, 96:10981–10988, 1991.
- [15] A. Kleidon and R. D. Lorenz. Entropy production by earth systems processes, in Non-Equilibrium thermodynamics and the production of entropy; life, Earth, and Beyond; Kleidon and Lorenz (Eds.). *Springer*, 2005.
- [16] R. P. Allan, C. Liu, N. G. Loeb, M. D. Palmer, M. Roberts, D. Smith, and P. L. Vidale. Changes in global net radiative imbalance 1985-2012. *Geophys. Res. Lett.*, 41:5588–5597, 2014.
- [17] W. Wu and Y. Liu. Radiation entropy flux and entropy production of the Earth system. *Rev. Geophys.*, 48:RG2003, 2010. doi: 10.1029/2008RG000275.
- [18] G. L. Stephens and D. M. O’Brien. Entropy and climate. I: ERBE observations on the entropy production of the earth. *Q. J. R. Meteorol. Soc.*, 119:121–152, 1993.
- [19] H. T. Brown and F. Escombe. Researches of some of the fysiological processes of green leaves with special reference to the interchange of energy between the leaf an its surroundings. *P. Roy. Soc. Lond.*, B 76:29–111, 1905.
- [20] A. Kleidon. Entropy production by evotranspiration and its Geographic Variation. *Soil Water Res.*, 3:S89–S94, 2008.
- [21] E. T. Kool. Hydrogen Bonding, Base Stacking and Steric Effects in DNA Replication. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 30:1–22, 2001.
- [22] D. R. Blake. Denaturation of DNA; in Molecular Biology and Biotechnology: A comprehensive Desk Reference, Robert A. Meyers (Ed.). *Wiley.VCH*, pages 207–210, 1995.

- [23] K. Changhong, M. Humenluk, H. S-Gracz, and P. E. Marzlack. Direct Measurements of Base Stacking interactions in DNA by single-molecule atomic-force spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 99:018302, 2007.
- [24] C. T. Middleton, K. de la Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. Excited-State dynamics: from single bases to the double helix. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 60:217–239, 2009.
- [25] C. Ponnampereuma, R. Mariner, and C. Sagan. Formation of Adenosine by Ultraviolet Irradiation of a Solution of Adenine and Ribose. *Nature*, 198:1199–1200, 1963.
- [26] A. M. Schwartz and G. J. F. Chittenden. Synthesis of uracil and thymine under simulated prebiological conditions. *BioSystems*, 9:87–92, 1977.
- [27] C. Folmose, A. Brittain, and M. Zelko. Photochemical Synthesis of Biomolecules under Anoxic Conditions. *Origins Life*, 13:49–55, 1983.
- [28] E. A. Kuzicheva, M. A. Khenokh, and N. V. Rsupkina. Synthesis of purine and pyrimidine nucleosides under the action of high temperature and UV-radiation. *Zh Evol Biokhim Fiziol.*, 11(2):112–118, 1975.
- [29] E. A. Kuzicheva and M. B. Simakov. Abiogenic Synthesis of nucleotides in conditions of space flight of biosputnik BION-11. *Adv. Space Res.*, 23:381–391, 1999.
- [30] E. Sherwood, A. Joshi, and J. Oró. Cyanamide mediated synthesis under possible primitive earth conditions. II. the polymerization of deoxythymidine 5'-triphosphate. *J. Mol. Evol.*, 10(3):193–209, 1977.
- [31] T. F. Strigunkova, G. A. Lavrentiev, and Otroshchenko V. A. Abiogenic synthesis of oligonucleotides on kaolinite under the action of ultraviolet radiation. *J. Mol. Evol.*, 23(4):193–209, 1977.
- [32] W. M. Powner, Béatrice Gerland, and John D. Sutherland. Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature*, 459:239–242, 2009.
- [33] H. Kang, K. T. Lee, B. Jung, Y. J. Ko, and K. S. Kim. Intrinsic lifetimes of the excited state of DNA and RNA bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:12958–12959, 2002.
- [34] A. Lazcano, R. Guerrero, L. Margulis, and J. Oró. The Evolutionary Transition from RNA to DNA in Early Cells. *J. Mol. Evol.*, 27:283–290, 1988.

- [35] Helmut Görner. Photochemistry of DNA and related biomolecules: quantum yields and consequences of photoionization. *J. of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 26:117,139, 1994.
- [36] Patrick M. Hare, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. Internal conversion to the electronic ground state occurs via two distinct pathways for pyrimidine bases in aqueous solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(2):435–440, 2007.
- [37] J. M. Pecourt and B. Peon, J. and Kohler. DNA excited-state dynamics: ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(42):10370–10378, 2001.
- [38] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, and B. Kohler. Base stacking controls excited-state dynamics in *A·T* DNA. *Nature*, 436:1141–1144, 2005.
- [39] K. de la Harpe, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. Excited-State lifetimes in a *G·C* DNA Duplex are nearly Independent of Helix Conformation and Base Pairing Motif. *Chemphyschem*, 10(9-10):1421–1425, 2009a.
- [40] I. Buchvarov, Q. Wang, M. Rayteher, A. Trifanov, and T. Fiebig. Electronic energy delocalization and dissipation in single- and double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(12):4794–4797, 2007.
- [41] D. B. Bucher, B. M. Pilles, T. Carell, and W. Zinthe. Charge separation and charge delocalization identified in long-living states of photoexcited DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111(12):4369–4374, 2014a.
- [42] K. de la Harpe, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. Deuterium Isotope Effect on Excited-State Dynamics in an Alternating GC Oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(48):17557–17559, 2009.
- [43] J. Chen, A. K. Thazhatheevtil, F. D. Lewis, and B. Kohler. Ultrafast Excited-State Dynamics in Hexaethylenglycol-Linked DNA Homoduplexes Made of *A·T* Base Pairs. *J. Am. Chem. Soc.*, 135:10290–10293, 2013.
- [44] C. Su, C. T. Middlenton, and B. Kohler. Base-stacking disorder and excited-state dynamics in single-stranded adenine homooligonucleotides. *J. Phys. Chem. B*, 116:10266, 2012.
- [45] D. B. Bucher, A. Schlueter, T. Carell, and W. Zinth. Watson-Crick base pairing controls excited-state decay in natural DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53:11366–11369, 2014.

- [46] W. Gilbert. The RNA World. *Nature*, 319:618, 1986.
- [47] Jack W. Szostak. The eightfold path to non-enzymatic RNA replication. *J. Systems Chemistry*, 3:2, 2012.
- [48] K. Michaelian. A non-linear irreversible thermodynamic perspective on organic pigment proliferation and biological evolution. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 475:012010, 2013. doi:10.1088/1742-6596/475/1/012010.
- [49] A. W. Schwartz and S. Chang. From Bing Bang to primordial planet-setting the stage for the origin of life, in Life's Origin; Schopf, J. W. (ed.). *University of California Press*, Berkely:78–112, 2002.
- [50] P. K. Bridson and L. E. Orgel. Catalysis of Accurate poly(C)-directed synthesis of 3'-5'-linked Oligoguanylates by Zn^{2+} . *J. Mol. Biol.*, 197:187–193, 1980.
- [51] M. Yarus, J. J. Widmann, and R. Knight. RNA-Amino Acid Binding: A Stereochemical Era for the Genetic Code. *J. Mol. Evol.*, 69:406–429, 2009.
- [52] K. Michaelian. La producción de entropía y el origen de la vida. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Física*, 25, 1:335–342, enero-marzo, 2011.
- [53] K. Michaelian. Homochirality through Photon-Induced Melting of RNA/DNA: the Thermodynamic Dissipation Theory of the Origin of Life. *arXiv:1010.1059v1*, 2010.
- [54] R. Thomas. The denaturation of DNA. *Gene*, 135:77–79, 1993.
- [55] N. L. Vekshin. Screening hypochromism of chromophores in macromolecular biostructures. *Biophysics*, 44,1:41–51, 1999.
- [56] N. L. Vekshin. *Photonics of biopolymers*. M.: KomKniga, Rusia, 2005.
- [57] A. V. Vologodskii. *Topology and Physics of Circular DNA*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992.
- [58] U. Hagen, K. Keck, H. Kröger, F. Zimmerman, and T. Lücking. Ultraviolet light inactivation of the priming ability of DNA in the RNA polymerase system. *Biochim. Biophys. Acta*, 95:418–425, 1965.
- [59] J. Marmur and P. Doty. Thermal Renaturation of Deoxyribonucleic Acids. *J. Mol. Biol.*, 3:585–594, 1961.

- [60] R. D. Hotchkiss. The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.*, 175:315–332, 1948.
- [61] E. Visscher and E. Chargaff. The separation and quantitative estimation of purines and pyrimidines in minute amounts. *J. Biol. Chem.*, 176:703–714, 1948.
- [62] T. R. Nordlund. *Quantitative Understanding of Biosystems: An Introduction to Biophysics*. CRC Press Taylor and Francis Group, 2011. consultar p. 24.
- [63] Shih Yi (Ed.) Wang. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. Vol 2: Biology*. Elsevier, 1976.
- [64] F. M. Pohl and T. M. Jovin. Salt-induced Co-operative Conformational Change of a Synthetic DNA:Equilibrium and Kinetic Studies with Poly(dG-dC). *J. Mol. Biol.*, 67:375–396, 1972.
- [65] H. Zhang, H. Yu, J. Ren, and X. Qu. Reversible B/Z-DNA Transition under the Low Salt Condition and Non-B-Form PolydApolydT Selectivity by a Cubane-Like Europium-L-Aspartic Acid Complex. *Biophysical J.*, 90:3203–3207, 2006.
- [66] U. Kuhnlein, S. S. Tsang, and J. Edwards. Cooperative structural transition of PM2 DNA at high ionic strength and its dependence on DNA damages. *Nature*, 287:363–364, 1980.
- [67] K. Michaelian and A. Simeonov. Fundamental Molecules of Life are Pigments wich Arose and Evolved to Dissipate the Solar Spectrum. *arXiv:1405.4059v2 [physics.bio-ph]*, 2014; *Biogeosciences*, 2015.
- [68] S. L. Miller. *The endogenous synthesis of organic compounds*. Cambridge Univesity Press, Cambridge, 1998. in *The Molecular Origins of Life*. Brack, A. (Ed.).
- [69] R. Stribling and S. L. Miller. Energy yields for hydrogen cyanide and formaldehyde syntheses: the HCN and amino acid concentrations in the primitive ocean. *Origins Life Evol. B.*, 17:261–273, 1987.
- [70] J. Galbán, S. de Marcos, I. Sanz, C. Ubide, and J. Zuriarrain. CCD detectors for molecular absorption spectrophotometry. A theoretical and experimental study on characteristics and performance. *Royal Society of Chemistry/Analyst*, 135:564–569, 2010.

- [71] L. D. Rothman, S. R. Crouch, and J. D. Jr. Ingle. Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 47(8):1226–1233, 1975.
- [72] J. Galbán, S. de Marcos, I. Sanz, C. Ubide, and J. Zuriarrain. Uncertainty in modern spectrophotometers. An up-to-date view of UV–vis molecular absorption instruments and measurements. *Analytical Chemistry*, July 1:4763–4767, 2007.