



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS
INSTITUTO DE FÍSICA

PROCESO DE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA EN
ADN Y SUS IMPLICACIONES EN UN POSIBLE
MECANISMO DE DESNATURALIZACIÓN NO
ENZIMÁTICA INDUCIDO POR LUZ UV-C

T E S I S

*Que para optar por el grado de:
Maestría en Ciencias, Física*

PRESENTA:

ADRIANA REYNA LARA

SUPERVISOR:

DR. KARO MICHAELIAN
INSTITUTO DE FÍSICA

COMITE TUTOR:

DR. HERNANDO QUEVEDO CUBILLOS
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES
DR. FRANCISCO JAVIER SEVILLA PÉREZ
INSTITUTO DE FÍSICA

Ciudad de México – Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Adriana Reyna Lara: *Proceso de transferencia de energía en ADN y sus implicaciones en un posible mecanismo de desnaturalización no enzimática inducido por luz UV-C*, Tesis presentada a la Universidad Nacional Autónoma de México para obtener el grado de Maestría en Ciencias, Física, © Junio, 2017, Ciudad de México

ABSTRACT

This work aims to establish a theoretical basis for a primitive and experimentally observed mechanism of RNA and DNA enzymeless denaturing leading to its replication during the Archean. This mechanism, called Ultraviolet and Temperature Assisted Reproduction ([UVTAR](#)) is associated with the dissipation of a generalized chemical potential, the solar photon potential. Such dissipative structuring and proliferation of molecules, now known as the fundamental molecules of life, can explain the emergence and proliferation of life in physical-chemical terms.

This theoretical work consists in understanding two main processes, the UV-C photon-DNA interaction and DNA denaturation by a molecular dynamics description on time scales as short as fractions of picoseconds to nanoseconds. The dissipation of excitation energy along the double helix of a 25 base pair DNA molecule due to the absorption of a photon (260 nm) in a single base pair was simulated with molecular dynamics, using empirical-potentials.

The absorbed energy of the photon breaks the hydrogen bonds that binds the complementary single strands of DNA, thus beginning the process of denaturing. In addition, this work considers possible forms of energy transfer along the DNA, like the formation of excitons and charge transfer along the chain that could be important in fixing the initial conditions of the replicative-dissipative system after the absorption of UV-C light. The proposed theoretical mechanism is consistent with experimental data.

RESUMEN

En este trabajo pretendemos establecer las bases teóricas de un mecanismo propuesto y observado experimentalmente para la desnaturalización no enzimática del ARN y ADN siendo el primer paso para la emergencia de su replicación durante el Arqueano. El mecanismo llamado reproducción asistida por calor y luz ultravioleta (UVTAR) está estrechamente ligado a la disipación fotónica solar (el corrimiento al rojo). Tal estructuración disipativa y proliferación de las moléculas, ahora conocidas como moléculas fundamentales de la vida, bajo proceso irreversible de la interacción del potencial químico generalizado explica la aparición y proliferación de la vida en términos físico-químicos.

El trabajo teórico consiste en comprender es dos procesos principales, la fotointeracción en el UV-C con el ADN y la desnaturalización del ADN descrita por dinámica molecular en escalas temporales del orden de fracciones de picosegundos a nanosegundos. La disipación de la energía de excitación, debida a la absorción de un fotón de 260 nm en uno de los pares de bases a lo largo de una doble hélice de 25 pares de bases, se simuló con dinámica molecular, utilizando potenciales empíricos.

La energía del fotón absorbida romperá con los enlaces de hidrógeno que mantiene unidas a las cadenas simples de ADN comenzando así el proceso de desnaturalización. Además, este trabajo considera las posibles formas de transferencia de energía a través del ADN, como: formación de excitones y transferencia de carga a lo largo de la cadena, que podrían ser importantes al fijar las condiciones iniciales del sistema disipativo-replicativo después de la absorción de un fotón de luz UV-C. El trabajo teórico propuesto es consistente con los datos experimentales.

CONTENIDO

Lista de Figuras	vii
Índice de cuadros	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES IMPORTANTES DEL ADN	3
2.1 Composición química y estructura geométrica	3
2.2 Fuerzas que estabilizan el ADN	7
2.2.1 Enlaces de hidrógeno	8
2.2.2 Fuerzas de apilamiento	8
2.3 Desnaturalización térmica del ADN	10
3 REPLICACIÓN ASISTIDA POR CALOR Y LUZ ULTRAVIOLETA	13
3.1 Condiciones en las que se originó la vida	14
3.2 La emergencia de la replicación del ADN	17
3.2.1 Condiciones iniciales	17
3.2.2 Esquema general de UVTAR	18
3.2.3 UVTAR como reacción autocatalítica	20
3.2.4 El experimento, desnaturalización reversible	21
4 CÁLCULO GEOMÉTRICO DE LA DIFUSIÓN DE LA ENERGÍA DE UN FOTÓN UV-C EN EL ADN	27
5 POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN LA DESNATURALIZACIÓN DEL ADN INDUCIDA POR LA LUZ UV-C	29
5.1 Fotofísica del ADN	30
5.1.1 Desactivación de mononucleótidos excitados por UV-C	30
5.1.2 Desactivación del ADN de cadena simple y doble excitado por luz UV-C	33
5.1.3 Excíplex y transferencia de energía	35
5.2 Fenómenos de transferencia de energía y desactivación	38
5.2.1 Desexcitación por conversión interna e intersección cónica podría conducir al rompimiento de los enlaces de hidrógeno	38
5.2.2 Desprotonación del ADN y el agua por luz ultravioleta	40
5.2.3 Dimerización	42
6 DINÁMICA MOLECULAR DEL ADN Y SU AMBIENTE: ETAPAS DE DESNATURALIZACIÓN	43
6.1 Introducción	43
6.2 Detalles de la simulación de las etapas de la desnaturalización	44
6.3 Desnaturalización en el vacío	46
6.4 Simulación del ADN en agua a su temperatura de desnaturalización	47
6.5 Desnaturalización en agua con iones a temperaturas altas	50
7 DINÁMICA MOLECULAR DE LA DIFUSIÓN DE CALOR EN ADN Y AMBIENTE	55

8	CONCLUSIONES	61
A	DINÁMICA MOLECULAR	65
A.1	Aproximación clásica a la dinámica molecular, campos de fuerza	65
A.2	Acoplamiento de presión, Parrinello-Rahman	69
A.3	Dinámica molecular con un baño térmico, termostato de Berendsen	71
A.4	Algoritmo global de dinámica molecular	73
B	GROMACS	75
B.1	Coordenadas y topología	75
B.2	Periodicidad, solvatación y adición de iones	76
B.3	Optimización del sistema	78
B.4	Equilibración	79
B.5	Dinámica molecular	82
	REFERENCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura molecular del ADN, cadena sencilla y doble	3
Figura 2	Estructura química de los nucleótidos	4
Figura 3	Acoplamiento de cadenas sencillas antiparalelas de la estructura de Watson y Crick	5
Figura 4	Conformación geométrica del A, B y Z-ADN	6
Figura 5	Estructura geométrica de los pares de bases	7
Figura 6	Curva de desnaturalización experimental del ADN de 25 pares de bases	10
Figura 7	Curva de desnaturalización teórica del ADN de 25 pares de bases	11
Figura 8	Replicación del ADN en las células hoy en día	13
Figura 9	Cálculo del espectro solar en la superficie de la Tierra a través del tiempo	15
Figura 10	Absorción de luz UV-C del ADN y extinción de los nucleótidos	16
Figura 11	Absorción de luz en el agua	17
Figura 12	Replicación asistida por calor y luz ultravioleta	19
Figura 13	Desnaturalización como aumento en la extinción de ADN por luz ultravioleta	22
Figura 14	Hipercromicidad en el ADN	24
Figura 15	Extinción para ADN sintético de 25 pares de bases con variaciones en la temperatura	25
Figura 16	Dibujo esquemático del volumen de difusión de calor	28
Figura 17	Señal de absorción transitoria de las bases nucleótidas.	31
Figura 18	Energía potencial esquemática para los estados base y excitados de la timidina y uracilo, en coordenadas de configuración, incluyendo los caminos de decaimiento.	32
Figura 19	Desactivación de monómeros y bases apiladas.	34
Figura 20	Representación esquemática de los posibles procesos del ADN por fotointeracción en el rango UV-C	35
Figura 21	Dinámica del estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ del uracilo en solución acuosa.	39
Figura 22	Deformación de las bases G, A y C por intersección cónica.	40
Figura 23	Esquema de desprotonación de ADN en agua.	41
Figura 24	Representación de las coordenadas del ADN simulado en el vacío.	46
Figura 25	Enlaces de hidrógeno del ADN de 25 pb a su temperatura de desnaturalización, 300 ns.	48
Figura 26	Desviación cuadrática media del ADN en agua a altas temperaturas.	51

Figura 27	Desnaturalización por temperatura elevada 430 K. . .	52
Figura 28	Orbitales moleculares de la Guanosina.	56
Figura 29	Distribuciones de velocidades de Maxwell-Boltzmann para cada átomo de guanina.	57
Figura 30	Aproximación de interacciones moleculares	68
Figura 31	Visualización de la topología y optimización del sis- tema.	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Energía, entalpía y entropía de apilamiento entre pares de bases	9
----------	--	---

ACRÓNIMOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMBER	modelo de construcción asistida con refinamiento de energía –Assisted Model Building with Energy Refinement–
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
CMP	Citidina Monofosfato
DFT	Density Functional Theory
DM	Dinámica Molecular
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EET	Electronic Excitation Energy Transfer
FRET	Förster Resonant Energy Transfer
GDP	Guanosina Difosfato
GROMACS	Groningen Machine for Chemical Simulations
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
NPH	Ensamble isoentálpico e isobárico
NPT	Ensamble isobárico e isotérmico
PCR	reacción en cadena de la polimerasa –Polymerase Chain Reaction–
QM/MM	Quantum Mechanics/Molecular Mechanics
RNA	Ribonucleic Acid
TDDFT	Time Dependent Density Functional Theory
UV-C	Luz Ultravioleta (220-280 nm)
UVTAR	Ultraviolet and Temperature Assisted Reproduction

INTRODUCCIÓN

La disipación y transferencia de energía a través del eje mayor del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) ha sido estudiada desde apenas una década y media después del descubrimiento de su estructura molecular en 1953 [1-4]. A finales de los 60's y principios de los 70's fue notado que la radiación Luz Ultravioleta (220-280 nm) (UV-C) inducía daños en la configuración molecular del ADN [5, 6], pero no precisamente donde esta radiación incide. La energía depositada en un punto específico emigra a lo largo del ADN y llega a alcanzar hasta los 200 pares de bases de distancia al sitio de donde la muestra fue irradiada.

Además de la importancia de encontrar cómo el material genético puede ser dañado por la interacción con la radiación, se ha estudiado la transferencia de energía por las propiedades semiconductoras y otras propiedades eléctricas del ADN que son de utilidad por su fácil manipulación en nanotecnología y bioelectrónica, como nanocables [7, 8] y *quantum dots* [9, 10].

Basándonos en los estudios previos pretendemos establecer las bases teóricas de la transferencia y disipación de energía en el ADN enfocado a ilustrar un proceso fundamental durante la etapa temprana de la vida en el Arqueano: la desnaturalización no enzimática del ADN y Ácido Ribonucleico (ARN) que es necesaria para su replicación y transcripción.

La energía proveniente del sol que llegaba a la superficie de los océanos en el Arqueano del rango ultravioleta, fungía como un potencial impuesto constante permitiendo que el ADN ganara grados de libertad usándolos para replicarse. El proceso termodinámico irreversible que ocurre de la fotointeracción y la deslocalización de esta energía de excitación, produce la desnaturalización del material genético dando emergencia a su replicación. A este mecanismo disipativo propuesto se le conoce como replicación asistida por calor y luz ultravioleta (UVTAR) [11-13].

Buscamos comprender el fenómeno colectivo no local de la migración energética del sitio de absorción de un fotón de 260 nm (4.77 eV) en el ADN que rompe con los enlaces de hidrógeno que lo mantiene en doble hélice para así desnaturalizarse y comenzar un proceso de replicación.

Naturalmente, UVTAR no es el único proceso primitivo que emerge debido a la disipación de la energía libre proporcionada por la luz solar en el tiempo *Arqueano*. La disipación de esta abundante energía diurna se ha postulado como responsable de la emergencia, proliferación y evolución de la vida. Ha

surgido una teoría bajo este concepto, titulada: *Teoría termodinámica disipativa del origen de la vida* [12, 13]. A diferencia de cualquier teoría del origen y evolución de la vida propuesta anteriormente [14-19], la teoría en la que nos basamos propone un mecanismo foto-autocatalítico¹ que permite que las moléculas fundamentales para la vida (aminoácidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos) se formen y “auto-organicen” bajo esta estructuración disipativa. De la misma manera, procesos y mecanismos ya “auto-organizados” se acoplarán y se “reauto-organizarán” sucesivamente hasta formar la biosfera con la vida como hoy en día es conocida acoplado a procesos abióticos irreversibles como es el ciclo de agua, con el propósito termodinámico de fomentar la disipación de la luz solar.

Con el enfoque de esta teoría, comenzaremos nuestro trabajo describiendo el proceso de replicación propuesto, [UVTAR](#), en el [Capítulo 3](#). Aquí se encuentran las condiciones en las que la vida y la replicación asistida tuvieron lugar hace aproximadamente 3.85 mil millones de años. Pero antes, el [Capítulo 2](#) está dedicado a exponer la importancia del [ADN](#) y [ARN](#) en la vida, sus propiedades químicas y físicas que son de relevancia para nuestro análisis teórico.

Nuestro análisis en la transferencia de energía a lo largo de una cadena de [ADN](#) será considerado en formas distintas y estará dirigido para elucidar [UVTAR](#) con los siguientes puntos de vista:

1. Un cálculo geométrico para determinar el volumen de agua que se calienta 3°C, que representa una porción sustancial de la curva de desnaturalización del [ADN](#), considerando la absorción de un fotón de [UV-C](#) de 4.77 eV (260 nm). Esta medición se hizo esféricamente y elípticamente, [Capítulo 4](#).
2. Proponemos posibles mecanismos para el rompimiento de enlaces de hidrógeno en las hebras dobles de [ADN](#) como resultado de la energía excitación, migración y disipación de esta energía [Capítulo 5](#).
3. Una dinámica molecular de la desnaturalización del [ADN](#) por calor, analizando sus etapas, buscando la comprensión y visualización de la desnaturalización, [Capítulo 6](#).
4. Simulación de la dinámica molecular de la difusión de calor a través de [ADN](#) en agua simple y salada, [Capítulo 7](#).

Dentro del contenido también añadimos un [Apéndice A](#) donde hablamos de la construcción de la teoría de la dinámica molecular y el algoritmo usado para nuestro análisis. Se ha puesto aparte para no confundir el objetivo de la tesis, pero es crucial para comprender las dinámicas realizadas. Por último,

¹ La catálisis es un incremento en la tasa de una reacción química con un agente propagador, un catalizador. Una molécula o átomo actúa como su propio catalizador si este promueve de una u otra manera la producción de si mismo. Si la reacción es fotoquímica, este proceso es llamado foto-autocatalítico.

en el [Apéndice B](#) es un conciso tutorial de una dinámica molecular llevada a cabo en un programa de software libre, donde realizamos las dinámicas.

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES IMPORTANTES DEL ADN

Este capítulo contiene los conceptos biológicos y químicos básicos que describen el ADN; conceptos que después emplearemos como: la estructura Watson-Crick o Hoogsteen, los tipos de hélice A, B y Z del ADN; las fuerzas que estabilizan la estructura del ADN y finalmente hablaremos de la desnaturalización por temperatura del ADN. La finalidad es darle al lector un panorama general de nuestro objeto de estudio.

2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURA GEOMÉTRICA

Cada célula de todo ser viviente en la Tierra, en los tres dominios de esta: arquea, bacterias y eucariotas; contiene toda la información que necesita para crear, duplicar y hacer variaciones de sí misma. Esta información se encuentra almacenada en el núcleo y ribosomas de la célula (no en el caso de las células procariontas) en una molécula doble: el ADN (o ARN de cadena sencilla) [ver Figura 1].

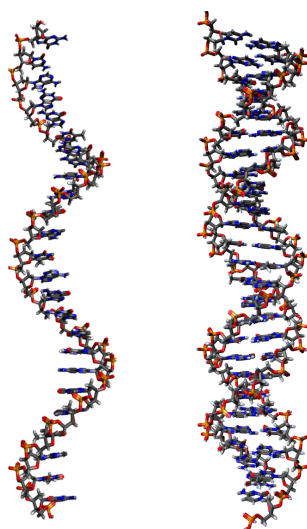


Figura 1: Estructura molecular del ADN, cadena sencilla y doble. La secuencia lineal 5'-CTATGGAGCGGATATACCATGGACG-3', fue usada para crear las cadenas sencilla y doble en hélice tipo B-ADN que se caracteriza por un diámetro de 20Å. Los pares de bases adyacentes se encuentran separados por una distancia de 3.4Å [20] a lo largo del eje rotado por 34.3°. Se usó el programa AVOGADRO para generar las estructuras.

Esta molécula está hecha de secuencias de cuatro moléculas más pequeñas llamadas nucleótidos. El arreglo de estos nucleótidos, en una larga secuencia lineal, dicta la diferencia entre una bacteria, un hongo y un humano. Podemos ver al **ADN** como la librería que es propia de cada ser vivo, es un almacén de información. Un gen es un libro de esta enorme librería; un segmento del **ADN** que contiene una instrucción completa a realizar en la célula, e. g. la transcripción de una proteína.

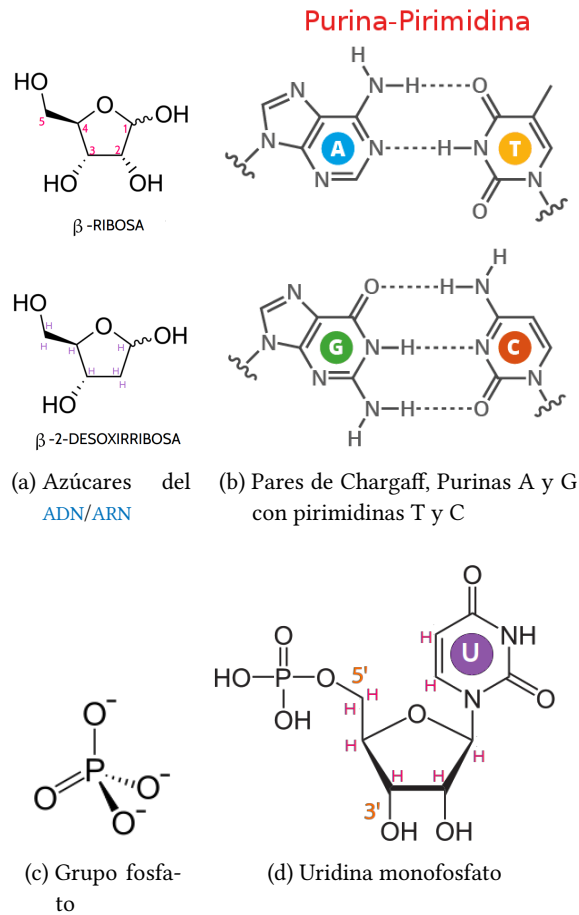


Figura 2: Estructura química de los nucleótidos. (a) Azúcares de las nucleobases. Podemos identificar a la desoxirribosa ya que el carbono de posición 2 no contiene un oxígeno, por ello es el nombre de 2-Desoxirribosa. El símbolo β en ambas ribosas es debido a que pueden formar un enlace β -glucosídico liberando una molécula de agua al unirse con los nucleótidos. En los carbonos 5' y 3' es donde se agregan los grupos fosfato (HPO_4^-). (b) Pares de Chargaff, Adenina-Timina y Guanina-Citosina. A la Adenina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$) y guanina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$) se les denomina por purinas. La timina ($\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$) y citosina ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$) son mejor conocidas como pirimidinas, al igual que el uracilo ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$), que reemplaza a la timina en el ARN. (c) Grupo fosfato. (d) Uridina monofosfato ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$), es una pieza completa para una cadena sencilla de ARN. Esta podría unirse por su carbono 5' y dejar el carbono 3' disponible para que otro nucleótido monofosfato se una.

Los nucleótidos están divididos en tres principales secciones: una nucleobase, un azúcar y un grupo fosfato. La nucleobase determina la naturaleza del nucleótido; la adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) (o uracilo(U) en el caso del **ARN**) son la base del código genético. Esta nucleobase está ligada a un esqueleto común formado por la molécula de azúcar –llamada desoxirribosa (o ribosa para el **ARN**)– y un grupo fosfato (PO_4^{-3}) [ver **Figura 2**, (d)].

El azúcar, la desoxirribosa ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$) del **ADN** (o ribosa ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$) de **ARN**) [ver **Figura 2a**], está conectada a una de las nucleobases por un enlace *N*- β -glucosídico para formar uno de los cuatro nucleósidos: adenosina, guanosina, citidina y timidina (uridina). Un nucleótido está formado por fosforilación del nucleósido con el grupo fosfato en uno los carbonos 3' o 5' del azúcar, para después siempre preferir al carbono 5'. Entonces, un nucleótido tendrá el carbono 3' del azúcar, que coincide con un grupo hidróxilo (o grupo OH) libre, para formar un nuevo enlace fosfodiéster. Este potencial enlace le permite apilarse con otros nucleótidos y formar secuencias lineales.

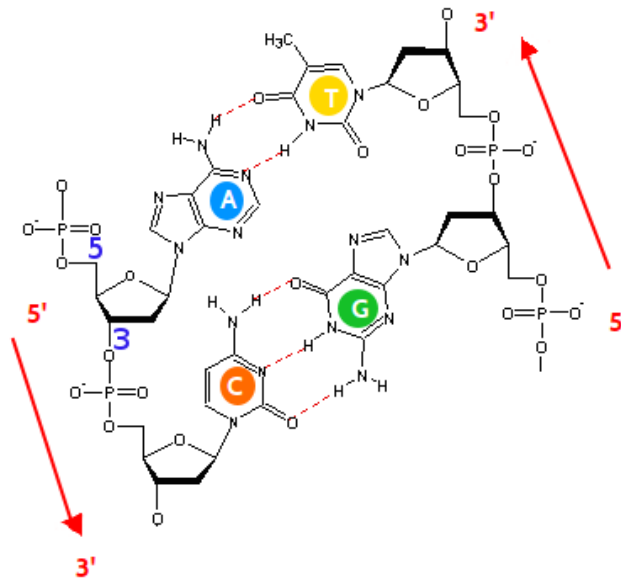


Figura 3: Acoplamiento de cadenas sencillas antiparalelas de la estructura de Watson y Crick. Esquema del par de base C-G apilado con el par de bases A-T. La cadena de ADN, u oligo (<50 pb), se puede leer como $5' - AC - 3' \cdot 3' - GT - 5'$ o bien $d(AC) \cdot d(GT)$.

Las cadenas lineales de nucleótidos tienen una polaridad marcada por los ‘extremos’ que juegan los carbonos en las posiciones 3 y 5 en la desoxirribosa. La formación de enlaces fosfodiéster entre nucleótido y nucleótido en la naturaleza tienen preferencia por el sentido $5' \rightarrow 3'$; e.g. las cadenas son reconstruidas con esta orientación al ser copiadas. Una cadena doble de **ADN** está formada por dos cadenas sencillas con polaridad invertida o bien antipa-

rales. Las cadenas antiparalelas se unen entre sí por enlaces de hidrógeno de acuerdo a la regla de Chargaff: existen dos tipos de pares de bases A-T y G-C.

La [Figura 2](#) y la [Figura 3](#) muestran los esquemas de la configuración química del ADN, desde la composición de un mononucleótido, la regla de los pares de bases WC (una purina se complementa con una pirimidina unidas por puentes de hidrógeno) y la polaridad de las cadenas al unirse para formar la doble hélice. Los puentes de hidrógeno dependen del par de bases, si es A-T solo dos puentes de hidrógeno se forman y para G-C son tres los que unen el par de bases.

La estructura geométrica de la hélice está clasificada principalmente en tres tipos distintos, A, B y Z dentro de los parámetros biológicos [ver [Figura 4](#)]. Normalmente el ADN mantiene la estructura B. Se ha estudiado que la estructura A es una forma que adapta el ADN para protegerse de bacterias y virus. Ambas estructuras, A y B, se enroscan hacia la derecha, mientras que la estructura Z se enrosca a la izquierda. Aún no se sabe con exactitud el significado biológico de la estructura Z, pero esta se produce durante la transcripción.

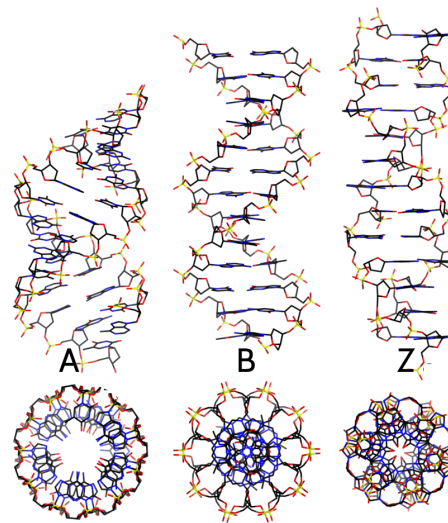


Figura 4: Conformación geométrica del A, B y Z-ADN. Algunas de sus diferencias notables son, el diámetro 23, 20 y 18 Å, la separación entre nucleótidos adyacentes, 2.6, 3.4 y 3.7 Å y la rotación del eje de los pares de bases 32.7°, 34.3° y 30° respectivamente. Crédito de imagen: Wikipedia.

La estructura de Watson y Crick (W-C) [1-4] presentada en esta sección, no es la única; hay una variación de esta, donde las purinas, G y A, se conectan con las pirimidinas, C y T, de forma distinta llamada estructura de Hoogsteen con una presencia de ~ 1 % en la naturaleza [ver [Figura 5](#)].

Las purinas de los pares de W-C se unen a las pirimidinas mediante el átomo N1 como aceptor del puente de hidrógeno y C6 como donador, mientras que en los pares de Hoogsteen se cambian los átomos N1 por N7 como aceptor del enlace de hidrógeno y C6 permanece como donador. Para el par G-C se pierde uno de los puentes de hidrógeno, el que conecta el C2 de la guanina al oxígeno de la citosina, que es receptor el puente.

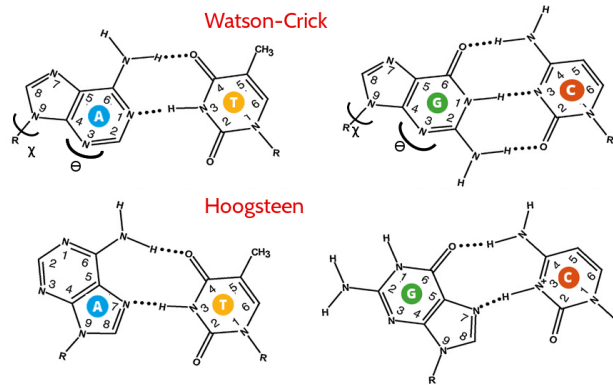


Figura 5: Estructura geométrica de los pares de bases. Pares de bases de Watson-Crick y Hoogsteen. Los pares de WC señalan dos ángulos de rotación, χ y θ , que llevan a la estructura de Hoogsteen. El ángulo χ muestra la rotación que se debe hacer sobre el eje del enlace que conecta la base con el azúcar y θ el ángulo sobre el plano inicial en que se encontraba la base WC.

La estructura del ADN se conserva gracias a sus interacciones no covalentes. La unión entre pares de bases por enlaces de hidrógeno y la fuerza provocada por el apilamiento son las interacciones más destacadas que le dan estabilidad a la estructura de hélice. Otra fuerza importante que también estabiliza la doble hélice se debe a los enlaces de hidrógeno que forma el ADN con el solvente. Las nucleobases son hidrofóbicas, favoreciendo la estructura que las mantiene aisladas, mientras que el esqueleto es hidrofílico. Para este trabajo es fundamental conocer estas interacciones para comprender el proceso propuesto de replicación no enzimática que se detalló en el [Capítulo 3](#).

2.2 FUERZAS QUE ESTABILIZAN EL ADN

La estabilidad de la estructura de la hélice del ADN depende de los enlaces de hidrógeno entre pares de bases y las fuerzas de apilamiento entre bases adyacentes. Estas dos fuerzas son equiparables dependiendo de la secuencia y longitud del ADN. Si estas fuerzas no covalentes son quebrantadas lo suficiente, la estructura de doble hélice se perderá y las cadenas dobles se separarán. A la separación de las dos cadenas sencillas que formaban la doble hélice se le conoce como desnaturalización. Esta ocurre a temperaturas altas o por cambios en el pH. La desnaturalización es el primer paso para poder

replicar el ADN, tanto en el proceso propuesto UVTAR como en la actualidad dentro de las células.

Las interacciones del ADN con el solvente estarán descritas por la dinámica molecular en los dos apéndices.

2.2.1 Enlaces de hidrógeno

Se les llama puentes de hidrógeno o enlaces de hidrógeno a la fuerza electrostática¹ entre un átomo electronegativo (Y), y un átomo de hidrógeno que comparte su único electrón de manera covalente con otro átomo electronegativo (X), con la forma $X - H \cdots Y$. El hidrógeno *desnudo*, ligeramente positivo, provoca esta atracción electrostática. Para el ADN existen dos tipos de enlaces de hidrógeno: $N - H \cdots N$ y $N - H \cdots O$.

Los enlaces de hidrógeno entrelazan dos estructuras primarias de ADN, con tres enlaces para el par G-C y dos para el par A-T, Figura 2. A pesar de que los enlaces de hidrógeno son débiles, contribuyen a la estabilidad de la doble hélice o la estructura secundaria del ADN. La energía de los enlaces de hidrógeno para los pares de bases son:

$$E_{A-T} = 7.00 \text{Kcal/mol} (0.30 \text{eV}) \quad (1)$$

$$E_{G-C} = 16.79 \text{Kcal/mol} (0.73 \text{eV}) \quad (2)$$

La energía de un enlace covalente es en promedio 20 veces mayor a los enlaces de hidrógeno.

2.2.2 Fuerzas de apilamiento

Las fuerzas de apilamiento o interacciones de apilamiento del ADN/ARN son aquellas que tienen mayor contribución a la estabilidad de su estructura. Como su nombre lo dice, permite que el apilamiento de bases nucleicas mantenga una separación entre base y base. Estas fuerzas son el conjunto de interacciones dipolares, interacciones π y, en soluciones acuosas, fuerzas hidrofóbicas, además de fuerzas de van der Waals como la fuerza de dispersión de London.

Los enlaces π juegan un papel muy importante en la excitación del ADN en el rango UV-C, como lo veremos en el Capítulo 5. Estos enlaces se presentan cuando dos lóbulos orbitales p se solapan, o mejor dicho, comparten sus electrones, haciéndose covalentes. Mientras que la dispersión de London es

¹ La interacción de los enlaces de hidrógeno es $\sim 80\%$ electrostática, cálculos químico-cuánticos demuestran que hay tres tipos de fuerzas involucradas: dispersión, polarización y la fuerza electrostática [21].

la fuerza electrostática entre dipolos instantáneos de moléculas polares. Por ejemplo, el hidrógeno al tener un enlace covalente es ligeramente positivo, ya que restringe la superficie electrónica haciendo un dipolo instantáneo.

DÍMERO DE ADN	ENERGÍA DE APILAMIENTO Kcal · mol ⁻¹ (eV)	ENTALPÍA ΔH Kcal · mol ⁻¹ (eV)	ENTROPÍA ΔS cal · mol ⁻¹ K ⁻¹ (eV · K)
C-G G-C	ε ₁ = 14.59 (0.63)	-10.6 (-0.46)	-27.2 (-1.18X10 ⁻³)
C-G T-A A-T G-C	ε ₂ , ε ₃ = 10.51 (0.46)	-8.5 (-0.37)	-22.7 (-0.99X10 ⁻³)
C-G A-T T-A G-C	ε ₄ , ε ₅ = 9.81 (0.43)	-7.8 (-0.34)	-21.0 (-0.91X10 ⁻³)
G-C C-G	ε ₆ = 9.69 (0.42)	-9.8 (-0.43)	-24.4 (-1.06X10 ⁻³)
G-C C-G G-C C-G	ε ₇ , ε ₈ = 8.26(0.36)	-8.0 (-0.35)	-19.9 (-0.86X10 ⁻³)
T-A A-T	ε ₉ = 6.57 (0.29)	-7.2 (-0.31)	-21.3 (-0.92X10 ⁻³)
G-C A-T T-A C-G	ε ₁₀ , ε ₁₁ = 6.57 (0.29)	-8.4 (-0.36)	-22.4 (-0.97X10 ⁻³)
G-C T-A A-T C-G	ε ₁₂ , ε ₁₃ = 6.78 (0.29)	-8.2 (-0.36)	-22.2 (-0.96X10 ⁻³)
A-T T-A A-T T-A	ε ₁₄ , ε ₁₅ = 5.37(0.23)	-7.9 (-0.34)	-22.2(-0.96X10 ⁻³)
A-T T-A	ε ₁₆ = 3.82 (0.17)	-7.2(-0.31)	-20.4(-0.86X10 ⁻³)

Cuadro 1: Energía, entalpía y entropía de apilamiento [22, 23]

Las interacciones de apilamiento dependen de la secuencia de las bases. A partir de la [Tabla 1](#) podemos concluir que los enlaces G-C hacen mucho más estable a la cadena de nucleótidos. Entre mayor concentración de enlaces A-T la cadena de ADN será menos estable. Al igual que los enlaces de hidrógeno estas interacciones son más débiles que los enlaces covalentes.

La fuerzas de apilamiento y los enlaces de hidrógeno pueden ser perturbados por calor, agentes químicos (como el pH del solvente) y por energía cedida a las moléculas. En la siguiente sección veremos cómo por calor estas fuerzas son perturbadas lo suficiente a un temperatura crítica hasta desnaturar el ADN. En el [Capítulo 3](#) veremos que la luz UV-C perturba estas fuerzas que estabilizan al ADN hasta desnaturarlo con un sentido termo-

dinámico, el de disipar eficientemente el potencial fotónico, ya que si el ADN está desnaturalizado disipa mejor la energía que cede la luz UV-C. En particular en las condiciones arqueas, este efecto permitió la emergencia de la replicación del ADN, empezando por la desnaturalización.

2.3 DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DEL ADN

La desnaturalización del ADN puede darse de forma total o parcial en una doble hélice. Por lo general, el ADN de cualquier ser vivo se desnaturaliza completamente a temperaturas por encima de los 90°C. Esta separación de los enlaces de hidrógeno depende de las propiedades del solvente, como pH y salinidad. La desnaturalización parcial pueden ser aperturas en los extremos o burbujas a lo largo de la cadena. Estas rupturas están relacionadas con la secuencia, como ya vimos, las fuerzas estabilizadoras varían según el par de bases y/o las bases adyacentes. Existe una temperatura crítica en la cuál la mitad de los enlaces de hidrógeno que componen una cadena de ADN se han separado. A esta temperatura se le conoce como temperatura de desnaturalización, que depende de la longitud y secuencia de la cadena.

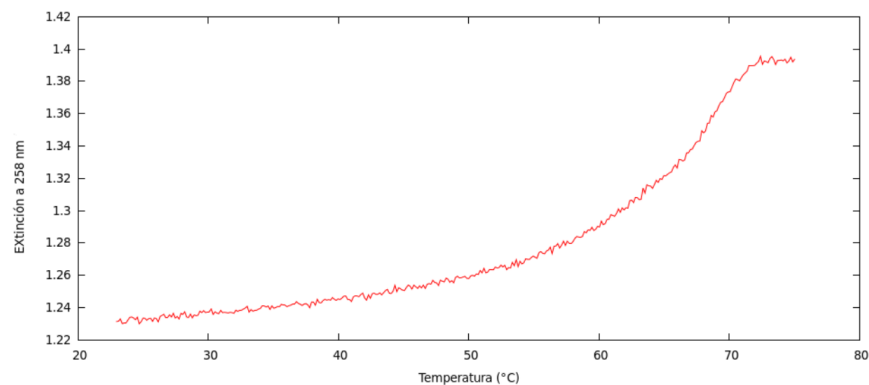


Figura 6: Curva de desnaturalización experimental del ADN de 25 pares de bases. La temperatura de desnaturalización es de 68°C. Crédito de imagen: Santillan (2015) [11].

La desnaturalización por calor es un proceso bien conocido que se puede observar de forma experimental. En la Figura 6 se observa una curva de desnaturalización por extinción de luz UV-C al subir la temperatura. La muestra de ADN se colocó en un búfer estándar con pH de 7.3, con una salinidad de 0.3 veces la de los mares actuales. La muestra de ADN sintético tiene la secuencia de nucleótidos [ver Figura 1] [11],



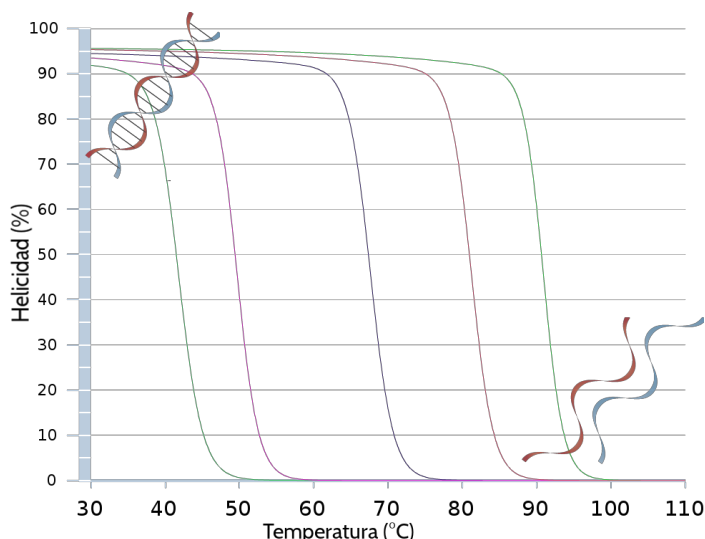


Figura 7: Curva de desnaturalización teórica del ADN de 25 pares de bases. La gráfica muestra la curva de desnaturalización para el ADN de la ?? (curva central) que se usa en el análisis de transferencia de energía de este trabajo y es comparada, con cadenas de la misma longitud con secuencias repetidas. La primera línea de izquierda a derecha muestra una cadena de repeticiones de adenina y timina ($d(ATATA)_5 \cdot d(TATAT)_5$) con una temperatura de desnaturalización de 41.5°C . La segunda es una secuencia de adeninas ($d(A)_{25} \cdot d(T)_{25}$) con una temperatura de desnaturalización de 49.5°C . Mientras que la línea central es la cadena que se diseñó para probar UVTAR con una temperatura de desnaturalización de 67.5°C . Para la secuencia de citosinas ($d(C)_{25} \cdot d(G)_{25}$) la temperatura de desnaturalización fue de 81°C . Por último para la cadena de guanina y citosina ($d(GCGCG)_5 \cdot d(CGCGC)_5$) la desnaturalización se da a los 91°C . Se usó una plataforma para calcular las curvas de desnaturalización con diferentes aproximaciones [24].

para calcular su curva de desnaturalización, la muestra se puso a una temperatura inicial, se le incidió luz UV-C y se midió la extinción de esta. Se fue subiendo la temperatura y se tomaba otra medición de la extinción de luz UV-C por cada intervalo de temperatura. El ADN al estar desnaturalizado absorbe mayor cantidad de luz UV-C, por lo que al estar completamente desnaturalizado absorberá de forma máxima y de esta manera se puede saber cuando el 100 % de la muestra está desnaturalizada.

Por otra parte, las curvas de desnaturalización por temperatura pueden ser obtenidas teóricamente [23, 25, 26]. La Figura 7 tiene las curvas de desnaturalización calculadas por una aplicación de internet [24] que está creada para predecir las curvas de desnaturalización por diferentes cálculos teóricos [23, 25, 26].

Las dos últimas columnas de la Tabla 1 muestran las entalpías y entropías para los 10 vecinos cercanos de los pares de bases del ADN que contienen las contribuciones de las interacciones de apilamiento, los enlaces de hidrógeno y otras interacciones de Van der Waals. Estos modelos asumen que la estabilidad termodinámica del ADN de un par de bases depende de su identidad

y orientación de los nucleótidos involucrados. El factor de estabilidad para una cadena doble esta dado por,

$$f = \exp \left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{k_B T} \right) \quad (4)$$

T es la temperatura absoluta y k_B es la constante de Boltzmann y donde la energía libre es $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Este modelo, llamado el par de base vecino más cercano, predice la helicidad y la curva de desnaturalización del ADN, ayudado de cálculos químico-cuánticos y experimentos, que tienen variaciones según el solvente.

En la [Figura 7](#) se hace la comparación de las curvas de desnaturalización de la cadena que se usó para hacer el cálculo experimental de la [Figura 6](#), con las curvas de desnaturalización de distintas secuencias de nucleótidos de la misma longitud.

Las simulaciones presentadas en este trabajo usan la misma cadena de ADN de la ??, ya que esta cadena se usó para demostrar el proceso de desnaturalización reversible por luz UV-C que apoya el proceso propuesto de replicación asistida por calor y luz UV-C, expuesto en el [Capítulo 3](#).

REPLICACIÓN ASISTIDA POR CALOR Y LUZ ULTRAVIOLETA

El objetivo fundamental de este trabajo es analizar la transferencia de energía de excitación debida a la absorción de un fotón en el UV-C en el ADN para provocar su desnaturalización, el primer paso para su replicación. Nos hemos basado en la *teoría termodinámica disipativa del origen y evolución de la vida* que propone la emergencia de la replicación de ADN y ARN como un proceso disipativo 'auto-organizado' [12, 27]. Este proceso cíclico se asiste por el calor de los océanos ($\sim 85^{\circ}\text{C}$, [28-30]) y de la energía libre que proporciona la luz UV-C ($\sim 5.5\text{W}/\text{m}^2$ al medio día or el Ecuador, [31]), abundante durante el *Arqueano*. En este capítulo, presentamos los detalles de esta llamativa propuesta para la replicación no enzimática del ADN y ARN como consecuencia de su capacidad para disipar luz UV-C.

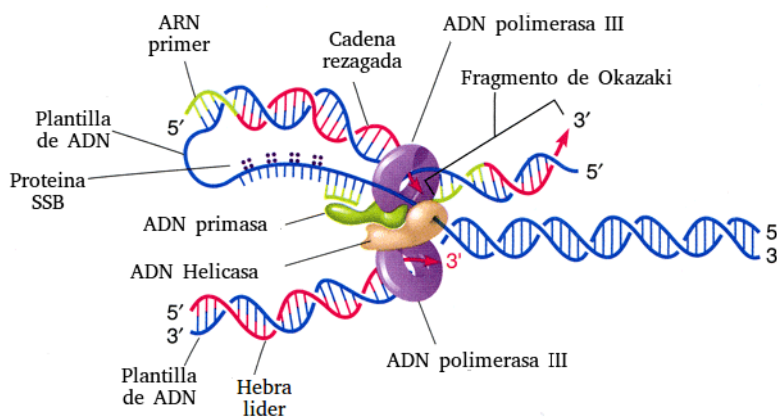


Figura 8: Replicación del ADN en las células hoy en día.

La helicasa, o tenedor, rompe los puentes de hidrógeno de la doble hélice del ADN, abriendo las dos hebras o cadenas antiparalelas, permitiendo el avance de la horquilla de replicación. La topoisomerasa relaja la tensión provocada por el superenrollamiento del ADN al abrirse las dos hebras (no aparece en la imagen). Las proteínas SSB estabilizan las cadenas plantilla u originales manteniéndolas separadas. El fragmento *primer* o cebador de ARN, creados por el ADN primasa, se unen a la cadena plantilla por puentes de hidrógeno para que la ADN polimerasa III reconozca dónde debe unirse para empezar a añadir nucleótidos. La ADN polimerasa III sintetiza la cadena complementaria de forma continua en la hebra líder y de forma discontinua en la cadena rezagada, ya que solo puede sintetizar en dirección $5' \rightarrow 3'$. La ADN polimerasa I reemplaza los cebadores de ARN por nucleótidos de ADN. La ARN primasa sintetiza el cebador de ARN necesario para la síntesis de la cadena complementaria a la cadena rezagada. La ADN ligasa une los fragmentos de Okazaki. Crédito de imagen: Desconocido (2015)[32].

La replicación del ADN y ARN es un proceso crucial para la proliferación de cualquier organismo. Las instrucciones para formar cada parte y los mecanismos que se realizan en el interior de un ser vivo (y los virus) están codificadas en estas cadenas de nucleótidos en cada una de sus células (ó

cápsidas). Hoy en día, las células replican su información genética mediante máquinas moleculares llamadas enzimas, formadas por proteínas [Figura 8]. Estas enzimas, en el principio de la vida, no pudieron haber existido debido a su complejidad. Por ello, es necesario proponer un mecanismo primitivo que surja a partir de las condiciones en donde se originó la vida, asegurando que el mecanismo propuesto se puede asociar con la disipación y así dando una razón termodinámica para el surgimiento de la vida.

3.1 CONDICIONES EN LAS QUE SE ORIGINÓ LA VIDA

La vida se originó hace aproximadamente 3.85Ga [33, 34] durante el *Aqueano* (hace 4-2.5 mil millones de años). La atmósfera de la Tierra y la radiación del sol joven eran distintas a las contemporáneas. El sol, que tiene unos 4.5 mil millones de años, es una estrella enana amarilla que produce una radiación parecida a un cuerpo negro con una temperatura de 5779 K; sin embargo, en el *Arqueano*, el sol irradiaba de 5 a 80 veces más intensamente en los rangos de rayos X y ultravioleta extremo (1-1200 Å) [35] y entre 25 y 30 % menos intenso en el rango visible. Nuestra estrella era más fría con una temperatura de 5680 K. También tenía un radio 11 % menor al actual, por lo que era menor la superficie que podía irradiar, implicando que la luz solar era 15 % menos intensa en el rango UV (176-300 nm) que es el de nuestro interés.

La radiación recibida por la superficie de la Tierra en el periodo donde se originó la vida era menor a la actual, por lo que se podría pensar que era glacial. Sin embargo, es bien sabido que había agua líquida a $\sim 85^{\circ}\text{C}$ [28-30]. Esta paradoja llamada del sol joven y débil fue planteada por Carl Sagan y George Mullen, en 1972 [36]. No obstante, la radiación que llega a la superficie depende de dos variables principales: el tipo de emisión del sol y la extinción a través de la absorción y dispersión de la atmósfera temprana. Para dar explicación a la paradoja, se propuso que la atmósfera debiera provocar un efecto invernadero en la Tierra. Se modeló experimentalmente la atmósfera temprana [37], basándose principalmente en variar las concentraciones de CO_2 para justificar la existencia de agua líquida en la superficie.

Estudios recientes calculan un espectro aproximado del sol en la superficie de la Tierra dependiendo de la atmósfera de cada periodo geológico [31] [ver Figura 9]. Los cálculos hechos al medio día sobre el Ecuador, muestran que la Tierra recibía una energía de fotones con energías de entre 230 y 290 nm con un pico centrado en 260 nm, con 5.5 W/m^2 integrado sobre este rango. Esto es de nuestro especial interés ya que muchas de las moléculas fundamentales para la vida incluyendo el *ARN* y *ADN* absorben en estos rangos. La atmósfera de la Tierra primitiva, no permitía la entrada a la luz UV por debajo de los 230 nm debido a la absorción de estas longitudes por CO_2 y N_2 de la antigua atmósfera; tampoco permitía la penetración de entre 290 y 320 nm debido a la absorción de los formaldehídos y los acetaldehídos que

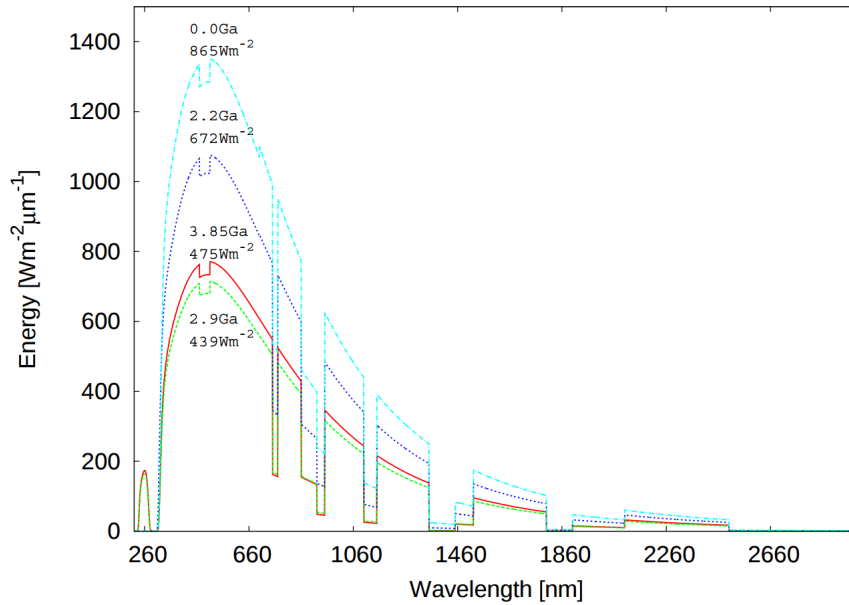


Figura 9: Cálculo del espectro solar en la superficie de la Tierra a través del tiempo, desde hace 2.9 Ga hasta el tiempo contemporáneo 0.0 Ga. Nótese el pico pequeño del lado derecho centrado en 260 nm. Se ha propuesto que la vida surge a partir de la disipación de esta porción de la gráfica. Ver texto. La gráfica se obtuvo usando el modelo evolutivo solar estándar y utilizando los mejores datos disponibles para los gases atmosféricos, sus densidades y la temperatura de la superficie terrestre. Crédito de imagen: Michaelian y Simenov (2015) [31].

son resultado de las reacciones fotoquímicas de la luz **UV-C** sobre H_2S y CO_2 [36].

La luz **UV-C** que tocaba la superficie terrestre siempre estuvo en los rangos de 200-300 nm con un pico aproximado en los 260 nm, con una razón de la irradiancia superficial del Arqueano a la de hoy en día de $\sim 10^{31}$ veces más radiante. Actualmente, la vida produce oxígeno gaseoso O_2 y este a su vez al separarse en la atmósfera se junta con otras moléculas de oxígeno gaseoso con ayuda de la luz **UV-C** para formar ozono, O_3 . El ozono actúa como filtro impidiendo el paso a la radiación ultravioleta. El ozono y O_2 son producto de la fotosíntesis, por lo que en el Arqueano no pudieron haber existido en abundancia en la atmósfera, además de que las moléculas de oxígeno simple son muy reactivas.

Lo anterior indica que la *sopa prebiótica* estaba muy expuesta a los rayos ultravioleta cuya distribución espectral tenía su máximo en los 260 nm, justo donde la mayoría de las moléculas fundamentales incluyendo el **ADN** y **ARN** absorben [Ver Figura 10] y disipan fuertemente. Esto no es una coincidencia desde un punto de vista termodinámico, es la evidencia contundente de que la vida y la luz **UV-C** que llegaba a la superficie terrestre Arqueana están fuertemente ligadas. La luz ultravioleta proporcionaba la energía libre ne-

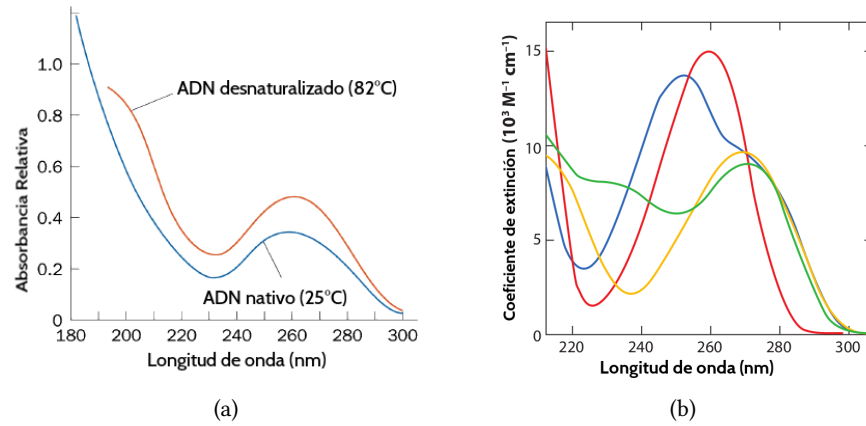


Figura 10: Absorción de Luz UV-C del ADN y extinción de los nucleótidos. a) Absorción de luz UV-C del ADN de doble hélice y de cadena sencilla. La fuerza de apilamiento en la cadena doble reduce la absorción de UV-C disminuyendo la eficacia de disipación de la luz absorbida, por el efecto sombra. Al aumento de absorción por desnaturalización se le conoce como hiper Cromicidad. Crédito de imagen: Anthony S. Serianni (2005) [38]. b) Extinción de luz UV-C de los nucleótidos. Adenina (rojo), Guanina (azúl), Timina (amarillo) y Citosina (verde) [39].

cesaria para que las moléculas orgánicas se estructuraran y auto-organizaran para disipar esta luz dando origen a la vida, al igual que un gradiente de temperatura organiza la materia como en las celdas de Bernard.

La vida, siendo un proceso disipativo, tiene más probabilidades de haberse originado en la superficie del mar, dada la penetración de la luz UV-C [Ver Figura 11] [40], las moléculas tendrían más energía libre en esta capa. Otro punto a favor es la gran variedad y acumulación de partículas orgánicas se encuentran en una microcapa superior (150 μm) de la superficie del mar. Actualmente viven una cantidad enorme de moléculas orgánicas en esta microcapa como lípidos, aminoácidos [41], proteínas, ADN, ARN, bacterias y virus, con concentraciones entre 10^2 y 10^4 veces más grandes que tan solo un poco más abajo que esta capa [42].

Finalmente, la temperatura de la superficie terrestre hace 3.85 Ga era aproximadamente de 85°C [28-30]. Esto se sabe debido a que la proporción de isótopos de ^{16}O y ^{18}O en el hielo y los nucleos del mar profundo, depende de la temperatura. Esta alta temperatura es consecuencia del efecto invernadero provocado por el metano y el dióxido de carbono que había entonces en la atmósfera. Actualmente, la microcapa de los océanos tiene un ciclo diario de temperatura, como seguramente lo tuvo en el Arqueano, de $3 - 5^\circ\text{C}$ debido al día y la noche. Estos detalles ayudarán a explicar la reacción fotoautocatalítica del ADN para replicarse.

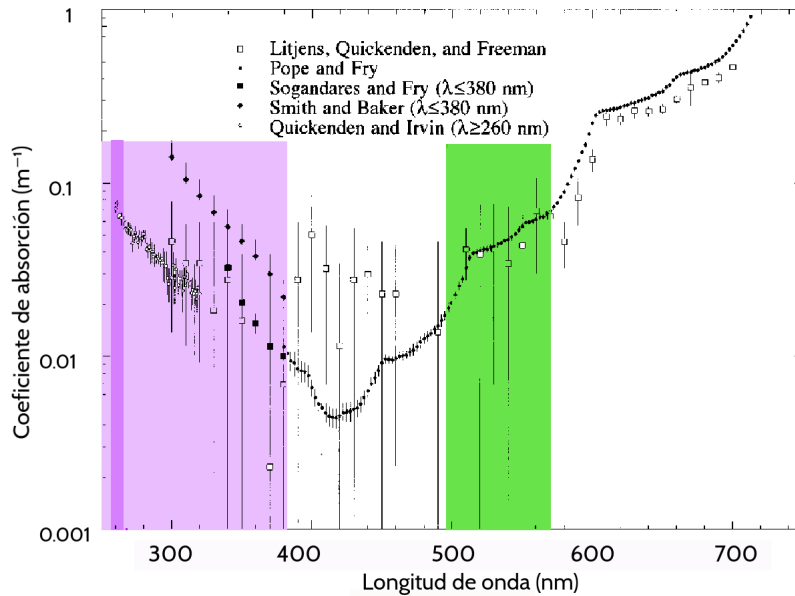


Figura 11: Absorción de luz en el agua. Medición del coeficiente de absorción de agua pura en función de la longitud de onda. Cada caso con las barras de error señaladas por los respectivos autores. El agua es prácticamente transparente a la luz visible. Por otro lado, la luz ultravioleta del rango C es absorbida por el agua $\sim 10\%$ penetrando $\sim 50\text{m}$. Crédito de imagen: Edward S. Fry (2000) [40].

3.2 LA EMERGENCIA DE LA REPLICACIÓN DEL ADN

3.2.1 Condiciones iniciales

En la actualidad, el ADN normalmente se encuentra en los seres vivos en forma de hélice de doble cadena. Para ser copiado y transcrito es necesario que esta se desnaturalice. Al desnaturalizarse, el ADN funge como plantilla para ser transcrito o copiado por enzimas. Estas enzimas usan nucleótidos que existen o que son sintetizados dentro de la célula para hacer la nueva cadena, leyendo la plantilla y añadiendo sus nucleótidos complementarios [ver Figura 8]. Estas enzimas tan complejas no pudieron estar presentes hace 3.85 Ga.

La emergencia de este proceso debe entonces de alguna manera cumplir con: 1) nucleótidos abundantes en la superficie del mar (una explicación a su síntesis); 2) un proceso de desnaturalización de una cadena de nucleótidos ya existente; 3) un agente(s) catalizador que permita su extensión.

(1) Miller había determinado que la concentración de adenina en el Arqueano era de $15\mu\text{M}$ basado en las tasas de producción fotoquímica [43]. Sin embargo, Miller excluye de su experimento las rutas autocatalíticas para la producción de ácidos nucleicos a partir de ácido cianhídrico (HCN) en agua expuesto a UV-C [44-46]. Se han estudiado rutas termodinámicas para la

proliferación de nucleótidos y moléculas primitivas basados en la disipación fotónica [47], de las cuales se puede concluir que el cálculo de Miller fue muy conservador, ya que este número pudo haber aumentado constantemente. Podemos presumir entonces, de una sopa primitiva con nucleótidos estructurados por disipación luz UV-C de la molécula primordial HCN, estudiada primero por Ferris y Orgel (1966) [48].

(2) El ADN se desnatura por calor, es decir, existe una temperatura crítica en la cual la mitad de los pares de bases que conforman una cadena doble de ADN se han separado. Esta separación se da por el rompimiento de los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases. La temperatura de desnaturación del ADN varía según su longitud y secuencia [ver Sección 2.3].

Los océanos prebióticos se encontraban a 85°C en el Ecuador [28-30], variando su temperatura dependiendo de la ubicación geográfica. Esta alta temperatura está dentro de los rangos de desnaturación de una cadena doble de ADN, como las que se encuentran en los seres vivos, mientras que el ARN se desnatura por los 40 – 50°C. Suponemos, por la extensión de los océanos y posibles variaciones de clima, que tendremos una gama de temperaturas que van desde las temperaturas de desnaturación del ARN (40°C) y hasta las del ADN (85°C).

Añadido al calor suministrado al ADN por su entorno, no siempre suficiente para desnaturar al ADN, la luz UV-C juega un papel fundamental en completar la desnaturación (como describiremos a lo largo de la tesis) y en activar los nucleótidos para formar nuevos enlaces con la energía libre de esta activación o excitación [11, 12, 27].

(3) Uno de los agentes catalizadores de los nucleótidos es la luz UV-C, que al interactuar con ellos les permite ganar energía libre para después formar nuevos enlaces. Por otra parte, iones divalentes como Mg^{2+} y Zn^{2+} pudieron jugar el papel de polimerasas promoviendo la replicación [49].

3.2.2 Esquema general de UVTAR

La replicación asistida por calor y luz ultravioleta del ADN es un ciclo circadiano caracterizado por tres etapas importantes que se pudieron dar durante la mañana, tarde y noche [ver Figura 12]. Durante la mañana, el ADN se encontraba en doble hélice estable o con pequeñas burbujas de desnaturación, consecuencia del calor proporcionado por los océanos. Ya en la tarde, cuando la temperatura de los océanos subía, el ADN alcanzaba una mayor desnaturación, añadido a que comenzaba a tener interacción con la abundante luz UV-C que pasaba a través de aquella atmósfera arqueana ($5.5W/m^2$ al medio día en el Ecuador, [31]).

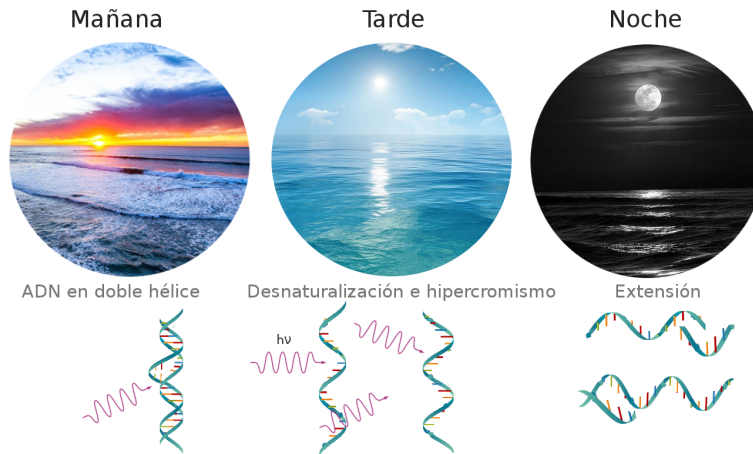


Figura 12: Replicación asistida por calor y luz ultravioleta. Basada en la imagen de: Michaelian (2016)[27].

Esta interacción con el potencial fotónico solar Arqueano lleva a la molécula de ADN a ocupar orbitales electrónicos que no la ionizan, pero el exceso de energía se suma a su energía libre que luego le permitiría replicarse. Esta energía libre pudo romper con los enlaces de hidrógeno que unen las cadenas simples de ADN, finalizando la desnaturalización comenzada por el calor de los océanos. Recordemos que los enlaces de hidrógeno están ligados a la fuerza de apilamiento y al enrollamiento de la cadena, por lo que interacción de la luz UV-C debió perturbar el conjunto de fuerzas que estabilizan el ADN. El proceso de desactivación que puede conducir a la ruptura de los enlaces de hidrógeno será descrito teóricamente en el Capítulo 5 así como otras posibles rutas de desactivación.

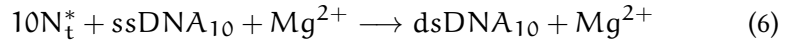
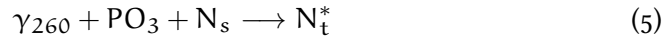
Después de la desnaturalización, las cadenas que antes formaban la doble hélice, flotaban en la capa superficial del océano, a su vez distanciándose una de la otra por el oleaje. Las cadenas sencillas de ADN son hipercrómicas, lo que significa que absorben más luz UV-C que cuando están en doble hélice. Este hecho hace de UVTAR un proceso eficiente para disipar más el potencial solar disponible durante la tarde, y da la razón termodinámica de este proceso emergente “auto-organizado” que se repitió hasta que la atmósfera lo permitió.

Estas cadenas simples pudieron permanecer activas, mismas que al atraerse químicamente con sus compatibles cercanos servían como plantilla para hacer una nueva copia, formando los enlaces correspondientes con la energía de activación que aún no habían disipado. Otra posibilidad es que mononucleótidos y oligos de distintos tamaños que contaban con energía libre adquirida por la interacción con la luz UV-C, pudieron embonar con la cadena plantilla que le permitieron elongarse y/o duplicarse durante la noche [ver Capítulo 2 para estructura].

Durante la noche, al ya no haber una energía impuesta como la del sol y al bajar la temperatura de los océanos, mononucleótidos, oligos y cadenas plantilla se juntaban por procesos difusivos y estereoquímicos para formar cadenas dobles. Los nuevos enlaces se formaban disipando o usando la energía ganada como cadena simple o nucleótidos solos durante la tarde, estabilizados por Mg^{2+} [49], reestructurando las nuevas cadenas dobles. La diferencia de temperatura de $3 - 5^\circ C$ ayudó a que las cadenas de ADN se juntaran con pedazos complementarios debido a que representa una parte sustancial de una curva de desnaturalización que ya no afectaría la estructura del ADN permitiendo recuperar las fuerzas de apilamiento (hay un proceso inverso en la desnaturalización por temperatura [ver Sección 2.3]).

3.2.3 UVTAR como reacción autocatalítica

Hablando en términos fotoquímicos, Michaelian propone la siguiente reacción química foto-autocatalítica para la replicación del ADN [27],



primero, un fotón γ_{260} se absorbe por un nucleósido en la vecindad del fosfato PO_3 , este es parte del esqueleto de las cadenas de nucleótidos. Esta reacción producirá un nucleótido activo N_t^* Ecuación 5. Este nucleótido puede usar esa energía libre para formar nuevos enlaces. Por ejemplo, la Ecuación 6 expone 10 nucleótidos (separados) activos, $10N_t^*$, que harán interacción con una cadena simple de 10 nucleótidos contiguos y complementarios a los 10 activos, $ssDNA_{10}$, que funcionará como plantilla, estabilizados por el Mg^{+2} [49]. Los 10 nucleótidos activos formarán los enlaces fosfodiéster y puentes de hidrógeno para estructurar una cadena doble de ADN inactiva, $dsDNA_{10}$.

Buscar las rutas de relajación que nos permitan describir el rompimiento de enlaces de hidrógeno para desnaturalizar el ADN es nuestro principal objetivo. Una de nuestras hipótesis está ilustrada en la Ecuación 7. Queremos saber si un fotón de 260 nm es suficiente para perturbar el ADN lo necesario para desnaturalizarlo a una temperatura cercana a la de desnaturalización.

La reacción en una jornada completa se reduce a lo siguiente. Durante la noche, tenemos 10 nucleótidos activos que embonan con un segmento de cadena simple de 10 nucleótidos de ADN ($ssDNA_{10}$) y, con ayuda de iones de Mg^{2+} que estabilizan y localizan a las bases, se encontrarán en un proceso difusivo sesgado por la atracción química hasta formar una cadena doble de ADN ($dsDNA_{10}$). Esta cadena doble será separada con mayor probabilidad

durante la tarde ya que la superficie de los océanos es más caliente. La separación se dará por el flujo de fotones de 260 nm, obteniendo así dos cadenas simples de ADN para comenzar el ciclo. Obteniendo como reacción final,



Las reacciones anteriores son debidas a la deposición energética de la luz solar Arqueana misma que genera nuevos grados de libertad en el sistema, que a su vez aumenta las configuraciones de la distribución de las cantidades conservadas, o más simple, aumenta la entropía de manera eficiente. Esta última reacción corresponde a una reacción foto-autocatalítica simple: $A + B \rightleftharpoons 2B$ con $A = 11\gamma_{260} + 10\text{PO}_3 + 10\text{N}_s$ y $B = \text{ssDNA}_{10}$. B actúa como catalítico para la conversión de A a B ya que es una plantilla para producir la cadena complementaria. Este proceso ha sido detallado por Michaelian [27].

3.2.4 El experimento, desnaturalización reversible

Los experimentos llevados a cabo por Michaelian y Santillán (2014) [11] confirmaron que la luz UV-C desnaturaliza el ADN de manera reversible. Se encontró que mientras la luz UV-C estaba brillando sobre el ADN, había un aumento en la extinción, medida por un espectrómetro (véase Figura 13). Esto se interpretó como un aumento en la hipercromicidad (aumento en la extinción cuando las cadenas dobles se desnaturalizan). A pesar de que puede ocurrir dispersión de Rayleigh (>350 nm) y Mie (~ 200 a 350 nm) en el rango ultravioleta, la absorción en el Arqueano estaba confinada a las longitudes de onda por debajo de los 290 nm [31]. Aunado a esto, para cadenas cortas el aumento en la dispersión es interpretada como un indicador de desnaturalización ya que cada cadena doble o simple cuenta como centro de dispersión, esto se refleja en un aumento en el hipercromismo [11].

En la Figura 10a se ve la extinción del ADN en cadena doble (línea azul) y simple (línea roja) observando el efecto hipercrómico, al igual que en la Figura 14a para el ADN de 25 pares de bases cuando esta naturalizado (línea verde) y desnaturalizado (línea roja) por la larga exposición de luz UV-C a temperatura fija (65°C), concluyendo que la radiación es la que induce la desnaturalización.

Para comprobar que hay desnaturalización inducida por luz UV-C, idearon la comparación de este efecto, señalado como hipercrómico, obtenido por luz UV-C a temperatura fija con el efecto hipercrómico visto en la desnaturalización por elevación de temperatura. Obtuvieron los espectros de extinción al subir la temperatura en intervalos de tres grados. La diferencia de los espectros entre los intervalos adyacentes se observa en la Figura 14b. También restaron los espectros del efecto hipercrómico por luz UV-C tomando la diferencia cuando el ADN se encuentra a 65°C y después de ~ 40 min de ser irradiado por luz UV-C a la misma temperatura Figura 14a (línea rosa). Estas

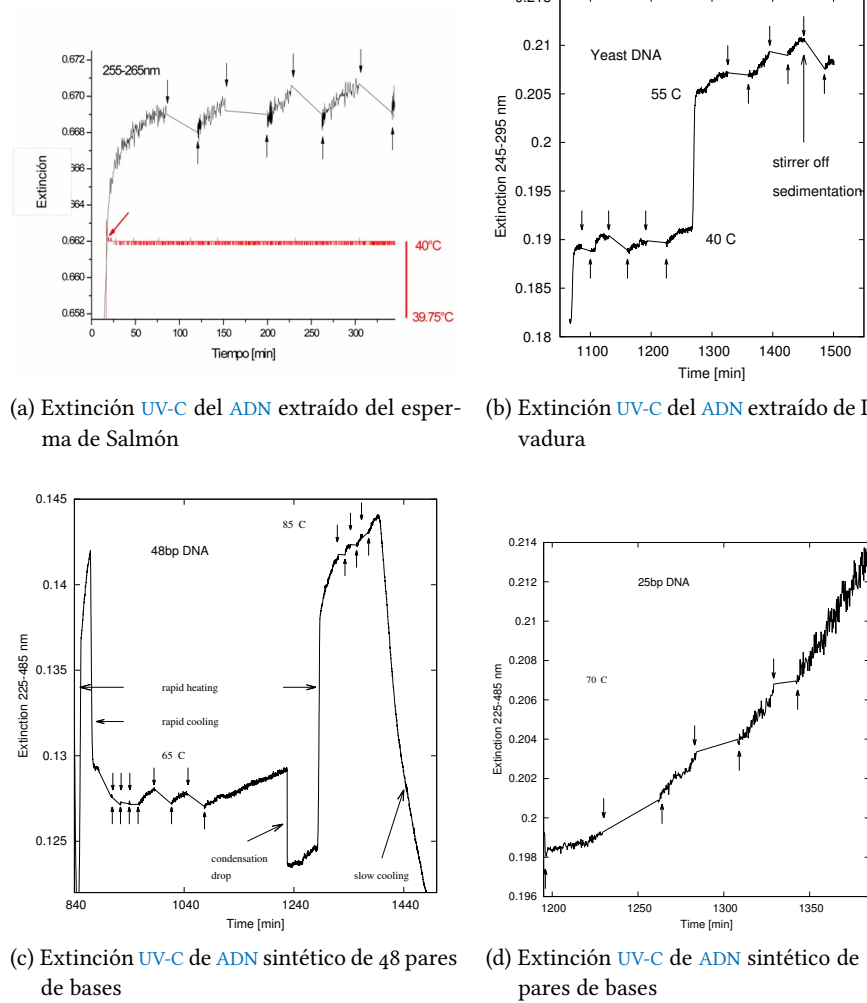
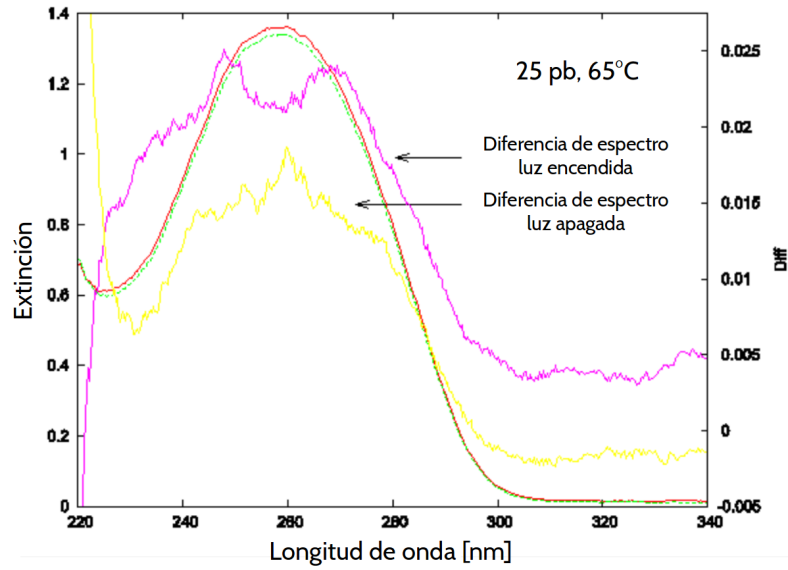


Figura 13: Desnaturalización como aumento en la extinción de ADN por UV-C. Las gráficas de extinción en el tiempo muestran cómo el ADN en una solución acuosa irradiada por luz ultravioleta se desnaturaliza y renaturaliza al apagar la luz. (a) Este es el resultado de una muestra de ADN de Salmón irradiada por UV-C con una longitud de onda entre 255 y 265 nm. Las flechas hacia arriba indican cuándo la fuente se ha encendido y las que apuntan hacia abajo cuándo se apaga la fuente. La muestra se puso a una temperatura uniforme de 40°C (línea roja) y se comienza a tomar datos en el minuto 20 de este experimento. Se puede apreciar que cuando la luz irradia a la muestra de ADN, esta comienza a tener una mayor extinción (o mayor absorción y dispersión) de la luz ultravioleta así indicando que las cadenas se están desnaturalizando y cuando la luz se apaga se vuelven a renaturalizar mostrando un descenso en su absorción. (b) Este experimento es igual al anterior realizado en una muestra de levadura, a diferencia de que este tiene un aumento de temperatura rápido de 40°C a 55°C. Para evitar la sedimentación de la muestra y asegurar que la temperatura sea uniforme se utiliza un agitador magnético que es desactivado donde la flecha larga hacia arriba lo indica para mostrar que hay sedimentación. (c,d) Extinción para ADN sintético. Crédito de imagen: Michaelian y Santillán (2014) [11].

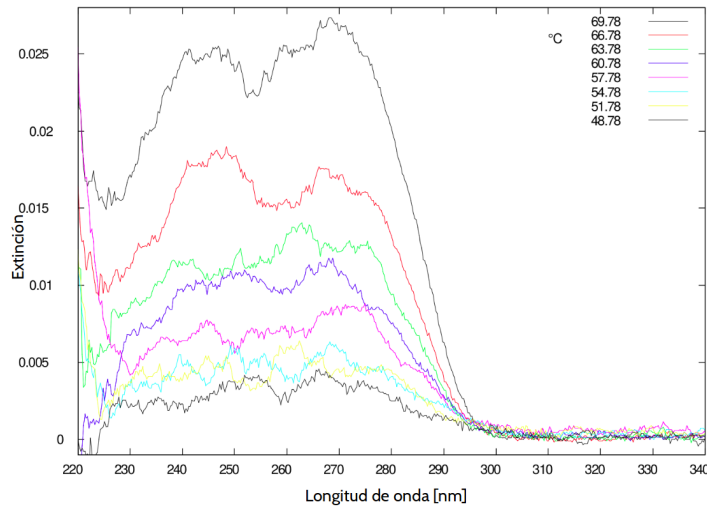
diferencias de espectros son de la misma cadena de ADN ya que estos son huella de la composición de las cadenas.

Como podemos observar, todas las diferencias de espectros muestran dos máximos similares, indicando que dejaron la misma huella, por tanto esta es la prueba que buscaban a la desnaturalización por luz UV-C. Además, si observamos la Figura 10b, coinciden con los máximos para guanina y citosina, lo cual tiene sentido si los pares que se rompen al final son los G-C. Esto es lo que sucede, ya que los enlaces G-C son más fuertes y la cadena analizada contiene más del 50 % de estos pares.

Esta teoría y experimento son los que motivaron este trabajo de tesis. Buscamos explicar cómo la energía de un haz de fotones ultravioleta absorbido por los nucleótidos de una cadena de ADN es capaz de desnaturalizar la doble hélice y transferir energía a lo largo de la cadena para romper los enlaces de hidrógeno.



(a) Hiper Cromicidad de 25 pb que ilustra la desnaturización por interacción de UV-C



(b) Desnaturización por temperatura, diferencia de espectros de extinción en intervalos de 3°C

Figura 14: Hiper Cromicidad en el ADN. a) Espectro de extinción para 25 pares de bases irradiado por UV-C. La línea verde es cuando se comienza a iluminar la muestra y la línea roja al final del periodo de iluminación (1/2 hora después de encender la luz). La hiper Cromicidad se debe a la desnaturización por UV-C. La diferencia en estos espectros cuando la luz está encendida es la línea rosa y cuando está apagada es la línea amarilla. El espectro de color rosa, con dos picos en 248.5 y 268.6 nm, es resultado de la hiper Cromicidad induciendo desnaturización en los pares G-C (ya que los pares A-T han sido desnaturizados), mientras que la línea amarilla traza un pico en los 260 nm. b) Diferencia de espectros por cambios de temperatura en intervalos de 3°C tomados al inicio y al final del intervalo mostrando picos que se relacionaron con los pares G-C. Crédito de imagen: Michaelian y Santillan (2014) [11, 27].

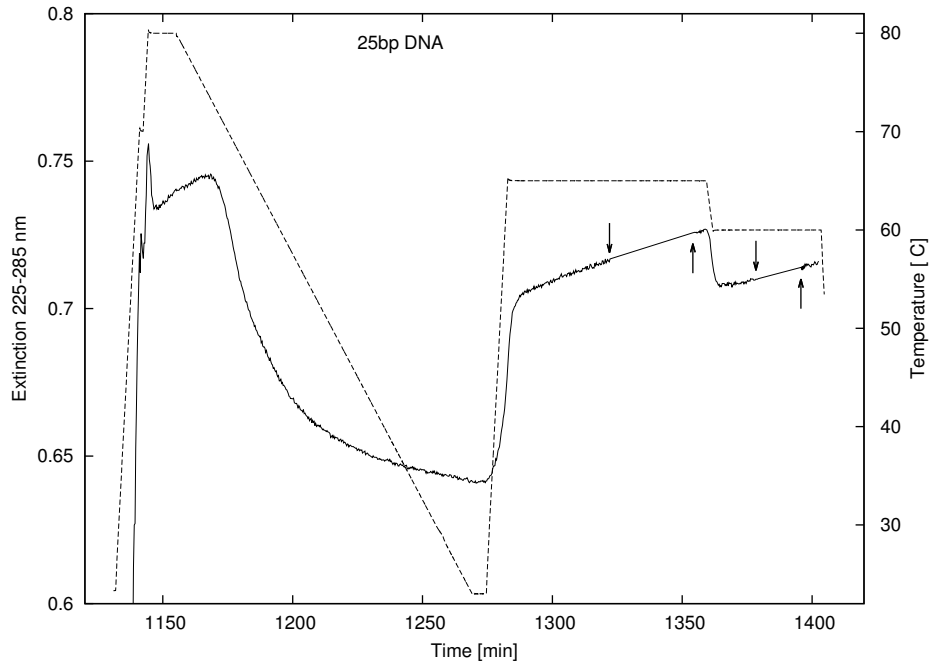


Figura 15: Extinción para ADN sintético de 25 pares de bases representado por la línea sólida y la línea punteada es el cambio en la temperatura, ambos en función del tiempo. Primero la temperatura es elevada hasta 80°C manteniéndola por media hora, donde podemos observar a partir de 1150 minutos un aumento en la extinción por lo que hay desnaturalización. Después descendieron la temperatura lentamente hasta llegar a casi los 20°C permitiéndonos ver cómo la extinción disminuía, lo que indica la renaturalización de la muestra de ADN. Se vuelve a elevar la temperatura hasta llegar a los 65°C manteniéndola así por un periodo mayor a una hora. Se apaga la luz, indicado por las flechas hacia abajo, y tiempo después se vuelve a encender, indicado por las flechas hacia arriba, señalando que sigue habiendo desnaturalización. Este crecimiento en la extinción es debido a la evaporación del solvente incrementando la concentración de ADN. Crédito de imagen: Michaelian y Santillan (2014) [11]

CÁLCULO GEOMÉTRICO DE LA DIFUSIÓN DE LA ENERGÍA DE UN FOTÓN UV-C EN EL ADN

La disipación de la energía de un fotón ultravioleta irradiado en ADN, como veremos en el siguiente capítulo, se puede dar de muchas maneras radiativas y no radiativas. Nos interesa principalmente qué pasa si esa energía se convierte en energía vibracional o energía que rompa con los enlaces de hidrógeno que mantienen unidos a los pares de bases. Si una de las bases de la hélice interactúa con un fotón de 260 nm (4.77 eV o 110 Kcal/mol) llevará a la molécula a un estado excitado $\pi\pi^*$ [50]. El exceso de energía que adquiere el nucleótido puede o no migrar a otro por transferencia, y mediante conversión interna bajar a un estado base caliente que permitirá transferir esa energía vibracional a lo largo de la cadena de doble hélice y su solvente.

Se puede hacer un cálculo aproximado para determinar cuántos pares de bases se pueden afectar por la energía de un fotón de 4.77 eV. Este cálculo consiste en encontrar el volumen de agua que se calienta 3°C por esa energía. Tres grados representan una región importante del dominio de la curva de desnaturalización del ADN, por lo que consideramos que habrá un aumento en la separación de sus cadenas. La ecuación de la termodinámica clásica dice que el cambio energético ΔE es igual a la masa m del sistema, por su capacidad calorífica volumétrica C_v , por el cambio en la temperatura ΔT del sistema,

$$\Delta E = mC_v\Delta T = \rho_m VC_v\Delta T \quad (9)$$

queremos encontrar cuál es el volumen V , que se calienta $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ si se deposita la energía correspondiente a un fotón en el UV-C, ΔE . La energía vibracional se repartirá a una temperatura de 65°C (25°C), donde la densidad experimental del agua resulta $\rho_m = 980\text{Kg}/\text{m}^3$ ($997\text{Kg}/\text{m}^3$) y su capacidad calorífica $C_v = 4.188\text{KJ}/\text{Kg} \cdot \text{K}$ ($4.180\text{KJ}/\text{Kg} \cdot \text{K}$). Recordemos que $1\text{eV} = 1.60222 \times 10^{-19}\text{J}$ para cambiar las unidades de la energía adquirida. Entonces, el volumen afectado por la energía equivalente a la de un fotón UV-C que cambia la temperatura 3°C es, $V = 6.21 \times 10^{-26}\text{m}^3$ ($V = 6.11 \times 10^{-26}\text{m}^3$).

Si el volumen es una esfera y el calor se distribuye uniformemente en dirección radial, entonces, el diámetro de la esfera equivale a unos 14 (15 para 25°C) pares de bases de longitud. La distancia entre pares de bases es de 3.4\AA . El diámetro de la esfera contiene el número máximo de enlaces entre pares de bases que pudieran ser rotos por la energía depositada que calienta un $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ correspondiente a un cambio grande en la curva de desnaturalización del ADN. Obviamente, este cálculo omite la dinámica de la difusión

de calor que será diferente para el ADN que para el agua. Además, considera que todos los enlaces de hidrógeno tienen un valor promedio, tal que es independiente de la secuencia, contrario al hecho de que el par A-T es menos fuerte que el G-C.

Podemos introducir la influencia de la conductividad térmica del ADN en el proceso. Suponemos que la densidad del ADN no contribuye a la del solvente, es decir, lo colocamos en abundante agua que funcionará como reservorio. Considerando el volumen de un elipsoide ($V = 4/3\pi abc$), que se asemeja más a la distribución de calor que pudiera tener, si un ADN está completamente estirado sobre el eje mayor y por simetría, decimos que los otros dos lados son iguales ($a=c$) [ver Figura 16].

Ahora, podemos poner una dependencia en los radios para la distribución de calor. La condición que pondremos es que los radios estén relacionados de tal manera que la conducción térmica sea establecida por el agua si se distribuye por el diámetro del ADN o por la conducción térmica del ADN si la energía pasa por el eje de él,

$$\frac{\kappa_{DNA}}{\kappa_{agua}} = \frac{b}{a} \quad (10)$$

La conductividad térmica del agua es $0.659 \text{ W/m} \cdot \text{K}$ ($0.607 \text{ W/m} \cdot \text{K}$) a 65°C (25°C) y la conductividad térmica del ADN es $150 \text{ W/m} \cdot \text{K}$ [51], por lo que, $\kappa_{ADN}/\kappa_{agua} = b/a = 227.68$ (247.12) es la relación que debieran tener los radios del volumen de la elipsoide, tales que el agua dentro de este volumen aumenta su temperatura 3°C absorbiendo la energía de un fotón incidente de 4.77 eV . Entonces, el eje mayor de la elipsoide es de 269 (284) pares de bases para el agua a 65°C (25°C) como solvente cuando el ADN absorbe la energía de un fotón de 4.77 eV . Clásicamente hablando es la cantidad de pares de bases que se pueden romper por esa energía sin considerar la dinámica cuántica del proceso real.

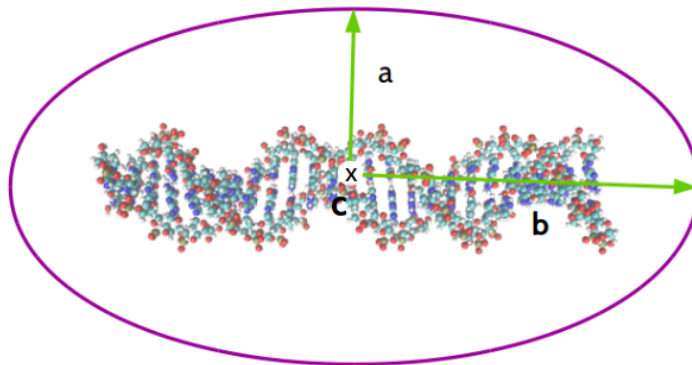


Figura 16: Dibujo esquemático del volumen de difusión de calor

POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN LA DESNATURALIZACIÓN DEL ADN INDUCIDA POR LA LUZ UV-C

En el [Capítulo 3](#), se planteó el proceso de desnaturalización no enzimática del [ADN](#) y [ARN](#), utilizando las condiciones físicas disponibles en el Arqueano, en particular la alta temperatura superficial 85°C [[28-30](#)] y la abundante luz [UV-C](#) que alcanzaba la superficie al mediodía en el ecuador 5.5W/m² [[31](#)]. El mecanismo proporcionó un vínculo entre la disipación de la luz [UV-C](#) absorbida y la replicación de las cadenas de nucleótidos, proceso fundamental en el origen de la vida [[12, 13](#)], siendo un proceso irreversible, por necesidad, debiendo disipar un potencial químico generalizado. La fuente más importante de un potencial químico generalizado en la superficie de la Tierra durante el Arqueano que proporcionó suficiente energía libre localmente para crear y romper enlaces moleculares (covalentes, de hidrógeno, etc.), fue el flujo de fotones [UV-C](#).

Para dar una explicación teórica plausible a los resultados experimentales [[11](#)] que demuestran que la desnaturalización del [ADN](#) es una consecuencia de la interacción de éste con luz [UV-C](#), es importante estudiar detalladamente los procesos físicos que están involucrados en la fotointeracción. Buscamos determinar el mecanismo físico más probable responsable de la desnaturalización del [ADN](#) inducida por [UV-C](#).

La desnaturalización del [ADN](#) inducida por temperatura es un mecanismo bien conocido experimentalmente. Este es un proceso termodinámico en equilibrio dinámico tiene un cambio de fase con un incremento abrupto en la entropía, reflejado en el hipercromismo. Una desnaturalización por temperatura como veremos en el [Capítulo 6](#) es un proceso colectivo. El rompimiento de los enlaces de hidrógeno de los finales de las cadenas, la deformación del esqueleto por el movimiento Browniano y la formación de burbujas a lo largo del [ADN](#) se combinan para eventualmente debilitar al máximo la estructura de la doble hélice y desnaturalizar el [ADN](#) por completo. Las fuerzas de apilamiento y los enlaces de hidrógeno deben ser perturbadas para lograr la desnaturalización del [ADN](#).

Al inducir una desnaturalización por luz [UV-C](#) a una temperatura fija, por debajo pero cerca de la temperatura de desnaturalización del [ADN](#), debe proceder de alguna manera diferente (y/o acelerada) que el mismo proceso inducido por temperatura. Al incidir luz [UV-C](#) sobre [ADN](#), este llega a un estado excitado, los caminos de desexcitación o disipación de esta energía darán a pauta para comprender el proceso de desnaturalización fotoinducido.

El decaimiento del estado excitado del ADN, provocado por luz UV-C, al estado base por fluorescencia tiene una eficiencia cuántica del orden de 10^{-4} [39] y la eficiencia cuántica para una fotolesión como lo es un dímero de timina es 10^{-5} [52]. No obstante, el decaimiento no radiativo es altamente eficiente, esto permite al ADN disipar excitaciones electrónicas altamente dañinas en calor, conocido como fotoestabilidad. En las siguientes secciones de este capítulo, analizaremos los procesos disipativos involucrados en la desexcitación del ADN (- Nota: la excitación, siempre es referida a la producida por luz UV-C). Empezando por nucleótidos simples para después comprender la cadena simple y doble. Buscando la dinámica fotoinducida que lleve al ADN a perder su estructura de hélice separando sus cadenas complementarias.

5.1 FOTOFÍSICA DEL ADN

5.1.1 Desactivación de mononucleótidos excitados por UV-C

Cuando un fotón del rango UV-C es absorbido por cualquier nucleobase aislada (e.g. en una muestra de solo mononucleótidos de adenina) en solución acuosa, esta se excita y se encuentra más probablemente en un estado singlete $S_{\pi\pi^*}$ [53, 54]. El tiempo de vida de esta excitación puede ser precisamente medida en la señales de absorción transitoria².

En la Figura 17, vemos señales de absorción transitoria o bien el blanqueamiento o pérdida del estado excitado de cada una de los mononucleótidos al ser irradiados con UV-C. Después de la excitación, ocurre una desactivación ultrarápida del orden de ~ 1 ps (10^{-12} s) de por lo menos el 50 % de la muestra, la parte restante de la muestra se mantiene excitada por solo unos picosegundos o hasta unos 100 ps [53]. El decaimiento del estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ al estado base S_0 se puede explicar como resultado de diferentes procesos físicos. La desactivación se puede clasificar por dos constantes temporales, 1) la desactivación ultrarápida (~ 1 ps) y 2) un estado excitado con una durabilidad mayor, definidos como estados oscuros para el caso de bases simples.

-
- 1 Es estado excitado se lee S_{π} enlace a π antienlace. Un enlace π es un enlace covalente molecular que une dos orbitales p de la densidad electrónica de los átomos que forman la molécula. Un π^* es un antienlace π que se caracteriza por mantener aisladas las densidades electrónicas del enlace covalente que requiere mayor energía y que debilita el enlace perse. Esto se debe que las funciones de onda describiendo los enlaces resultan antisimétricas.
 - 2 La señal de absorción transitoria mapea la evolución del espectro de una muestra en estado excitado como función del tiempo. La muestra se expone a dos haces de luz con diferentes propósitos. La bomba (pump) es el haz que se usa para excitar la muestra ópticamente, induce a las moléculas a ir del estado base al estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ y se pulsa sobre la muestra (femtosegundos) antes que el haz de prueba. El haz prueba (probe) monitorea las características espectrales de las moléculas en el estado excitado antes de su decaimiento. Este monitoreo se hace a retrasos temporales crecientes, mide la absorción de las moléculas en estado excitado en el tiempo, permitiendo ver la fracción de la muestra que queda excitada a un tiempo específico.

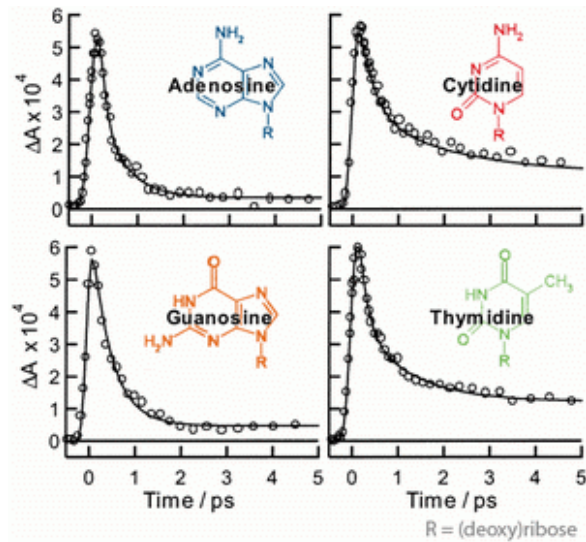


Figura 17: Señal de absorción transitoria de las bases nucleótidas. Las bases nucleótidas simples fueron irradiados con luz ultravioleta de 263 nm con una fuente pulsada de 150 fs, la señal indica la fracción de la población de moléculas en estado excitado como función del tiempo. Después de 1 ps por la mayor parte de la población excitada llegaba al estado base. Crédito de imagen: Pecourt (2001)[53].

Una base nucleótida, al igual que cualquier otra molécula, puede representar su estado base y estados excitados por superficies de energía potencial. La transición por excitación entre las superficies, teóricamente está definida probabilísticamente por la región de Franck-Condon³. Las superficies de energía se intersectan en algún punto. A las intersecciones entre las superficies de los estados excitados, entre si y con el estado base, se le conoce como intersección cónica, que es análogo a decir que hay estados de energía degenerados. Existen estados intermedios entre el estado $S_{\pi\pi^*}$ y S_0 de los nucleótidos, como $S_{1n\pi^*}$ y los tripletes $S_{3n\pi^*}$ y $S_{3\pi\pi^*}$. Estos estados intermedios, también tienen sus propias superficies que se intersectan en otros puntos con las superficies energéticas del estado excitado o el estado base.

Las superficies de energía potencial del estado excitado, los estados intermedios y el estado base pueden dar una idea de los caminos de decaimiento. Por ejemplo, en la Figura 18 podemos ver una gráfica esquemática de la superficies de energía potencial de la timina desde su excitación en la región de Franck-Condon, mostrando las posibles rutas de desactivación con las flechas negras [55]. En la explicación generalmente aceptada de la desexcitación ultrarápida se han detectado tres pasos importantes. Primero, hay una conversión interna de la molécula en cuestión. Cálculos cuánticos sugieren deformaciones en la forma planar de la base nucleótida [55]. En este primer paso se pierde suficiente energía para llegar generalmente a un mínimo del estado excitado. Segundo, en este punto hay un un cruce del estado excita-

³ La región de Franck-Condon se define donde funciones de onda vibracionales se sobreponen de manera significativa, entre superficies

do al estado base; el estado degenerado de las superficies energéticas; una intersección cónica. Finalmente, ocurrirá un enfriamiento vibracional desde el punto de intersección de las energías al mínimo en el estado base. Se ha depositado ~ 4 eV de energía en los modos vibracionales de S_0 . La base nucleótida regresará a su equilibrio transfiriendo esa energía vibracional a su entorno y solvente.

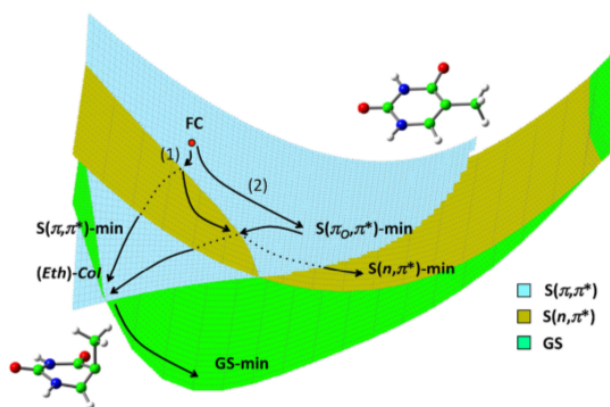


Figura 18: Energía potencial esquemática para los estados base y excitados de la timidina y uracilo, en coordenadas colectivas. Incluyendo los caminos de decaimiento. El estado base S_0 es la superficie verde, el estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ la superficie azul cielo y la superficie café el estado excitado intermedio $S_{n\pi^*}$. El punto rojo FC es el estado de excitación de la molécula. El camino (1) es el camino directo a la intersección cónica del estado base y el camino (2) es uno que pasa por estados intermedios. Las líneas punteadas son los caminos cubiertos por otras superficies. Crédito de imagen: Improta et al. (2016)[55].]

La deformación de los anillos de las pirimidinas (timina, citosina y uracilo) [56-58] y purinas (guanina y adenina) [59, 60] [ver Figura 22 y Figura 21] es la conversión interna que lleva a la intersección cónica inmediata con el estado base.

La deposición energética en el estado base, después de la deformación del anillo de purinas y pirimidinas, por la intersección cónica, se ha calculado por diversos métodos electrónicos (Como: la teoría funcional de densidad dependiente del tiempo (Time Dependent Density Functional Theory (TDDFT)), mecánica cuántica y mecánica molecular (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM)), métodos mixtos, métodos de multireferencia, entre otros.), encontrando que esta energía oscila entre 3.6 y 5.16 eV dependiendo de la base (A, G, C o T) que después se disipan de manera vibracional en el entorno [55].

Otro tipo de conversión interna que pierde menor energía, que también se aprecia en la Figura 18, es caer del punto de excitación de FC a la intersección cónica que junta a estados generalmente oscuros con el excitado $S_{\pi\pi^*}$ [54]. Estos estados son difíciles de caracterizar ya que no emiten ni absorben

radiación. En la [Figura 18](#) el camino (2) involucra una relajación nuclear que lleva a un mínimo $S_{\pi_0\pi^*}$ que después lleva a la intersección cónica. Pero ambos caminos (1) y (2) pueden acceder a un camino alternativo en el estado $S_{1_n\pi^*}$, donde el decaimiento no radiativo no se favorece ya que la intersección cónica de este estado con el estado base es de alta energía. Sin embargo, es posible que sea una puerta a un estado triplete $S_{\pi_0\pi^*} \rightarrow S_{1_n\pi^*} \rightarrow S_{3\pi\pi^*}$. El subíndice n representa el nivel energético vibracional (anti-enlace) y el número 1 es un singlete (espín total cero) y el 3 se refiere al triplete (espín total 1). Se ha mostrado que el 60 % de la población en estado $S_{\pi\pi^*}$ llega al estado base en lugar del estado $S_{1_n\pi^*}$ y no depende del solvente. Mientras que el estado $S_{1_n\pi^*}$ es inversamente proporcional al rendimiento triplete lo que sugiere que decae a un estado $S_{3\pi\pi^*}$ [61].

Resumiendo, las bases nucleótidas simples al ser excitadas pueden disipar la energía adquirida de diversas formas con diferente constante temporal de decaimiento. (1) La desactivación ultrarápida del estado $S_{\pi\pi^*}$ al estado base está regida por la conversión interna llevada a la intersección cónica mediante la deformación de los anillos de las bases, para después el resto de energía depositado en el estado base se relaja de forma vibracional. (2) Llegar a un estado intermedio oscuro de larga vida y que aún no se caracterizan. (3) Fotoproducto o reacción fotoquímica. (4) Otros procesos no determinados o que no se encontraron en la literatura.

5.1.2 Desactivación del ADN de cadena simple y doble excitado por luz UV-C

Al igual que para una base aislada o monómero, el decaimiento para una cadena simple o doble de ADN se puede observar en una señal de absorción transitoria (ver [Figura 19a](#) y [Figura 19b](#)) por experimentos de bomba-prueba [39, 50, 62-65]. Estas señales de absorción transitoria o blanqueamiento al estado base, para multímeros de ADN (cadena de monómeros o bases apiladas simple o doble), tienen una componente ultrarápida igual que el decaimiento de monómeros. Sin embargo, los estados de larga duración de los multímeros son mayores por 3 órdenes de magnitud comparadas con las bases simples. La interacción de las nubes electrónicas entre pares de bases apilados y los puentes de hidrógeno deben de mantener la energía de excitación transfiriéndola entre sí, influenciando los estados de larga duración.

En la [Figura 19a](#), se observa el blanqueamiento o pérdida de la señal de excitación para el monómero dAMP (2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato) y un oligo (cadena simple o doble >50 bases o pb) de 18 adeninas (dA)₁₈ en cadena sencilla. Observamos que el tiempo de decaimiento del oligo es mucho más lento (puntos verdes) al ser comparado con las bases simples (puntos azules) [64]. Esto hace evidente que la fuerza de interacción entre las bases apiladas es parte fundamental del retraso en el decaimiento.

La Figura 19b es una recopilación del blanqueamiento al estado base de monómeros, cadenas simples y ADN de doble hélice de pares G-C de diferentes formas en la hélice y geometría o forma de enlazarse (enlaces Hoogsteen y enlaces de los pares Watson-Crick) [39, 63].

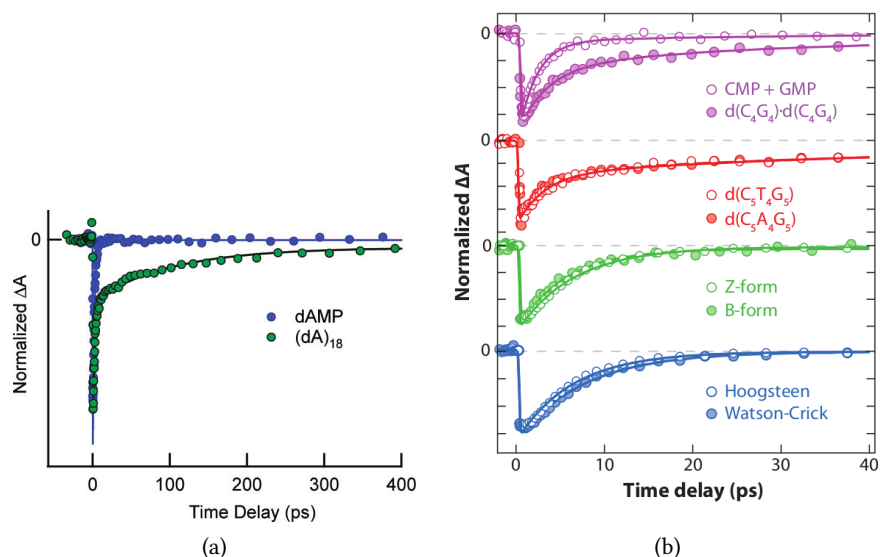
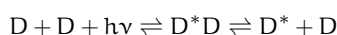


Figura 19: Desactivación de monómeros y bases apiladas. (a) Decaimiento de la excitación por UV-C (267) de monómeros de adenosín monofosfato (puntos azules) y 18 bases apiladas de adenina (puntos verdes) Crédito de imagen: Kohler et al. (2010) [64]. (b) Decaimiento de la excitación de multímeros. Señales de absorción que muestran los estados excitados de larga vida en diferentes formas del ADN con citosina y guanina, con un haz bomba de 266 nm y un haz prueba de 250 nm. Monómeros (citidina monofosfato (CMP) y guanina monofosfato (GMP), círculos morados huecos). Cadenas simples ($d(C_5T_4G_5)$ círculos rojos huecos y $d(C_5A_4G_5)$ círculos rojos). ADN de doble hélice de pares G-C ($d(C_4G_4) \cdot d(C_4G_4)$ círculos morados) de diferentes formas en la hélice de $d(CG)_9 \cdot d(CG)_9$ (Forma Z (círculos verdes) y forma B (círculos verdes huecos)) y geometría o forma de enlazarse (enlaces Hoogsteen (círculos azules huecos) y enlaces de los pares Watson-Crick (círculos azules)). Crédito de imagen: Middleton et al. (2009) [39, 63].

Dar explicación al largo tiempo de vida de los estados excitados en multímeros no ha sido aun concluyente, sin embargo, se conocen los procesos de decaimiento más probables [39, 55]. La Figura 20 es un esquema de las posibles formas de desactivación para cadenas de ADN. La componente de decaimiento ultrarápido de los multímeros de ADN se puede explicar, análogo a las bases simples, mediante intersecciones cónicas, o bien, por desprotonación cuando hay pares de bases unidos por puentes de hidrógeno [66].

Las interacciones entre bases adyacentes permiten la deslocalización de la energía [5, 6, 67], formación de excímeros⁴ [62] y transferencia de carga [68, 69] así como la formación de nuevos enlaces entre las bases que cambian a

⁴ Excímero: sea



estructura de Watson y Crick estructura mayormente encontrada en la naturaleza [70, 71].

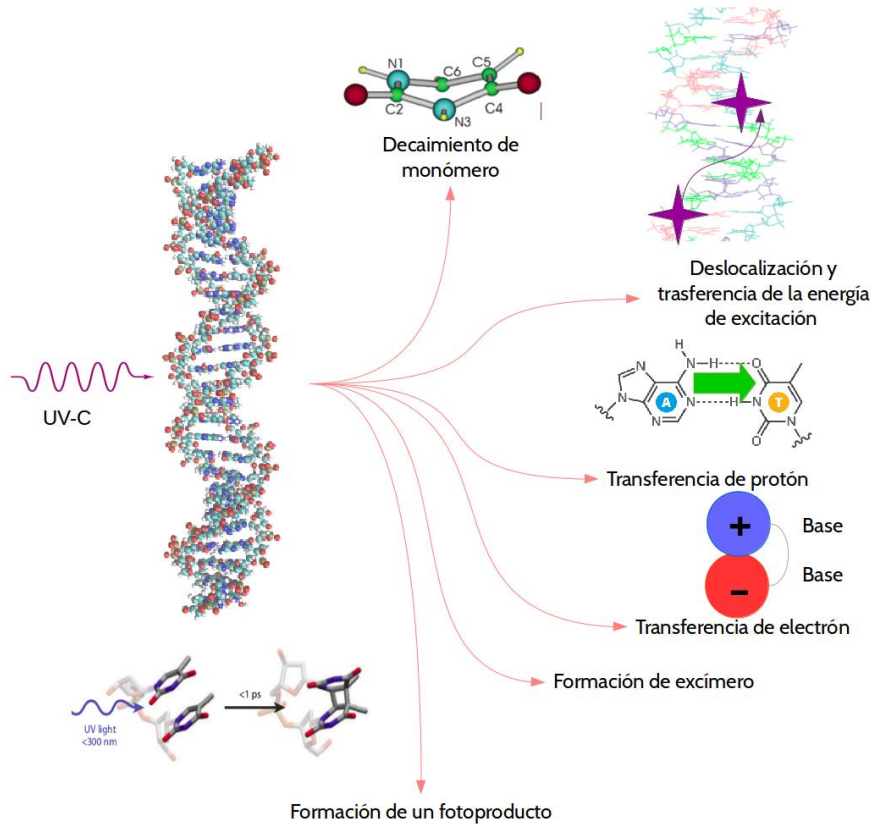
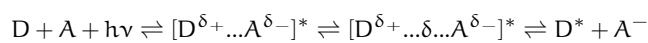


Figura 20: Representación esquemática de los posibles procesos del ADN por foto-interacción en el rango UV-C. Válidos también para cadenas simples. .

5.1.3 Excíplex y transferencia de energía

Los caminos fotofísicos de los estados excitados de multímeros decaen, en una fracción, mucho más lentamente que los monómeros. Por ejemplo, para una cadena de ADN poly(dA)·poly(dT) del estado singlete $S_{\pi\pi^*}$ decae 30 %, 1 ps después de su excitación, ya en un estado caliente alcanza su estado base después de los 100 ps [72] [ver Figura 19a]. Esto indica que hay una deslo-

Exíplex: Sea



donde en el primer paso puede haber emisión dejando el producto como inició y en el segundo esa energía δ puede devolver al producto a su forma original.

calización de la energía adquirida. Al excitar ADN un haz prueba de 250 nm este no cambia de nivel energético, se queda en el estado base *caliente*, la recuperación al mínimo del estado base tarda del orden de ~ 2 ps. Por otro lado si el ADN se excita por el haz bomba de 267 nm llevandolo al estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ y por conversión interna llega al estado base *caliente* [39, 50] tarda aproximadamente lo mismo en llegar al estado base. Sin embargo, no siempre se llega a la intersección cónica del estado base, y los resultados de las pruebas de bomba-prueba señalan que hay una permanencia de energía.

Resultado que si uno aumenta la temperatura o el solvente tiene un pH no neutro, donde ambas propiedades desnaturalizan al ADN, se observa que estas señales de larga vida se atenúan, comprobando que las fuerzas de apilamiento son cruciales en la trasferencia de energía. La interacción de apilamiento entre las bases nucleótidas media la eficiencia de la transferencia de energía entre bases y promueve la formación de estados colectivos excitados. Se ha concluido que la excitación inicial es local, seguida de una deslocalización energética que ocurre en los multímeros. Los estados excitados de doble cadena de *dA* y *dT* decaen practicamente igual a esos de cadena simple, más tarde, se encontró que el estado base de una doble cadena con pares de base de guanina y citosina decae más lentamente [63] [ver Figura 19b].

La dinámica de la deslocalización de la energía en el ADN no es un consenso. Lo único que es seguro que la energía está distribuida al menos en dos de las bases nucleótidas de la hélice, y es la mejor explicación para la larga vida de los estados excitados de los multímeros del ADN. Se había dicho que la deslocalización se encuentra a través de un ADN de 20 pares de base [73], pero al hacerlo con Dinámica Molecular (DM) y TDDFT resulta que esta se dispersa de 4 a 8 pares de base [74] o solo en dos de ellas (bases) [75]. Otros, han estimado que la deslocalización para una cadena simple es típica $1/e$ con una longitud de 3-4 bases, ellos infieren que para una cadena doble la deslocalización debe ser mayor debido a que el acoplamiento electrónico en una estructura más rígida es más propensa a la transferencia de energía [76].

La excitación de los multímeros comienza por un excitón de Frenkel, dado en una o dos bases del ADN doble. Este estado decae rápidamente a un estado excímero o excíplex que se encuentra por la superposición de las interacciones de apilamiento por enlaces π . Por último este llega a su estado base con un *largo* tiempo en la relajación sugiriendo que la explicación más probable es la deslocalización de la energía extra en el polinucleótido con un tiempo aproximado de relajación de 3-200 ns.

El decaimiento del excímero o excíplex debido a la recombinación de carga que se relajará a estado base no permitiendo daños perjudiciales al ADN, por lo que podemos concluir que es un rol dominante en la fotoestabilidad del mismo.

Modelos teóricos han encontrado que el transporte electrónico depende de la secuencia de ADN [77]. El desorden en la secuencia de *poly(dG)-poly(dC)* decrece la localización de la energía con unos ~ 300 pares de base de distancia a mayor ordenamiento mayor distancia. Una secuencia telomérica (final de los cromosomas) poco desordenada da deslocalizaciones bastante largas. Sin embargo, cuando se trata de secuencias que contengan los cuatro nucleótidos por base de manera aleatoria se la migración es de 10-20 pares de bases.

La deslocalización de la energía de excitación a través de una transferencia por resonancia Förster (Förster Resonant Energy Transfer (FRET)) es otra de las explicaciones a estados excitados de larga vida en multímeros. Esta es posible entre bases apiladas con una longitud <6 bases [67].

5.1.3.1 *Transferencia de carga*

Para que exista una transferencia de carga en el ADN, se requiere que los orbitales electrónicos entre bases se traslapen para que ocurra un intercambio de electrones [7]. El nucleótido donante excitado, de manera instantánea cederá el electrón con más energía al nucleótido aceptor, mientras, tomará uno con energía que le corresponda al estado base. Antes de que ocurra la transferencia, en la base excitada se forma excitón de Frenkel que es la interacción Coulombiana entre el electrón y el hueco que ha dejado, este decae rápidamente a un estado de transferencia de carga [78]. El excímero o exciplex es el estado de transferencia de carga independiente de como se haya llegado a él y tiene tasas de radiatividad muy bajas en las base nucleótidas [63, 79].

El excímero es posible gracias a las interacciones de apilamiento del ADN, compuestas por sus orbitales π y los anillos aromáticos que tienen propiedades semiconductoras. Los orbitales de la base excitada con estado singlete $S_{\pi\pi^*}$ se traslaparán con una base de manera apilada (la base adyacente que pertenece al mismo esqueleto) y habrá el intercambio de electrones⁵.

De manera más explícita, el donador tiene uno de sus electrones en el orbital molecular más bajo que generalmente no está ocupado (Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO)) mientras que el aceptor tiene sus electrones en el orbital molecular más alto que se puede ocupar (Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO)), el electrón con mayor energía cambiara de lugar con un electrón del aceptor pero se quedará en el mismo nivel energético. Por consiguiente, el aceptor se encontrará en un nivel excitado y el donador en

⁵ El electrón con mayor energía está en la banda de "conducción" y si el ADN estuviera expuesto a un campo eléctrico el electrón se moverá con la dirección positiva de este, y el hueco que dejó el electrón se traslada hacia el lado contrario; habiendo una transferencia de hueco-electrón sustituyendo el hueco con el electrón más cercano, hasta su recombinación. También, existen las transferencias en las cuales las moléculas ceden o ganan un electrón y el par en cuestión será compuesto de un catión y un anión.

estado base.

Reacciones fotoquímicas que llevan a la formación de enlaces covalentes entre bases adyacentes, como la formación de dímeros de pirimidinas y purinas o purinas con purinas, como TA y AA, puede ocurrir con una eficiencia cuántica $\sim 10^{-5}$ [52]. Los fotoproductos han sido extensivamente estudiados en la literatura, ya que uno de los principales motores del estudio de la fotofísica, son los dímeros de timina que están asociados con el cáncer de piel. También, existe una pequeña probabilidad de que el ADN se quede momentáneamente atrapado en un estado oscuro y de ahí fluorescer (320 nm) (eficiencia cuántica de $\sim 10^{-4}$) para llegar al estado base [39]. Recordemos que esta sección es válida para cadenas dobles y simples, mientras que solo nos interesan los fenómenos que ocurren en cadenas dobles que perturben la fuerza de apilamiento y los enlaces de hidrógeno logrando la desnaturalización o bien acelerándola. En las siguientes secciones de este capítulo presentaremos y desarrollaremos los fenómenos que pudieran causar la desnaturalización por interacción de luz UV-C.

5.2 FENÓMENOS FOTOFÍSICOS QUE PUEDEN TENER RELEVANCIA EN LA DESNATURALIZACIÓN DEL ADN INDUCIDA POR LUZ UV-C EN EL ARQUEANO

5.2.1 *Desexcitación por conversión interna e intersección cónica podría conducir al rompimiento de los enlaces de hidrógeno*

Ha sido determinado por varios métodos electrónicos (TDDFT, QM/MM, métodos mixtos y de multireferencia, entre otros) que para alcanzar la intersección cónica entre el estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ y el estado base S_0 , las purinas y pirimidinas presentan una deformación en sus anillos correspondiente a un movimiento fuera de plano. Al igual que se observa en la ruta trazada en la Figura 21. Existen estas rutas para cada una de las nucleobases del ADN que pueden conducir al rompimiento de los enlaces de hidrógeno de la base afectada con su par en una cadena doble de ADN [ver Figura 18 y Figura 22].

La fuerza de apilamiento no restringe los movimientos fuera del plano de las bases [55] y estas distorsiones son necesarias para el decaimiento del estado excitado con la mejor eficiencia cuántica. En la adenina [60], guanina [59] y citocina la deformación incluye el grupo amino (NH_2), donde los enlaces de hidrógeno se forman. Para la timina se arruga el átomo C_4 [58] punto fundamental para un posible enlace de hidrógeno con otra base. Ha sido mostrado que el rompimiento de un enlace de hidrógeno debilita la fuerza de apilamiento cambiando la configuración electrónica con sus vecinos inmediatos volviendo la cadena vulnerable [80].

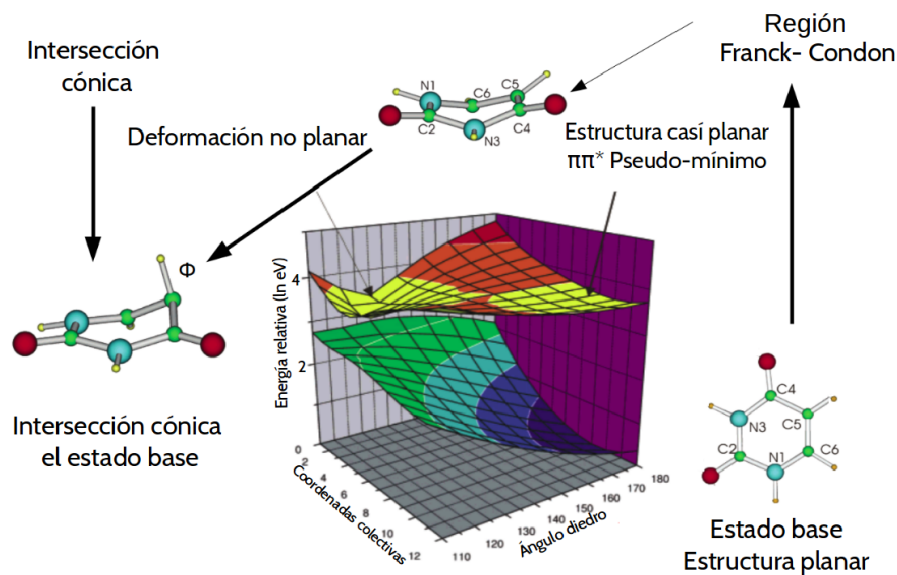


Figura 21: Dinámica del estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ del uracilo en solución acuosa. Las superficies de la energía potencial del estado base y excitado mostrando la intersección cónica. Cuando el uracilo se encuentra en estado base su estructura es planar. Después, por una transición vertical del estado inicial bajo el principio de Franck-Condon se llega a un singlete $\pi\pi^*$ atraído por la intersección cónica para regresar a su estado base sufriendo cambios en la estructura planar modificando las posiciones de los átomos C_5 y C_6 . Crédito de imagen: Gustavsson (2006) [57, 58].

El rompimiento de los enlaces de hidrógeno provocado por la deformación planar de las nucleobases puede ser no suficiente para desnaturalizar completamente el ADN, si solo ocurre una sola vez provocado por un fotón, como veremos en el capítulo 6 y 7. Sin embargo, perturbaciones continuas de este estilo podrían ser la causa de una desnaturalización provocada por luz ultravioleta, siendo más susceptibles los extremos de las cadenas. Esta susceptibilidad se debe a la hélicidad de la cadena. Se han observado, rompimientos aleatorios de enlaces de hidrógeno que ocurren por el mismo movimiento Browniano que se recuperan fácilmente por la hélicidad de la cadena [ver Capítulo 6].

Uno de los motivos de realizar este trabajo buscando respuestas con dinámica molecular es la alta energía depositada en el estado base después de la deformación de la base donde se absorbió el fotón y su intersección cónica. Resulta que en promedio esta energía es de ~ 4 eV según la nucleobase [55]. Esta energía vibracional; aunada a la previa deformación de los planos de las bases perturbando los enlaces de hidrógeno y con ello la interacción de apilamiento; la pensamos suficiente para perturbar la estabilidad de la hélice y acelerar la desnaturalización, este análisis se lleva a cabo en los siguientes capítulos.

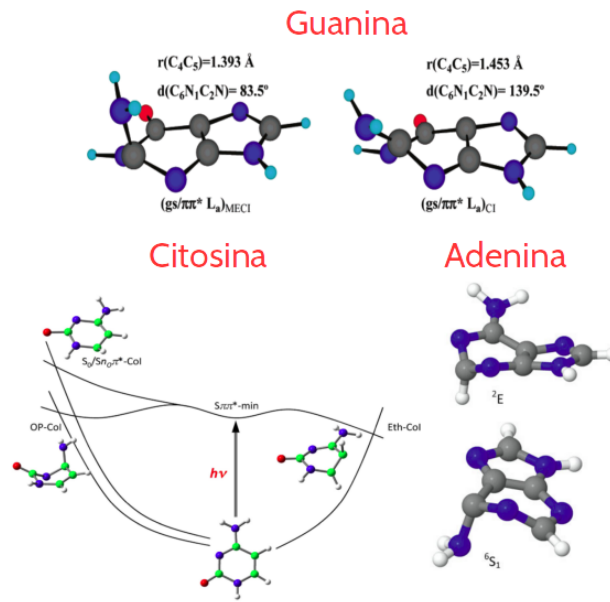


Figura 22: Deformación de las bases G, A y C por intersección cónica. Crédito de imágenes: Guanina, Serrano et al. 2008 [59]; Citosina, Blancafort, 2007 [81] y Adenina, Barbati et al. 2012 [60].

5.2.2 Desprotonación del ADN y el agua por luz ultravioleta

Se ha sabido desde hace tiempo que el ADN puede ser desnaturalizado químicamente incrementando el pH o bajándolo desde valores neutrales (7) a una temperatura fija. Por ejemplo, un buen químico para desnaturalizar es NaOH. En una solución acuosa este componente se disuelve en iones de Na y OH⁻. Los iones de OH⁻ incrementan el pH que inducirán la desnaturalización removiendo protones o bien iones H⁺ de los enlaces de hidrógeno del ADN. El proceso de remoción de protones es conocido como desprotonación. Los fotones UV-C pueden causar disociación de agua, creando radicales OH⁻ [82], entonces reduciendo el pH del agua y provocando la desprotonación de ADN. No obstante, si el flujo de fotones es bajo y con longitudes de onda por encima de 220 nm, la probabilidad de disociación del agua es muy baja, por lo tanto, este mecanismo puede no jugar un papel importante en la desnaturalización de UVTAR.

Por otro lado, se ha estudiado la fotoinducción de la desprotonación moviendo los hidrógenos que unen a la cadena de una base a otra [83, 84] posibilitando las mutaciones en el ADN. Se ha sugerido que la transferencia de protones entre las bases mediante el decaimiento de la excitación por luz UV-C siendo una reacción fotoprotectora [66, 85, 86]. Experimentalmente, para los pares G-C de WC, se ha probado que existe la transferencia de dos hidrógenos en menos de 2.9 ps, con una eficiencia cuántica $\leq 10\%$; mientras que para los pares A-T de WC no se observa este fenómeno [87]. Sin embargo, es un resultado que no pude descartar que no exista la desprotonación de A-T ya

que los cálculos *ab-initio* señalan la posibilidad de transferencia de protones [66, 88] (ver Figura 23).

La desprotonación puede participar activamente en la desexcitación del ADN en agua [66], misma que pudiera perturbar lo suficiente el par de bases para romper por lo menos un enlace de hidrógeno de un par de bases. Este efecto fotoquímico que podría jugar un papel importante en la desnaturalización.

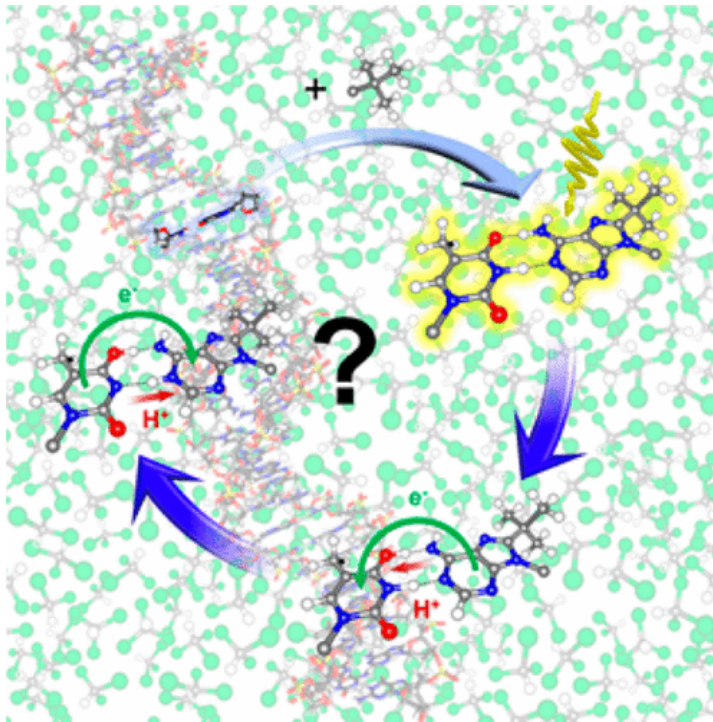


Figura 23: Esquema de desprotonación de ADN en agua. Crédito de imágenes: Rötterger, 2017 [87].

Desprotonación de las bases al solvente por transferencia de carga

El estado de transferencia de carga del ADN inducido por luz ultravioleta puede dejar a la adenina o guanina como un catión radical en el grupo amino ($-\text{NH}_2$), el cuál puede desprotonarse en el solvente por la recombinación de carga. A este proceso se le conoce como transferencia de un protón seguida de la pérdida de un electrón (electron-driven proton transfer (EDPT)). Esta desprotonación puede provocar una eficiente desnaturalización del ADN si ocurre en los finales del a altas temperaturas por debajo de la temperatura de desnaturalización.

5.2.3 *Dimerización*

La eficiencia cuántica de la formación de dímeros entre bases apiladas es del orden de 10^{-2} al ser irradiados con UV-C de 254 nm [52]. Sin embargo, estos fotoproductos son reversibles cuando son irradiados por longitudes de onda menores, aún del rango ultravioleta. La fotoreversión del dímero se ha encontrado a longitudes de onda de 238 nm para dímeros TT [89, 90] y para dímeros UU [90, 91]. Tanto la formación de dímeros como la fotoreversión pudieron ocurrir en el Arqueano en el proceso propuesto UVTAR, ya que el espectro que llegaba a la superficie terrestre contenía una cantidad significativa de luz de 238 nm. La dimerización desestabiliza la hélice del ADN y produce la pérdida de los enlaces de hidrógeno. Por lo que podemos considerar que la dimerización desnatura localmente una cadena de ADN.

Dicha desnaturalización es permanente si el dímero se revierte una vez que la doble cadena este completamente desnaturizada. Este fenómeno foto-físico y fotoquímico reversible aunque con poca probabilidad de ocurrencia, da una explicación plausible a la desnaturalización por luz UV-C.

DINÁMICA MOLECULAR DEL ADN Y SU AMBIENTE: ETAPAS DE DESNATURALIZACIÓN

6.1 INTRODUCCIÓN

El decaimiento de la excitación electrónica del ADN, creada por la absorción de luz UV-C, ha sido interpretada de los experimentos de espectroscopia resuelta en el tiempo [39, 53, 64, 92, 93]. Los resultados muestran que la población excitada inicial se bifurca en dos caminos de desexcitación no radiativos. El primer camino es la rápida conversión interna de la única base que absorbió un fotón [53, 93]. Mientras, el otro camino involucra estados intermedios oscuros y/o la deslocalización de la energía, que son estados de larga duración de hasta nanosegundos [ver Figura 20].

Una gran parte de la población excitada de monómeros, par de bases, bases apiladas y cadenas de doble hélice decaen de su estado excitado rápidamente por conversión interna [ver Figura 19]. La conversión interna lleva a la molécula a la intersección cónica de las energías entre el estado excitado y el estado base ($S_{\pi\pi^*} \rightarrow S_0$). Estudios mecánico-cuánticos sugieren que la energía, que se deposita en los modos vibracionales del estado base, de la molécula en cuestión (A, G, C ó T), es entre 3.6 y 5.16 eV [55] correspondiente a la degeneración de la energía en la intersección cónica.

Esto nos lleva a concluir que la energía vibracional depositada en el estado base añadida a la deformación planar de un nucleótido podría ser suficiente para desnaturar el ADN. La energía vibracional de un fotón de 4.77 eV (260 nm, o bien de 230-290 nm), aumentará la temperatura dinámica de la base nucleotídica ~ 2500 K que posiblemente es suficiente para perturbar las fuerzas no covalentes (enlaces de hidrógeno y fuerzas de apilamiento) que le dan estructura a la doble hélice.

Si la hipótesis es correcta, entonces el proceso de desnaturación del ADN asistido por temperatura y luz UV-C puede ser representado por DM [usando el potencial AMBER, ver Apéndice A]. Esta primera aproximación del ADN con condiciones similares a las del Arqueano, no necesita representar un estado excitado del ADN al interactuar con luz UV-C. Para corroborar la suposición es suficiente representar un nucleótido del oligo con energía vibracional correspondiente a la depositada al estado base, después de su excitación por luz UV-C. Sin embargo, la representación de la DM, omite los procesos fotofísicos que han descrito en el Capítulo 5, como la deformación de las bases por conversión interna, antes de llegar a la intersección cónica, que en este caso específico, pudiera ser determinante para la desnaturación.

ción.

Los procesos que pudieran influir en la desnaturalización, por temperatura y por la interacción por luz UV-C, son más complejos de lo que en un principio pensábamos. Por ejemplo, no se encontraron simulaciones con DM (omitiendo las de grano grueso) que puedan obtener desnaturalización de oligos de ADN a la temperatura experimental de desnaturalización [94, 95], siendo un caso similar el de este trabajo. Esto se debe al costo computacional y a la burda representación de la dinámica ADN con el potencial modelo de construcción asistida con refinamiento de energía –Assisted Model Building with Energy Refinement– (AMBER); que no incluye los grados de libertad de los orbitales electrónicos. A lo largo del capítulo iremos discutiendo esta representación. No obstante, cálculos como TDDFT, QM/MM y otros métodos electrónicos [55], aunados a estas dinámicas, pudieran ilustrar de manera más certera los procesos que presentaremos en este y el siguiente capítulo. Sin embargo, estos métodos son mucho más costosos computacionalmente.

6.2 DETALLES DE LA SIMULACIÓN DE LAS ETAPAS DE LA DESNATURALIZACIÓN

Una de las etapas más importantes para el mecanismo propuesto UVTAR es la desnaturalización parcial del ADN por temperatura. Previamente, se ha estudiado teóricamente la *vizualización* del proceso de desnaturalización del ADN con modelos de *juguete* (de grano grueso), que a pesar de ser ilustrativos se alejan mucho del comportamiento molecular real del ADN [96-99]. Es necesario buscar mejores aproximaciones donde podamos observar la dinámica de todos los átomos, i.e. un análisis de DM que ofrece una imagen a la transición de la desnaturalización. Este capítulo está dedicado a mostrar por DM las etapas de desnaturalización del ADN por calor propinado por su entorno (vacío, agua y agua salada).

Buscamos las condiciones iniciales del proceso propuesto UVTAR; dónde y cómo los rayos UV-C pudieron ser absorbidos para completar la desnaturalización del ADN. Para ello, se han realizado dinámicas moleculares, durante 300 ns, del ADN de 25 pares de bases, con la secuencia, 5'-CTATGGAGCGGATATACCATGGACG-3', en el vacío y en agua como solvente con el modelo TIP3P [100], donde las interacciones del sistema están definidas por el potencial AMBER [101] descrito en el Apéndice A.

Los detalles del sistema como la incorporación de temperatura y presión también se encuentran descritos en el Apéndice A, además del método de integración de la dinámica. La DM consta de varias etapas que siguen un algoritmo global que se resume en: definición del sistema e interacciones, posiciones de la estructura cristalina y velocidades iniciales con una distri-

bución de Maxwell-Boltzmann, y finalmente, la equilibración en la configuración por una ventana temporal. Los paquetes y archivos necesarios para realizar las simulaciones se encuentran descritos en el [Apéndice B](#).

El ADN se simuló de distintas formas; se colocó en una caja rectangular estando en el vacío, ó con ~ 1500 ó ~ 26000 moléculas de agua, con volúmenes de 729nm^3 , 62nm^3 y 848nm^3 respectivamente (el volumen del ADN es de 33.82nm^3). La celda rectangular tiene condiciones periódicas en las fronteras. Las moléculas que se encuentran en el límite de las *superficies* de la caja, sienten interacción de moléculas de agua imagen. Además, si una molécula de agua sale por una de las caras de la caja, esta entrará por la cara paralela [ver [Figura 31](#)].

Después de minimizar la energía del sistema en el vacío o solvatado, se acoplan la temperatura y presión del sistema. El sistema termodinámico se integra cada 0.002 ps con el algoritmo de Verlet [ver [Apéndice A](#)].

Con la finalidad de observar la desnaturalización del ADN se llevaron a cabo varios experimentos computacionales. Previamente, se ha calculado cuidadosamente la curva de desnaturalización experimental y teóricamente para el ADN que estudiamos [ver [Figura 6](#) y [Figura 7](#)]. La temperatura de desnaturalización de la muestra es 341K, esta temperatura representa cuando el ADN se ha desnaturalizado al 50 % en agua con sales estándar (solución PBS, pH 7.3) [11]. En las simulaciones del ADN en agua a 341K, después de 300ns, no pudimos obtener el rompimiento del 50 % de los enlaces de hidrógeno, en promedio obtuvimos un 10 % de rupturas en los enlaces, y hasta un 30 % en estados metaestables que se regeneran de forma casi inmediata.

Calculamos la constante de tiempo de la desnaturalización, que depende de la longitud del ADN, para ver que la aproximación fuera adecuada. No obstante, aún no existen experimentos que corroboren este dato de forma precisa [102, 103], en la literatura existen opiniones diferentes de como obtener la constante [104-106]; de acuerdo a los resultados de los diferentes cálculos, la constante de tiempo de la desnaturalización para nuestra secuencia, varía de nanosegundos hasta microsegundos. Lo anterior indica dos posibles casos: uno es que el potencial AMBER es burdo para representar la desnaturalización por calor y el otro, es que la constante temporal de desnaturalización esta por encima de los 300ns.

Para analizar las etapas de desnaturalización realizamos otras simulaciones diferentes a las del experimento. Se logro desnaturalizar el ADN en el vacío y en agua con sales a 430K. Aunque no reproducen los resultados experimentales de la desnaturalización por calor, reunimos los elementos necesarios que se deben discutir para seguir estudiando este proceso.

6.3 DENATURALIZACIÓN EN EL VACÍO

La DM de la desnaturalización del ADN en el vacío es diferente que en el solvente. En este caso no tiene sentido hablar de una temperatura de desnaturalización. El ADN se desnaturalizará, ya que no hay nada que neutralice las cargas negativas de su esqueleto. La transición ocurrirá por la repulsión entre las cadenas sencillas. Sin embargo, nos ayudará a comprender el proceso en el solvente. Por supuesto, el solvente, con o sin sales, estabiliza esta desnaturalización y añade doblamientos además de la formación de nuevos enlaces de hidrógeno. Los iones positivos de las sales neutralizan las cargas negativas de los grupos fosfato que haciendo al ADN aún menos propenso a la desnaturalización.

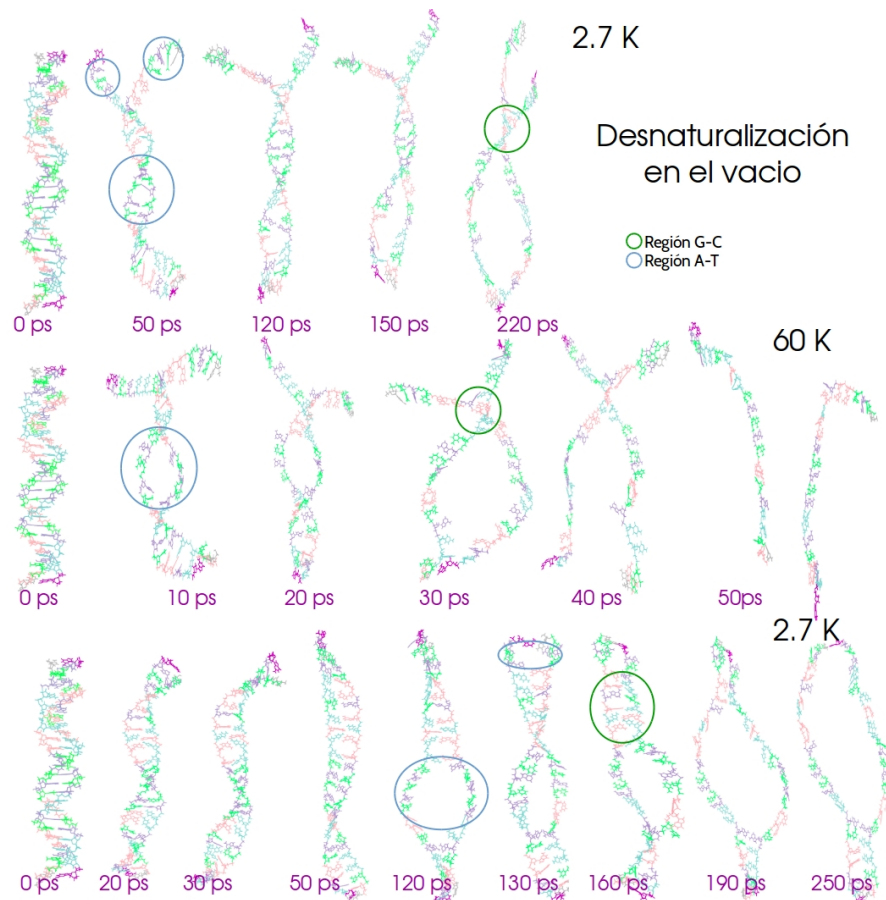


Figura 24: Representación de las coordenadas del ADN simulado en el vacío. La cadena de ADN está iluminada por color para cada base, el lila representa la adenina, verde la timina, azul cielo es citosina y el rosa la guanina. Cada renglón en la imagen representa una temperatura en el vacío acoplada a las moléculas. En los dos primeros renglones, se observa una desnaturalización similar con diferentes constantes temporales de desnaturalización. El último renglón representa el mismo ADN con las bases finales sin cargas negativas en el grupo fosfato, que nos permite observar que el entrelazamiento geométrico juega un papel importante.

La [Figura 24](#) muestra la desnaturalización en el vacío a la temperatura del espacio 2.7K y a 60K. En los dos primeros renglones de la [Figura 24](#), las etapas de desnaturalización son muy similares, sin importar la diferencia en temperatura. El aumento a 60K hace de la desnaturalización por lo menos 5 veces más rápida, pero la visualización es prácticamente igual. Las cadenas se deshebran con un efecto cremallera que ayuda a romper con la helicidad.

El enredamiento de las cadenas adhiere cohesión al ADN. La geometría del apilamiento de los pares de bases previene las fluctuaciones térmicas [107]. Es por ello que al mismo tiempo en que se deshebra la doble cadena, hay una elongación de la misma. Se crean burbujas donde hay mayor concentración de A-T, mientras que perseveran los enlaces G-C. Esto ocurre, sin importar que se haya perdido la helicidad.

En el último renglón de la [Figura 24](#), se removieron las cargas negativas de los extremos del esqueleto, podremos observar una desnaturalización distinta. Aquí, el desenrollamiento del ADN es primordial para que se lleve a cabo la separación de las cadenas. La apertura donde hay más concentración de pares A-T funciona como cierre dentro de la cadena.

Los resultados de esta sección reproducen que los últimos pares en desnaturalizarse efectivamente son los pares G-C. Ya que la DM es una aproximación clásica, esperamos que el movimiento browniano que adhiere el solvente al ADN, siga reproduciendo una desnaturalización con etapas similares. Siendo el sistema solvatado mucho más estable por la recuperación aleatoria de su estructura geométrica evitando la rápida desnaturalización.

6.4 SIMULACIÓN DEL ADN EN AGUA A SU TEMPERATURA DE DENATURALIZACIÓN

En esta sección, buscamos examinar la DM de la desnaturalización del ADN de 25 pb, en agua a su temperatura de desnaturalización, 341 K. Durante 300 ns, observamos el rompimiento del 10 % de los enlaces de hidrógeno en promedio y hasta 30 % representando estados metaestables. En la [Figura 25](#), podemos ver el número de enlaces de hidrógeno en la cadena de 25 pb en el tiempo, permitiendonos ver el porcentaje de desnaturalización.

En la dinámica, un enlace de hidrógeno se cuenta si tiene la forma $N - H \cdots N$ ó $N - H \cdots O$ a cierta distancia. El corte de la distancia del enlace de hidrógeno se da a los 3.5 \AA [108], considerando que en promedio la distancia es de 2.9 \AA en su forma cristalina y de acuerdo a sus curvas de energía potencial. La estructura de nuestra muestra contiene 63 enlaces de hidrógeno, 3 por cada par G-C y 2 por cada par A-T. Otros enlaces de hidrógeno se pueden formar, por la cercanía con otras bases adyacentes debida a la misma dinámica del sistema, es por ello que hay saltos hasta de 70 enlaces de hidrógeno

formados.

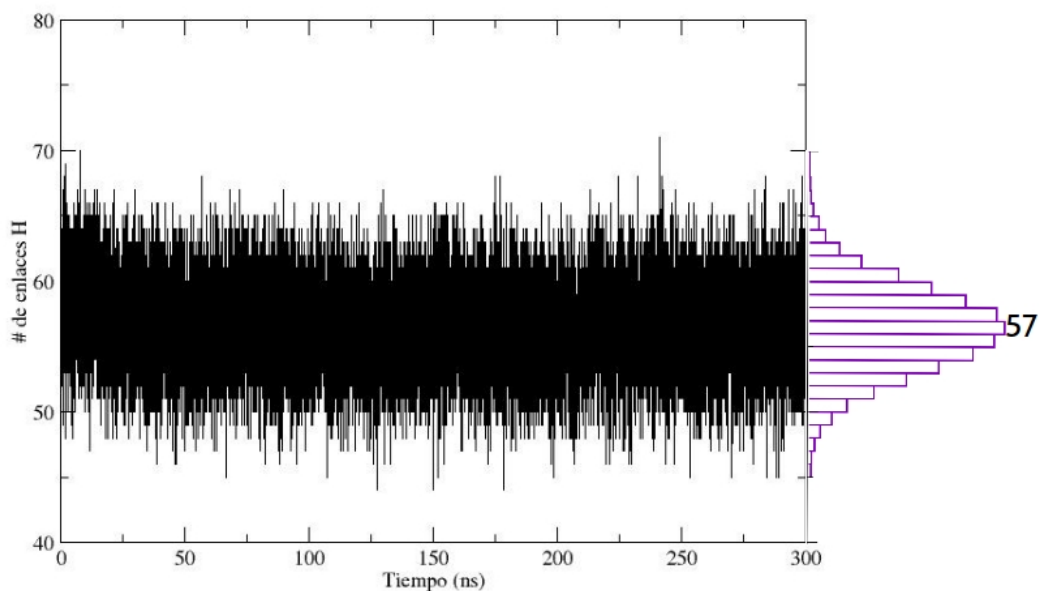


Figura 25: Enlaces de hidrógeno del ADN de 25 pb a su temperatura de desnaturalización, 300 ns. La gráfica muestra los enlaces de hidrógeno del ADN de 25 pares de bases en agua a 341 K, durante 300 ns. La simulación muestra estabilidad dinámica en 57 de 63 enlaces de hidrógeno. Esto sugiere que el tiempo de simulación es muy corta para observar la desnaturalización con DM-AMBER o bien que el modelo no reproduce de forma adecuada el sistema. Las características de este potencial podrían no ser las adecuadas para el proceso dinámico.

En la dinámica presentada en la [Figura 25](#), observamos el ADN en equilibrio dinámico, pero, quizás, no en equilibrio termodinámico, lo cual pudiera ser posible si la constante de desnaturalización fuera mucho mayor a 300 ns, es decir, que su desnaturalización ocurra al transcurrir más de 300 ns nadando en agua a su temperatura de desnaturalización (T_{melt}). O, también, pudiera indicar que tenemos el sistema en un estado de equilibrio termodinámico pero, el potencial de AMBER no es adecuado para representar el sistema.

Varios modelos han tratado de estimar el tiempo de desnaturalización τ , resultando que es proporcional a la masa (longitud) total del ADN en cuestión, M_{tot} , elevada a una potencia α , entonces, $\tau \propto M_{tot}^\alpha$ [104-106, 109]. Ha sido señalado que la constante α puede tomar los valores de 0 y 3.3 dependiendo del modelo [105]. Se ha pensado que problema de la desnaturalización debe estar constreñido por la resistencia hidrodinámica a la rotación del ADN. El

número de vueltas necesarias para la desnaturalización es una función lineal de la longitud del ADN y la resistencia en la viscosidad o fricción debe por lo menos aumentar linealmente con la longitud de la cadena. Lo anterior sugiere que la constante α debe estar alrededor de 2.

Experimentalmente, para el ADN de *Fago T2 de Enterobacteria*, se encontró que la tasa de desnaturalización es aproximadamente de 5×10^4 pb por minuto [103, 106]; mientras que el ADN de timo de ternera (calf thymus), con un peso molecular de $M_{\text{tot}_{\text{timo}}} = 6 \times 10^5$ Da, se desnaturaliza a $\tau_{\text{timo}} \sim 25$ ms [102]. Estos resultados anteriores no permiten hacer una comparación clara. Por ejemplo, retomando la ecuación anterior podemos hacer la siguiente aproximación, con τ_{25} el tiempo de desnaturalización para la cadena de ADN de 25 pb,

$$\begin{aligned} \left(\frac{M_{\text{tot}_{25\text{pb}}}}{M_{\text{tot}_{\text{timo}}}} \right)^\alpha * \tau_{\text{timo}} &\cong \tau_{25} \\ \left(\frac{N_{25\text{pb}}}{N_{\text{Fago-T2}}} \right)^\alpha * \tau_{\text{Fago-T2}} &\cong \tau_{25} \end{aligned} \quad (11)$$

donde $N_{\text{Fago-T2}} = 5 \times 10^4$ es el número de pares de bases del ADN de *Fago-T2* y $M_{\text{tot}_{25\text{pb}}} = 15448$ Da es el peso molecular de la cadena sintética de 25 pb. Entonces, τ_{25} toma los valores aproximados de $671 \mu\text{s}$, $313.6 \mu\text{s}$, $15 \mu\text{s}$ y $1.5 \mu\text{s}$ para α con valores de 1.5, 1.6, 2 y 2.3 respectivamente, si medimos respecto al ADN de *Fago-T2* y $103.3 \mu\text{s}$, $71.6 \mu\text{s}$, $16.6 \mu\text{s}$ y $5.5 \mu\text{s}$ para el ADN de timo.

Esto, nos da una idea del posible tiempo de desnaturalización con una base experimental. Este tiempo experimental ha sido, también, comparado con cálculos teóricos que se dedujeron del sistema Browniano de muchas partículas con la ecuación de Smoluchowski [104]. Por ejemplo una de estas aproximaciones se reduce a la siguiente ecuación,

$$\tau \simeq \left[\frac{N}{n_e} \right]^2 \frac{\zeta d_e^2}{12 k_B T_{\text{melt}}} \quad (12)$$

donde ζ es el coeficiente de fricción, N el número de nucleótidos de la cadena, d_e es la longitud efectiva del efecto neto de las constricciones angulares de un potencial entre enlaces covalentes del ADN, n_e es el número de nucleótidos. Si aplicamos la ley de Stokes $\zeta = 6\pi\eta\beta d_e$, con η la viscosidad del solvente y β su fricción. Si sustituimos los valores correspondientes ($\eta = 1 \times 10^{-3} \text{Pa} \cdot \text{s}$ (Js/m^3)), $\beta = 0.16$, $d_e = 10 \text{nm}$, $T_{\text{melt}} = 341 \text{K}$ y $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{J/K}$), el tiempo de desnaturalización es $\tau_{25} \simeq 83.4 \text{ns}$ en la Ecuación 12 lo cual es completamente diferente a lo que se obtiene de los experimentos en cadenas mucho más largas.

Se ha revisado que la interacción entre pares de bases para ser mejor comprendida necesita de experimentos más recientes que colaboren estudiando

los tiempos de desnaturalización y renaturalización [106]. Los experimentos se han hecho en cadenas muy largas y no hay certeza de que las tasas de desnaturalización sean las mismas para cadenas mucho más cortas. Por otro lado, la mejor aproximación que podemos obtener de la desnaturalización es la DM, por lo que también este camino debe ser mucho más explorado, existen muy pocas publicaciones al respecto y ninguna logra desnaturalizar el 50 % de la cadena a la temperatura de desnaturalización por el tiempo computacional que llevaría [94, 95].

No podemos descartar que los parámetros de la dinámica molecular con el potencial AMBER pudieran dar una aproximación errónea de la dinámica del sistema de ADN de 25 pb solvatado. El problema de la desnaturalización necesita tener un enfoque experimental que revise lo predicho en la teoría. Los últimos experimentos en medir la tasa de desnaturalización son de los finales de los 70's y los métodos actuales han mejorado bastante por lo que pudieran hacerse mediciones más precisas y con oligos en lugar de cadenas extremadamente largas.

6.5 DESNATURALIZACIÓN EN AGUA CON IONES A TEMPERATURAS ALTAS

Para observar el proceso de desnaturalización en un tiempo computacionalmente adecuado (a nuestros recursos y dado los posibles problemas del potencial AMBER) aumentamos la temperatura a 430 K (89°C por encima de la temperatura de desnaturalización). Para decidir este aumento, revisamos que pasa con la simulación en función de la temperatura. La Figura 26 muestra la desviación cuadrática media de las posiciones del ADN durante simulaciones de 40 ns para diferentes temperaturas.

La desviación cuadrática media (RMSD) del ADN nos ayudará a ver que tanto la cadena sufre modificaciones en su estructura al tiempo t_1 , respecto a la posición, \mathbf{r}_i , de sus N átomos, está medida con referencia a la estructura original, es decir, la molécula al tiempo inicial de la simulación ($t_2 = 0$),

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2)\|^2 \right]^{1/2} \quad (13)$$

donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ es la suma de las masas de los átomos. En la Figura 26 se muestra que para la temperatura de desnaturalización (341 K, línea verde) durante los 40 ns medidos, la hélice permanece dinámicamente estable, sin perder su forma comparada a la inicial. La cadena se ve mayormente afectada a la temperatura de 430 K (línea morada), por lo que consideramos que podríamos observar más rápido la desnaturalización.

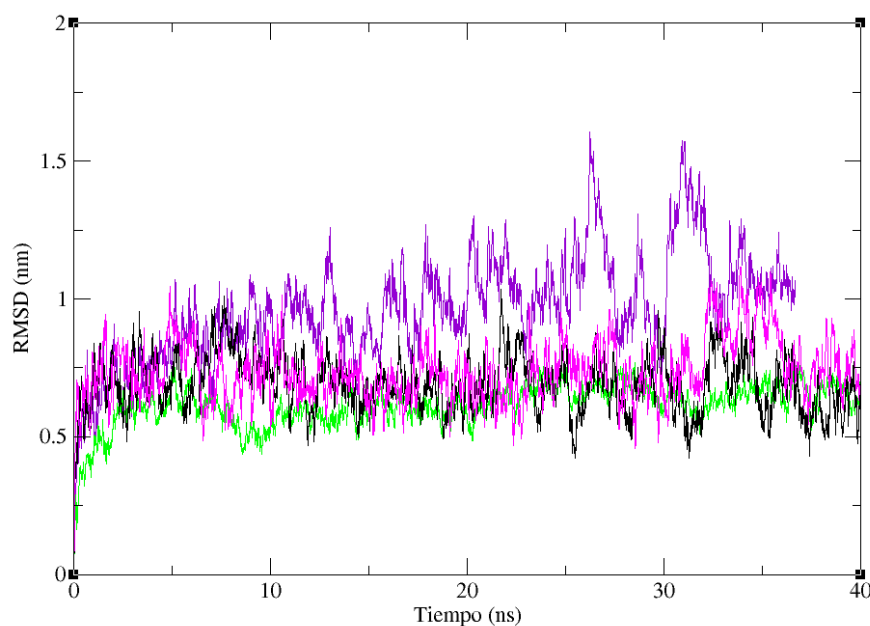


Figura 26: Desviación cuadrática media del ADN en agua a altas temperaturas. La gráfica muestra la desviación del ADN en agua a 341 K (verde) y a 400 K (rosa) y en agua salada (0.6 mol/litro) neutralizada con iones de Mg^{2+} a 400 K (negro) y 430 K (morado). La finalidad de este análisis es mostrar que es necesario aumentar la temperatura para ver una desnaturalización en un tiempo computacionalmente factible. A la temperatura de desnaturalización (341 K, línea verde) el ADN se percibe mucho más estable dinámicamente comparado con el ADN a temperaturas mucho más elevadas de 400 K (líneas rosa y negra) y 430 K (línea morada).

En la [Figura 27](#) medimos el grado de desnaturalización basada en el número de enlaces de hidrógeno que unen a las cadenas que forman la hélice. Podemos observar etapas de desnaturalización parecidas a las que ocurren en el vacío. La apertura de los finales, las burbujas formadas donde hay pares A-T y el desenrollamiento de la hélice que facilita la apertura del ADN son etapas o estados metaestables en la desnaturalización del ADN. Los estados metaestables que adopta el ADN son muy diferentes de su forma inicial. Dentro de estos encontramos que muchos de los enlaces de hidrógeno se rompen y se vuelven a unir, a estos se les conoce como estados metaestables.

Un valor experimental para el tiempo de desnaturalización tomado por encima de T_m , es el de la bacteria *E. coli* con una longitud de 3×10^6 pb. Esta se desnaturaliza en un minuto a $100^\circ C$ ($\sim 5^\circ C$ por encima de su temperatura de desnaturalización [110]). Si retomamos la [Ecuación 11](#) con $\alpha = 2$, entonces $\tau_{25} \cong 4.2$ ns. Esta aproximación es diferente a la obtenida en la sección anterior donde la tasa de desnaturalización se mide a T_m . De esto podemos implicar que la dinámica no está bien representada por el potencial AMBER ya que esperaríamos que la desnaturalización ocurriera en los prime-

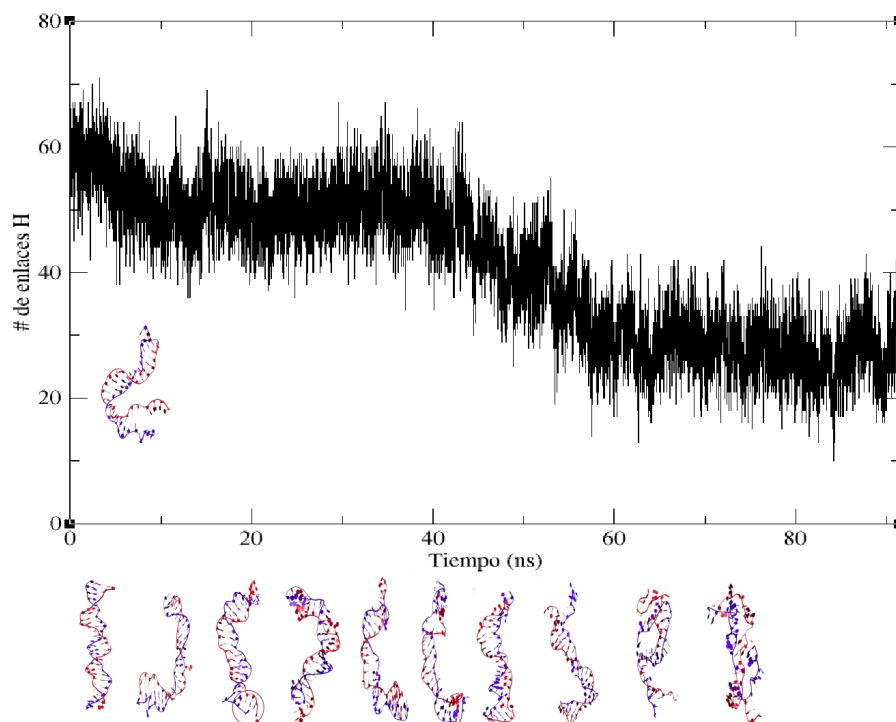


Figura 27: Desnaturalización por temperatura elevada 430 K. El ADN aquí está iluminado de dos colores, rojo y azul, que representan las cadenas simples unidas por los enlaces de hidrógeno. La gráfica corresponde al conteo de estos enlaces de la muestra durante 80 ns, es decir, que tan unidas las cadenas están, o bien naturalizadas. Los pares de bases A-T y G-C tienen 2 y 3 enlaces de hidrógeno respectivamente que en la suma sobre los 25 pares de bases son 63. Esta simulación es la continuación de una anterior de 40 ns. Las cadenas están colocadas en los tiempos aproximados de la gráfica con la finalidad de observar la desnaturalización.

ros nanosegundos de la simulación.

Durante la simulación observamos que la desnaturalización es un proceso colectivo. Mecanismos como las burbujas, el deshilachamiento de los finales y la deformación del esqueleto o hélice colaboran juntos para lograr la transición. El desenrollamiento debilita la fuerza de apilamiento del ADN facilitando la disociación de los enlaces de hidrógeno. Las burbujas son fluctuaciones que han sido ampliamente estudiadas y se les conoce como burbujas de respiración [106]. Estas fluctuaciones han sido encontradas en el ADN a temperatura ambiente. La duración de estas burbujas es de ~ 1 ns hasta ~ 1 ms, pero si la muestra está a la temperatura de desnaturalización la duración de la burbuja es del orden de μ s.

El comportamiento molecular del ADN al desnaturalizarse debe ser profundamente revisado, sobre todo experimentalmente. La evidencia experimental [102, 103, 106, 110] que hemos encontrado se culminó a principios de los 70's, las técnicas actuales han mejorado y pudieran cambiar las perspectivas plasmadas en este capítulo. Experimentos para encontrar los tiempos de desnaturalización con oligos y cadenas largas de ADN, deben ser comparados y comprobar que a constante α es la misma o diferente entre cambios de longitud. También, es necesario saber si existe una longitud mínima de la doble cadena para la validez del modelo. Además, es necesario incorporar la influencia del solvente reflejando la interacción química y no solo hidráulica, como hasta ahora se ha logrado.

Los métodos teóricos empleados para revisar la desnaturalización térmica, van desde la DM, dinámica Browniana o Langeviana, simulaciones Monte Carlo, como métodos numéricos hasta métodos analíticos como de ecuación maestra, ecuación de Fokker-Plank y Smoluchowski con aproximaciones de Rouse y Zimm, entre muchos otros. Donde la mejor de estas es la representación de la dinámica molecular de todos los átomos, aunque debe ser mejor ajustada a datos experimentales. Esta permite ver con claridad el comportamiento de la molécula de ADN como sus fluctuaciones, a pesar de tener alto costo computacional. Esperamos que la revisión de este capítulo sirva como motivación del estudio de la desnaturalización tanto teórica como experimentalmente, ya que es un proceso fundamental para la vida y alto interés para la biotecnología.

Para nosotros, esta simulación nos permitió tener un punto de partida; una condición inicial en la que el ADN pudo haber interactuado con la luz ultravioleta hace 3.8 Ga. Escogimos una *fotografía* del ADN parcialmente desnaturalizado entre los 50 y 60 ns de la simulación, donde el 50 % de los enlaces de hidrógeno están rotos por el efecto termal del agua. En el caso ideal, desnaturalizándose completamente al interactuar con radiación UV-C como fue descrito al principio de este capítulo. En el siguiente capítulo, tomamos esta condición regresando a temperatura de 67°C y colocamos un estímulo de luz UV-C como un exceso de energía en una de las bases.

DINÁMICA MOLECULAR DE LA DIFUSIÓN DE CALOR EN ADN Y AMBIENTE

En este último capítulo, buscamos esclarecer como un fotón de luz **UV-C** afecta a una cadena de 25 pb, simplificando el problema a **DM**. La reducción del sistema a **DM**, la pensamos suficiente para representar la disipación de la energía de excitación de un fotón **UV-C** debido a las conclusiones de la revisión teórica que hicimos en el capítulo 5. La desexcitación ultrarápida del **ADN** a través de la intersección cónica es el mecanismo con mejor eficiencia cuántica. Este proceso de relajación deposita ~ 4 eV en el estado base (dependiendo de la longitud de onda del fotón (230-290 nm). Esta energía que *calienta* a la base ~ 2500 K puede ser clave para la desnaturalización.

El proceso propuesto **UVTAR**, establece que las moléculas de **ADN**, en la superficie del mar Arqueano, al interactuar con luz ultravioleta durante el día y tomando ventaja de la temperatura del agua, podrían reproducirse de forma circadiana. El sol proporcionaba la energía suficiente para funcionar como un potencial químico para darle emergencia al proceso replicativo. Suponemos una molécula de **ADN** que esta parcialmente desnaturalizada por la temperatura de su solvente. Esta a su vez interactúa con luz **UV-C**. Entonces, la molécula se excita por un fotón **UV-C**, que se absorbe en una de las bases que forman la molécula doble y esta alcanza un estado excitado $S_{\pi\pi^*}$ [53, 93]. En este estado energético, ocurre una conversión interna ultrarápida, mediada por una deformación en el anillo planar de la base donde se absorbió el fotón. Esta deformación tiene lugar en un estado energético degenerado que comparte el estado $S_{\pi\pi^*}$ con el estado base. A este estado degenerado se le conoce como intersección cónica. Después, la energía depositada en el estado base que está por encima de 3.5 eV y depende de la base en cuestión [55] se enfría vibracionalmente, disipándose en el resto de la cadena y el solvente.

En **DM** no hay estados electrónicos que permitan observar las deformaciones planares que llevan a la molécula al estado base. Pero, podemos proponer modelar la deposición energética de un fotón **UV-C**, como energía vibracional. Asumiendo que la energía de este fotón fue depositada inicialmente en una sola base [53, 93], podemos escalar las velocidades de los átomos de la base hasta alcanzar la energía de deposición. Entonces, simular la relajación vibracional de este exceso de energía en el estado base, observando el efecto mecánico de la disipación de un potencial clásico, derivado de calculos experimentales (cuánticos).

Previo a este capítulo, vimos las posibles etapas de desnaturalización de un oligo de 25 pb con **DM**. Del último experimento computacional del **Capítulo 6** seleccionamos una condición inicial, la dinámica de los átomos del **ADN**

afectados por temperatura (430 K). Nos fijamos que la cadena en agua salada tuviera 30 enlaces de hidrógeno (aproximadamente el 50 % de los enlaces rotos), y la consideramos parcialmente desnaturalizada. Este ADN lo pusimos en agua a una temperatura de 340 K, su temperatura de desnaturalización y escalamos las velocidades de una (ó cuatro) de sus bases. Elegimos perturbar bases de guanina por dos razones, uno, perturbaríamos el tipo de enlaces más fuertes y dos, las purinas (A, G) absorben mayor cantidad de luz UV-C.

Para escalar las velocidades de la guanina estudiamos su excitación. Los estados de la densidad electrónica HOMO y LUMO de la guanosina (ver Figura 28) debieran darnos una idea de como la energía de excitación se distribuye en la base. Ya que la ribosa solamente contiene enlaces σ la densidad electrónica no se ve afectada al excitarse, la energía tendrá preferencia por mantenerse en los enlaces π . Entonces, la energía la distribuiremos solamente en aquellos átomos que se ven afectados en las densidades electrónicas. Es claro que la energía debiera ser proporcional a como esta distribuida en los orbitales en HOMO y LUMO.

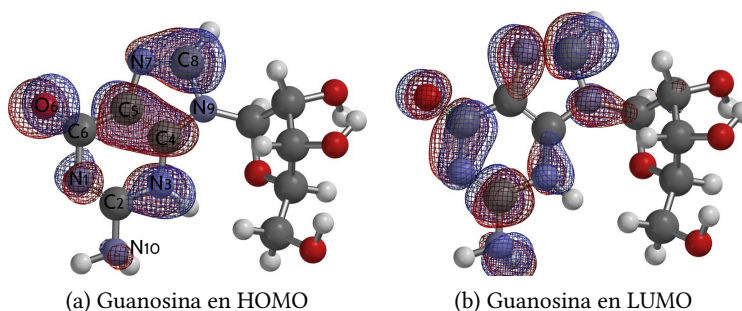


Figura 28: Orbitales moleculares de la Guanosina. a) Representa la superficie gráfica del orbital molecular ocupado más alto. b) Es la superficie electrónica del orbital más bajo no ocupado es decir el estado excitado. Calculados con un método funcional (B3LYP, Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr). Crédito de imágenes: Quora, 2014.

Para simplificar el cálculo, distribuimos la energía solo en los átomos que sufren una modificación en la superficie electrónica (ver Figura 28). Entonces, un fotón de 4.77 eV (260 nm) a primera aproximación tiene una energía, $E = h\nu = 3/2NK_B T = \sum_{i=1}^N 1/2m_i V_i^2$, que se distribuirá sobre solo los átomos de la guanina (N₁, C₂, N₃, C₄, C₅, C₆, N₇, C₈, N₉, N₁₀, O₆, H₁, H₂₁). Además, al hablar de velocidades en DM se debe tener en consideración la dirección de la velocidad, ya que el sistema esta definido por las posiciones y velocidades. Decidimos quitar dos grados de libertad en la energía cinética, escogiendo la velocidad en uno de los ejes por simplicidad.

De acuerdo con $E = 3/2NK_B T = \sum_{i=1}^N 1/2m_i V_i^2$, donde V es la norma velocidad del i -ésimo átomo, podemos escalar las velocidades de dos for-

mas en general. Una forma es mediante la distribución de velocidades de Maxwell-Boltzmann,

$$p(V_i) = 4\pi \sqrt{\left(\frac{m_i}{2\pi k_B T}\right)^3} V_i^2 \exp\left(-\frac{m_i V_i^2}{2k_B T}\right) \quad (14)$$

donde la temperatura T , la obtenemos despejando de la ecuación de la energía, donde N es el número de átomos que consideramos para distribuir la energía, $K_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ es la constante de Boltzmann y m_i la masa depende del átomo. Esta distribución de velocidades se obtiene de la estadística de Maxwell-Boltzmann. La distribución será diferente para cada uno de los átomos de la guanina. La temperatura, $T = 36,891.72 \text{ K/N}$, la dividimos equitativamente entre el número de átomos afectados, si $N = 13$, entonces, la temperatura es de unos 2837.83 K . En la [Figura 29](#) podemos ver tales distribuciones, para cada átomo.

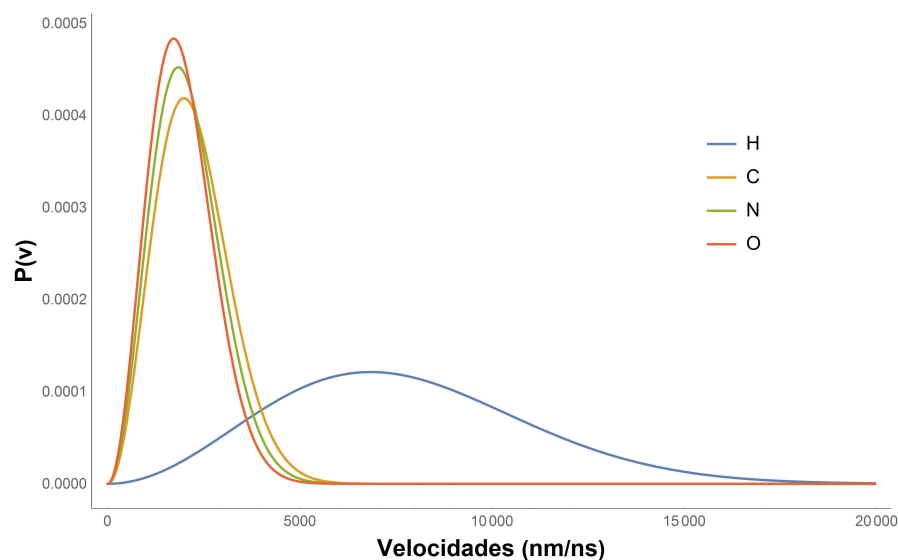


Figura 29: Distribuciones de velocidades de Boltzmann para cada átomo de guanina. La línea azul representa la distribución para los átomos de hidrógeno, la línea amarilla para los átomos de carbono, la línea verde para los átomos de nitrógeno y la línea naranja para los átomos de oxígeno.

La otra forma para escalar las velocidades es tomando la energía y distribuirla de igual manera en los átomos e igualarla a la energía cinética de un átomo en específico obteniendo la velocidad, $2E/N = m_i V^2$. Los valores de las velocidades que obtuvimos con este último método son de 2 al 14 % diferentes del valor esperado de la distribución, ya que debe de estar cerca de la media para representar la energía que adquirió la base, nos pareció que este método sería más eficiente o bien, tomar los valores esperados de las distribuciones. Después de cambiar las velocidades de las moléculas dejamos que

la dinámica continuara.

Encontramos que después de 40 ns del estímulo no ocurría un cambio en la dinámica respecto a la desnaturalización, siendo estable y hasta recuperando algunos de los enlaces de hidrógeno lo que nos hizo concluir que el potencial [AMBER](#) no es apto para tal representación.

Nuestra hipótesis principal era saber si la transferencia de *calor* en [ADN](#) podía ser modelada de manera sencilla con las herramientas que hemos presentado. El objetivo de las dinámicas realizadas era probar que afectaríamos la estructura de manera abrupta y permanente en favor de la desnaturalización. Este es un problema no trivial y necesita de ser revisado a mayor detalle. Sin embargo, este trabajo da una idea general poniendo en orden las ideas y principios teóricos de la interacción de luz [UV-C](#) y el [ADN](#) enfocados en aportar información al proceso [UVTAR](#).

La representación que esperábamos era posiblemente la deformación de las bases que permitieran el rompimiento de enlaces de hidrógeno y que debilitaran la cadena perturbando las fuerzas de apilamiento, haciendo su temperatura de desnaturalización menor a la inicial o simplemente acelerar la desnaturalización.

Al romper con un enlace de hidrógeno la temperatura de desnaturalización del resto de la cadena que permanece en doble helice se reduce y esperamos que si pasaba esto en la dinámica, ocurriera efecto inverso de apertura de cierre (una vez que comenzara la desnaturalización). Sin embargo, observamos que se renaturaliza fácilmente. Nuestro trabajo nos ayudo a comprender que probablemente la desnaturalización en el proceso [UVTAR](#) no se realice con un solo fotón como pensábamos inicialmente, hay mayor probabilidad de que sean procesos acoplados donde la desnaturalización se ve mayormente beneficiada si más de un fotón perturba la cadena. Esto es válido si el potencial [AMBER](#) representa el sistema descrito de forma adecuada o similar dado a las condiciones dadas. Además, la dinámica omite la existencia de mecanismos colectivos inducidos por la activación de luz [UV-C](#). Mecanismos como: transferencia de protones, que altere la distribución de carga y se produzca un EDPT, transferencia de energía, dimerización, entre otros [ver [Capítulo 5](#)].

Si quisiéramos simular la transferencia de energía a lo largo de la cadena de ADN, aparte de las interacciones de solvente-molécula que son bien aproximadas con [DM](#), se necesita tener en consideración mínimo dos fenómenos. Uno son las energías de sitio, representadas por los potenciales de ionización, mismas que se traducen en que tan atractivas son las bases para la carga. El otro tipo de fenómeno es el apareamiento de electrones para poder representar que tan bien las nucleobases comparten y transfieren la carga.

Existen muchos métodos químico-cuánticos para calcular estos parámetros uno de los más relevantes es Density Functional Theory (DFT); esta teoría también puede ser dependiente del tiempo y relativista. Existen muchas variantes de DFT, por ejemplo: self-consistent charge density functional tight-binding (SCC-DFTB) que permitirán diferentes aproximaciones y eficiencias a los parámetros que son de nuestro interés.

Preguntas aún abiertas en la literatura, referente a este tema, son abundantes y tienen gran impacto, tanto como científico, como tecnológico. Preguntas como: ¿Cuál es el mecanismo microscópico real de la transferencia de energía en el ADN? ¿Cuál es la tasa de transferencia y cómo depende de la longitud de la cadena de ADN? ¿Cuál es exactamente el efecto del solvente durante los procesos disipativos y de desnaturalización? entre muchas otras. Contestar preguntas como estas, nos permite analizar los procesos fundamentales de la desactivación y sus consecuencias en el ADN y sus posibles aplicaciones. Podríamos estudiar posibles procesos emergentes como UVTAR como consecuencia de la efectividad del ADN para disipar energía en el rango UV-C. Otros procesos emergentes de este fenómeno disipativo de luz UV-C pueden ser la programación de enzimas en el ADN y ARN.

CONCLUSIONES

La replicación del ADN asistida por calor y luz ultravioleta (UVTAR) es un mecanismo no enzimático, propuesto por la teoría termodinámica disipativa del origen de la vida [11-13, 27, 47, 111]. Describe la emergencia de la replicación de ADN y ARN asociado con la disipación de luz ultravioleta prevalente en la superficie terrestre durante el Arqueano (el ecuador $5.5\text{W}/\text{m}^2$ [31]). UVTAR es un proceso circadiano, que aprovecha los estados metaestables de la desnaturalización parcial del ADN provocados por la temperatura del solvente; y de la luz UV-C que le da la energía suficiente para separar por completo las cadenas dobles durante el día Arqueano. Esta separación o desnaturalización total de las cadenas es el primer paso para replicar el ADN.

La finalidad de este trabajo fue establecer bases teóricas del proceso de desnaturalización propuesto en UVTAR. Comenzamos por hacer un cálculo termo-geométrico, encontramos que al disipar la energía correspondiente a un fotón de 260 nm (4.77 eV) en agua que contiene ADN en principio es posible desnaturalizar 14 pares de bases. Haciendo el mismo cálculo para un volumen elipsoidal e introduciendo la conductividad térmica del ADN y del agua como constantes para la disipación de la energía, encontramos que 228 pares de bases pudieran ser afectados por dicha energía.

Desde la perspectiva teórica, estudiamos los procesos fotofísicos y fotoquímicos en el proceso disipativo del ADN al interactuar con luz UV-C. Los procesos posiblemente más relevantes en la desnaturalización inducida por la excitación del ADN al estado $S_{\pi\pi^*}$ por luz UV-C son:

1. *La desexcitación ultrarápida.* Este proceso con la mejor eficiencia cuántica nos hace creer que es el más relevante para la desnaturalización en UVTAR. Primero, la conversión interna implica la deformación de los anillos planares y del grupo amino de las bases nucleótidas [56-60], que debilitan la fuerza de apilamiento y los enlaces de hidrógeno. Seguido de esta deformación, se llega a un estado energético degenerado entre el estado excitado y el estado base. En esta intersección cónica, la energía de excitación se pone a disposición de los modos vibracionales de la molécula. Esta energía vibracional podría romper de manera definitiva los enlaces de hidrógeno.
2. *La desprotonación.* La transferencia de protones inducida por un fotón UV-C entre pares de bases [83-86], podría llevar al rompimiento de enlaces de hidrógeno y la subsecuente separación de los pares de bases. Por otro lado, si ocurre una desprotonación por la pérdida de un electrón seguida del protón al final de una cadena por transferencia de carga, podría facilitar la desnaturalización del ADN.

3. *La dimerización.* Este último fenómeno es otra posible explicación a la desnaturalización local con menor eficiencia cuántica. La formación de dímeros, al interactuar con luz UV-C (254nm), promoverán la deformación de la estructura helicoidal del ADN. Estos dímeros se revierten a monómeros, unidos por el esqueleto, al interactuar con luz UV de baja longitud de onda, 238 nm, recuperando la cadena plantilla.

Además, otro fenómeno en la disipación de luz UV-C en el ADN es la transferencia de energía. Esta pudiera jugar un papel muy importante en la desnaturalización. Creemos que esta energía se puede distribuir y hacer un efecto colectivo para desnaturalizar el ADN. La deslocalización de la energía de excitación llega alejarse hasta 200 pb del sitio de deposición [5, 6]. Su distribución pudiera perturbar de forma suficiente para comenzar una desnaturalización en el proceso difusivo añadiéndole una fuerza en una dirección.

La descripción teórica del proceso de desexcitación ultrarápida del ADN, nos llevo a pesar que tendríamos una buena aproximación del sistema de ADN en agua salada con DM. La alta energía vibracional depositada en el estado base, podría ser suficiente para perturbar por lo menos un enlace de hidrógeno y comenzar la desnaturalización, esto se puede representar como un efecto mecánico en las moléculas con DM. Para poder representar el fenómeno en DM propuesto por UVTAR era necesario observar la desnaturalización por temperatura. Fue aquí donde empezamos a notar las potenciales deficiencias del potencial AMBER en DM para simular el sistema.

No hay un consenso en la constante de tiempo de la desnaturalización del ADN [105, 106]. Encontramos varios modelos y datos experimentales que nos dan aproximaciones de la constante de desnaturalización para la cadena de 25 pb que usamos en los experimentos computacionales. Estos resultados, sugieren que la constante de desnaturalización varía desde unos cuantos nanosegundos hasta el orden de microsegundos. La diferencia entre estos resultados y la colección de este análisis sugiere que es necesario revisar a profundidad el fenómeno de desnaturalización por temperatura. Sugerimos, nuevos experimentos, con técnicas actuales, que busquen la constante de desnaturalización para cadenas cortas y largas. Además, de la revisión del potencial AMBER que se dice tiene la mejor descripción para el ADN.

Al no lograr la desnaturalización del 50 % del ADN de 25 pb a la temperatura de desnaturalización en DM durante 300 ns; decidimos aumentar la temperatura. Logramos observar las posibles etapas de desnaturalización y obtuvimos la condición inicial para la desnaturalización propuesta en UVTAR. Obtuvimos el ADN desnaturalizado parcialmente por temperatura del solvente. Después, bajamos la temperatura a la temperatura de desnaturalización y colocamos el estímulo mecánico que representa la energía depositada en el estado base por la intersección cónica.

No observamos un cambio abrupto en el sistema, como esperábamos. Por el contrario esperamos 40 ns donde en promedio la dinámica fue estable. Por lo que consideramos que los efectos de la interacción no se pueden observar a esa escala temporal o bien en la dinámica molecular con el potencial [AMBER](#).

La [DM](#), omite el proceso de deformación de las bases que pudiera ser determinante para la desnaturalización, por lo que debe hacerse una dinámica que incluya este proceso. Existen varios métodos como [TDDFT](#) y sus derivados (u otros métodos) que podrían permitir este futuro cálculo.

El trabajo a seguir para la comprensión de la desnaturalización propuesta por [UVTAR](#) requiere de: 1) estudiar la tasa de reacción en la desnaturalización a T_m 2) observar si el estímulo propuesto hace una diferencia en esta tasa, y finalmente 3) observar los efectos en la renaturalización, como las colisiones aleatorias del solvente que maximicen las fuerzas de apilamiento para el beneficio de la estructura de doble hélice y ver la tasa de ocurrencia en la renaturalización, esto con la finalidad de comprender los estados metaestables que ocurren en la dinámica del [ADN](#).

Este trabajo espera reflejar la importancia de entender procesos básicos disipativos de los estados excitados del [ADN](#) por luz [UV-C](#) y la implicación en la emergencia del proceso [UVTAR](#). Esperamos que esta recopilación de simulaciones, experimentos y razonamientos, sean de ayuda para futuros estudios en el análisis del proceso de la replicación que emerge tras la disipación del potencial fotónico que brinda la luz solar; al mismo tiempo que sirva de motivación para buscar más procesos primitivos emergentes en la aparición y evolución de la vida. La teoría termodinámica disipativa del origen y evolución de la vida precisa de entender a profundidad el proceso de transferencia de energía ya que se basa en la disipación de la energía de los fotones de la luz solar. Finalmente, es consistente con lo que sabemos de procesos irreversibles la transferencia y transformación de la energía a nivel cuántico-molecular dando lugar a la estructuración y surgimiento de la vida.

A.1 APROXIMACIÓN CLÁSICA A LA DINÁMICA MOLECULAR, CAMPOS DE FUERZA

Para definir y entender las interacciones moleculares existen diversas formas analíticas de describirlas, siendo las principales herramientas la mecánica cuántica y la mecánica estadística. La forma más adecuada para hacer dinámica molecular es resolver la ecuación (relativista) de Schrödinger dependiente del tiempo,

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (15)$$

con la cual, la estructura electrónica podría ser descrita por completo, sin embargo, hay muchas limitantes. La solución a la mayoría de los problemas no está disponible analíticamente y las aproximaciones son cálculos sumamente costosos computacionalmente o simplemente la tecnología no cumple con las características para poder resolverlos. Casos sencillos, como el de unos cuantos átomos en estado base, pueden ser estudiados por métodos como *ab initio*, *DFT*, entre otros.

La dinámica molecular también se estudia estadísticamente. Dada la energía potencial superficial($E(\mathbf{r}_i)$, donde \mathbf{r}_i es la posición del i –ésimo átomo) la función de partición,

$$Z = \int d^{3N} \mathbf{r} \exp \frac{E(\mathbf{r}_i)}{k_B T} \quad (16)$$

proporciona los posibles estados del sistema, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura. La integral a resolver es de altas dimensiones y resolverla en fragmentos requiere gran poder computacional y algoritmos muy eficientes.

Existe un estudio analítico mucho más sencillo para describir la mecánica molecular, o bien, cálculos de campos de fuerza para reducir el problema cuántico a clásico. La principal aproximación es la de Born-Oppenheimer que establece que la dinámica de los electrones es tan rápida que pueden reaccionar instantáneamente al movimiento de los núcleos, como consecuencia pueden ser tratados por separado. Además, siendo que la diferencia de las masas es muy grande, permite tratar a los núcleos clásicamente y a la interacción de núcleos con electrones como efectos de energías potenciales superficiales representando (generalmente) al estado base. Entonces el Hamiltoniano molecular,

$$H = T_E + T_N + U(\{\mathbf{r}_i\}, \{\mathbf{R}_n\}) \quad (17)$$

depende de la energía cinética del núcleo del átomo, T_N , de la energía cinética de los electrones, T_E , y de la energía potencial entre el núcleo y los electrones, $U(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_n)$. Utilizando la aproximación de Born-Oppenheimer podemos separar la energía cinética del núcleo de las otras energías, obteniendo así un nuevo Hamiltoniano,

$$H_E = T_E + U(\{\mathbf{r}_i\}, \{\mathbf{R}_n\}) \quad (18)$$

que nos puede brindar la estructura electrónica del átomo. Con esta aproximación podemos tratar a los núcleos clásicamente y estudiar su interacción, esto es, realizar una dinámica molecular con campos de fuerza en donde la energía molecular esté expresada en términos de la posición de los núcleos, es decir, un potencial,

$$V = V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_n) \quad (19)$$

que defina las características de las interacciones entre átomos, con el cual podremos describir nuestra dinámica molecular. La fuerza del i -ésimo átomo en función de su posición es,

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (20)$$

la fuerza total se puede obtener calculando las contribuciones de las fuerzas entre los pares de átomos no enlazados,

$$\mathbf{F}_i = \sum_j \mathbf{F}_{ij} \quad (21)$$

más las fuerzas debidas a las interacciones de enlace (que puede depender de 1 a 4 átomos), también adhiriendo las fuerzas restrictivas o externas.

Los potenciales estarán definidos empíricamente de acuerdo a la interacción con otros átomos, estos cálculos pueden ser teóricos o experimentales, tal como los son los potenciales de: polarización del átomo V_{shell} , atadura de partículas V_{teth} , enlace químico V_{bond} , ángulo entre tres átomos V_{angle} , ángulo diedro (impropios) entre cuatro átomos V_{dihd} , ángulo de inversión V_{inv} ; dos, tres y cuatro cuerpos, V_{2-body} , V_{3-body} , V_{4-body} , Tersoff $V_{Tersoff}$ y externos V_{extn} .

$$\begin{aligned}
V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N) = & \sum_{i_{\text{shell}}=1}^{N_{\text{shell}}} V_{\text{shell}}(i_{\text{shell}}, \mathbf{r}_{\text{core}}, \mathbf{r}_{\text{shell}}) \\
& + \sum_{i_{\text{teth}}=1}^{N_{\text{teth}}} V_{\text{teth}}(i_{\text{teth}}, \mathbf{r}_i^{t=t}, \mathbf{r}_i^{t=0}) \\
& + \sum_{i_{\text{bond}}=1}^{N_{\text{bond}}} V_{\text{bond}}(i_{\text{bond}}, \mathbf{r}_a, \mathbf{r}_b) \\
& + \sum_{i_{\text{angle}}=1}^{N_{\text{angle}}} V_{\text{angle}}(i_{\text{angle}}, \mathbf{r}_a, \mathbf{r}_b, \mathbf{r}_c) \\
& + \sum_{i_{\text{dihd}}=1}^{N_{\text{dihd}}} V_{\text{dihd}}(i_{\text{dihd}}, \mathbf{r}_a, \mathbf{r}_b, \mathbf{r}_c, \mathbf{r}_d) \\
& + \sum_{i_{\text{inv}}=1}^{N_{\text{inv}}} V_{\text{inv}}(i_{\text{inv}}, \mathbf{r}_a, \mathbf{r}_b, \mathbf{r}_c, \mathbf{r}_d) \\
& + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N V_{2\text{-body}}^{(\text{metal,vdw,electrostatics})}(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|) \\
& + \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \sum_{k \neq j}^N V_{\text{tersoff}}(i, j, k, \mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) \\
& + \sum_{i=1}^{N-2} \sum_{j>i}^{N-1} \sum_{k>j}^N V_{3\text{-body}}(i, j, k, \mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) \\
& + \sum_{i=1}^{N-3} \sum_{j>i}^{N-2} \sum_{k>j}^{N-1} V_{4\text{-body}}(i, j, k, n, \mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k, \mathbf{r}_n) \\
& + \sum_{i=1}^N V_{\text{extn}}(i, \mathbf{r}_i, \mathbf{v}_i)
\end{aligned} \tag{22}$$

las r 's representan las coordenadas o posición del átomo en cuestión representados puntualmente. Al resolver esta ecuación deben incluirse, también, la temperatura, la fuerza de tensión, la presión, la viscosidad, en la siguiente sección se describe como podemos incluir la temperatura y después la presión. En esta tesis se realizaron dinámicas moleculares con el campo de fuerza llamado **AMBER** traducido como modelo de construcción asistida y refinamiento de energía.

El potencial **AMBER** se resume a cuatro interacciones principales, tres de ellas intramoleculares y un potencial Van der Waals que representará las fuerzas intermoleculares. La forma funcional de **AMBER** para N moléculas es,

$$\begin{aligned}
V(r^N) = & \sum_{\text{bounds}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{\text{dihedrals}} \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
& + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N f_{ij} \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}
\end{aligned} \tag{23}$$

el primer término es la suma de las interacciones covalentes de las moléculas este es aproximado a un oscilador armónico que es válido cerca de la longitud de equilibrio (r_0) donde la constante de elasticidad (k_r) se obtiene empíricamente. Análogamente el segundo término es la suma de los osciladores que representan la energía de los orbitales electrónicos involucrados en los enlaces covalentes, también válido cerca del ángulo de reposo (θ_0). El tercer término es la suma de las interacciones de ángulos de torsión o diedros [ver [Figura 30](#)].

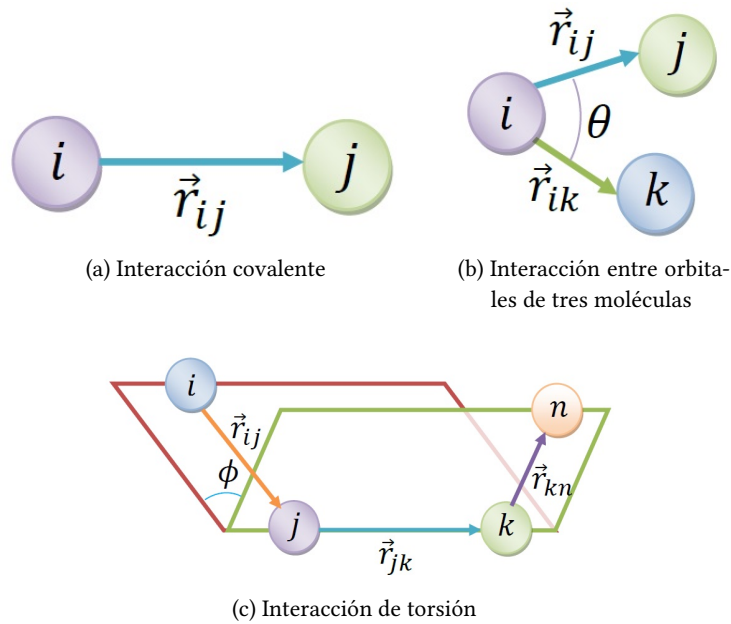


Figura 30: Aproximación de interacciones moleculares

Un enlace puede tener más de una interacción de ángulos diedros es por ello que se representa en serie de Fourier. La amplitud o constante diedral es V_n , la periodicidad del ángulo es n y la fase del ángulo diedro ϕ es γ . Por último las interacciones de no enlace están representadas por la interacción electrostática entre pares de partículas separadas por una distancia r_{ij} con cargas q_k y las interacciones de Van der Waals o de Lenard-Jones, donde ϵ_{ij} es la profundidad del potencial de la parte atractiva, r_{0ij} es la distancia en la que el potencial se encuentra en el mínimo y r_{ij} es la distancia a la que se encuentran un par de partículas. Por último quiero mencionar

que los dos términos del potencial de Lenard-Jones resultan de dos principios físicos, el primero es la repulsión de Pauli, es cuando las distribuciones de densidades electrónicas se traslapan y produce una repulsión electrónica muy grande a cortas distancias esto se puede expresar como $V_{rep} = Ae^{-cr}$ con A y c constantes y r la distancia inter-molecular. Pero en un líquido esto se puede aproximar al primer término del potencial de Lenard-Jones. Mientras, el segundo término es debida a la dispersión de London o la interacción dipolo-dipolo, estos dipolos no necesariamente tienen que existir de manera definitiva, también pueden ser los dipolos inducidos instantáneamente por la distribución electrónica donde la interacción es inversamente proporcional a r_{ij}^6 .

A.2 ACOPLAMIENTO DE PRESIÓN, PARRINELLO-RAHMAN

La **DM** es una herramienta que nos brinda la dependencia temporal y magnitud de las fluctuaciones en las posiciones y momentos, mismas que serán dependientes de cambios de presión y temperatura. Aquí veremos la propuesta de el método para encontrar fluctuaciones en un Ensamble isoentálpico e isobárico (**NPH**) [112], análogo a un Ensamble isobárico e isotérmico (**NPT**) que veremos en la siguiente sección, que simplifica y no sacrifica la dinámica molecular. Generalmente en **DM** se pueden simular pocas moléculas interactuando, por ejemplo una gota de agua. Para deshacernos de las interacciones en la frontera superficial, como la tensión en la superficie, se proponen condiciones de frontera periódicas, algo así como una red de interacción para cualquier montículo de moléculas (átomos, partículas) en cuestión para que cualquier punto sienta la misma interacción.

Nuestro sistema consiste de N partículas contenidas en una celda que se repite periódicamente para llenar el espacio. Esta celda de forma arbitraria de volumen V puede describirse por tres vectores $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ que en general tienen diferentes longitudes y orientaciones. Podemos poner estos vectores en una matriz de 3×3 $\mathbf{y} = \{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$, tal que, el volumen esté dado por, $V = \|\mathbf{y}\| = \mathbf{a} \cdot (\mathbf{b} \times \mathbf{c})$. La posición de la i -ésima partícula \mathbf{r}_i puede ser escrita en términos de \mathbf{y} y un vector columna $\mathbf{s}_i = (\alpha_i, \beta_i, \gamma_i)$ como,

$$\mathbf{r}_i = \mathbf{y}\mathbf{s}_i = \alpha_i\mathbf{a} + \beta_i\mathbf{b} + \gamma_i\mathbf{c} \quad (24)$$

las componentes del vector \mathbf{s}_i están entre $(0,1)$. Ya que nuestro sistema es 'infinito' las partículas imagen están definidas como $\mathbf{s}_i + (\lambda + \mu + \nu)$ con $\lambda, \mu, \nu \in \mathbb{Z}$. La distancia entre las partículas i y j es,

$$\mathbf{r}_{ij} = \sqrt{(\mathbf{s}_i - \mathbf{s}_j)' \mathbf{G} (\mathbf{s}_i - \mathbf{s}_j)} \quad (25)$$

donde el tensor métrico \mathbf{G} es,

$$\mathbf{G} = \mathbf{y}'\mathbf{y} \quad (26)$$

el espacio recíproco se extiende por los vectores,

$$\frac{2\pi}{V} [\mathbf{b} \times \mathbf{c}, \mathbf{c} \times \mathbf{a}, \mathbf{a} \times \mathbf{b}] \equiv \frac{2\pi}{V} \sigma \quad (27)$$

$\sigma = \mathbf{V}\mathbf{y}'^{-1}$ es la matriz que contiene la información de la celda, también recordemos que la prima representa la traspuesta de un vector o matriz. La evolución temporal de las $3N + 9$ variables (9 componentes de \mathbf{y}) está dada por el lagrangiano [113],

$$\mathcal{L} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \dot{\mathbf{s}}_i' \mathbf{G} \dot{\mathbf{s}}_i - \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \phi(r_{ij}) + \frac{1}{2} \mathbf{W} \text{Tr}(\dot{\mathbf{y}}' \dot{\mathbf{y}}) - \mathbf{P}V \quad (28)$$

la primera parte del lagrangiano es la energía cinética al igual que el tercer término asociada a la variación de \mathbf{y} en el tiempo con una constante de proporcionalidad que determina la fuerza de acoplamiento. Este parámetro depende del tamaño de la celda o caja, de la compresibilidad isotérmica $\epsilon = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_{NT}$ y la constante de tiempo para la presión τ_p , (Les la longitud del elemento más largo de la caja) y tiene dimensiones de masa entonces,

$$(\mathbf{W}^{-1})_{ij} = \frac{4\pi^2 \beta_{ij}}{3\tau_p^2 L} \quad (29)$$

regresando a las partes del lagrangiano la parte potencial está descrita por el segundo término, mientras que el último término representa la energía por la presión del sistema. Podemos obtener las ecuaciones de movimiento con,

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \dot{\mathbf{y}}} \right) - \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \mathbf{y}} \quad (30)$$

notemos que todos los términos del lagrangiano se usarán para derivar la ecuación de movimiento, desglosando,

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \dot{\mathbf{y}}'} \right) = \frac{1}{2} \mathbf{W} \ddot{\mathbf{y}} \quad (31)$$

$$\frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \mathbf{y}'} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \dot{\mathbf{s}}_i' \mathbf{y} \dot{\mathbf{s}}_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{\phi'}{r_{ij}} (\mathbf{s}_i - \mathbf{s}_j)' \mathbf{y} (\mathbf{s}_i - \mathbf{s}_j) - \mathbf{P} \sigma \quad (32)$$

$$= \left(\frac{1}{V} \left(\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \mathbf{v}_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{\phi'}{r_{ij}} \mathbf{r}_{ij}^2 \right) - \mathbf{P} \right) \sigma \quad (33)$$

por lo que podemos concluir que,

$$\ddot{\mathbf{y}} = \mathbf{W}^{-1} \sigma (\Pi - \mathbf{P}) \quad (34)$$

esta ecuación es el reajuste del volumen por el cambio de presión, donde Π es la presión de cambio y \mathbf{P} es la presión de referencia. Análogamente podemos encontrar la ecuación de movimiento para $\dot{\mathbf{s}}_i$, si cambiamos las coordenadas a r_i el resultado es,

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} - \mathbf{M} \frac{d\mathbf{r}_i}{dt} \quad (35)$$

con $\mathbf{M} = \mathbf{y}^{-1} \left[\mathbf{y} \frac{d\mathbf{y}'}{dt} + \frac{d\mathbf{y}}{dt} \mathbf{y}' \right] \mathbf{y}'^{-1}$.

A.3 DINÁMICA MOLECULAR CON UN BAÑO TÉRMICO, TERMOSTATO DE BERENDSEN

El método de acoplamiento débil de Berendsen es utilizado frecuentemente para regular la temperatura y la presión de un sistema [114]. Este método permite un decaimiento exponencial de un valor instantáneo a un valor específico. La distribución de temperaturas y presiones no corresponde a ningún ensamble mecánico-estadístico. El método es mejor aprovechado para etapas cercanas al equilibrio, ya que este converge más rápidamente y puede ser útil para la estabilización de sistemas que puedan estar fuera de equilibrio. Se considera un sistema acoplado a un baño térmico con una temperatura T_0 fija. El acoplamiento es llevado a cabo al sumar un término estocástico y un término de fricción a la ecuación de movimiento, obteniendo así una ecuación de Langevin,

$$m_i \dot{v}_i = F_i - m_i \gamma_i v_i + R(t) \quad (36)$$

en donde F_i es la fuerza sobre el sistema, R_i es la variable Gaussiana estocástica con una media(promedio) igual a cero e intensidad,

$$\langle R_i(t) R_j(t + \tau) \rangle = 2m_i \gamma_i k_B T_0 \delta(\tau) \delta_{ij} \quad (37)$$

Esta ecuación físicamente corresponde a colisiones entre partículas que forman un gas ideal a temperatura T_0 . Las constantes de amortiguamiento γ_i determinan la fuerza del acoplamiento al baño térmico.

Debido a que la ecuación de Langevin no sólo acopla al sistema con el baño térmico de manera global, sino de manera local también, debemos modificar la [Ecuación 36](#) de Newton si deseamos que la perturbación local sea mínima.

Consideremos entonces cómo cambia la temperatura T del sistema bajo la influencia de un acoplamiento estocástico. Por conveniencia escogemos que los coeficientes de fricción γ_i sean iguales para todas las partículas, $\gamma_i = \gamma$. La dependencia temporal de T puede ser obtenida a partir de la derivada de la energía cinética total E_k ,

$$\frac{dE_k}{dt} = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left[\frac{\sum_{i=1}^{3N} \frac{1}{2} m_i v_i^2(t + \Delta t) - \sum_{i=1}^{3N} \frac{1}{2} m_i v_i^2(t)}{\Delta t} \right] \quad (38)$$

donde N es el número de partículas, y

$$\Delta v_i = v_i(t + \Delta t) - v_i = \frac{1}{m} \int_t^{t+\Delta t} [F_i(t') - m_i \gamma_i v_i(t') + R_i(t')] dt \quad (39)$$

utilizando el hecho de que $R_i(t')$ no se encuentra relacionado con $v_i(t)$ y $R_i(t)$ para $t' > t$ y haciendo uso de [Ecuación 37](#),

$$\sum_{i=1}^{3N} \int_t^{t+\Delta t} dt' \int_t^{t+\Delta t} dt'' R_i(t') R_i(t'') = 6N\gamma k_B T_0 \Delta t \quad (40)$$

Obtenemos que,

$$\frac{dE_k}{dt} = \sum_{i=1}^{3N} v_i F_i + 2\gamma \left(\frac{3N}{2} k_B T_0 - E_k \right) \quad (41)$$

el primer término del lado derecho corresponde a menos la derivada temporal de la energía potencial, mientras que el segundo término corresponde a un término adicional de acoplamiento global al baño térmico. En términos de la temperatura T este término extra es,

$$\left(\frac{dT}{dt} \right)_{\text{baño}} = 2\gamma(T_0 - T) \quad (42)$$

lo que significa que la desviación del sistema de la temperatura T_0 decae exponencialmente con la de tiempo τ_T que es $(2\gamma)^{-1}$.

Retomando la [Ecuación 36](#) y sin considerar los términos estocásticos, vemos que el acoplamiento global adicional de temperatura sea tal que cumpla con la [Ecuación 42](#) puede ser obtenido por,

$$m_i \dot{v}_i = F_i + m_i \gamma \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right) v_i \quad (43)$$

Usando la expresión anterior obtenemos que,

$$\frac{dE_k}{dt} = \sum_{i=1}^{3N} m_i v_i \dot{v}_i = \sum_{i=1}^{3N} v_i F_i + 3N\gamma k_B (T_0 - T) \quad (44)$$

La cual es equivalente a la [Ecuación 41](#), por tanto consideramos a la [Ecuación 43](#) como a nuestra ecuación modificada de movimiento que presenta un escalamiento (a primer orden) en las velocidades por unidad de tiempo en el algoritmo de v a λv con,

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right) \quad (45)$$

El cambio en la temperatura por paso en el algoritmo, también puede ser hecho exactamente igual a $(T_0 - T)\Delta t/\tau_T$ produciendo,

$$\lambda = \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right) \right]^{1/2} \quad (46)$$

escalando las velocidades según,

$$v_i(t) = \lambda v_i(t) \quad (47)$$

A.3.0.1 Acoplamiento de temperatura, re-escalamiento de velocidades

Un termostato con re-escalamiento de temperatura [115] es un termostato de Berendsen con un término estocástico adicional que corrige la distribución energía cinética,

$$dE_k = (E_{k_0} - E_k) \frac{dt}{\tau} + 2 \sqrt{\frac{E_{k_0} E_k}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau}} \quad (48)$$

donde N_f son los grados de libertad que pueden ser calculados de,

$$N_f = 3N - N_c - N_{cm} \quad (49)$$

N_c es el número de constricciones impuestas sobre el sistema, N_{cm} son los grados de libertad que se restan por ser constantes de movimiento de las velocidades de los centros de masa, en general son 3 pero si el sistema está en vacío son 6 contando la rotación. Por último dW es el ruido de Wiener, este incremento Markoviano, Gaussiano o con distribución normal con media cero y varianza μ , $W_{t+\mu} - W_t \sim \mathcal{N}(0, \mu)$. Podemos observar que si quitamos la segunda parte de la [Ecuación 48](#) se convierte en la [Ecuación 44](#), recordando que $E_k = 1/2 N_f k_B T$.

A.4 ALGORITMO GLOBAL DE DINÁMICA MOLECULAR

Para obtener la dinámica molecular de un sistema, primero, debemos definir cual es el potencial que definirá nuestro sistema, que contendrá todas las interacciones posibles deseadas. El sistema se definirá por las posiciones y velocidades iniciales de cada molécula. En general, las posiciones iniciales están definidas por la estructura cristalina, en nuestro caso el ADN y el solvente, el agua se acomoda inicialmente de manera simétrica. Las velocidades son asignadas por la distribución de Maxwell-Boltzmann,

$$p(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2k_B T}\right) \quad (50)$$

con las velocidades atómicas iniciales, tal que, $v_i, i = 1, \dots, 3N$ a una temperatura absoluta T dada.

Como segundo paso, se calcularán las fuerzas que hay entre pares de átomos enlazados y no enlazados, más las restricciones o fuerzas externas además de calcular el tensor de presión. En este paso, la búsqueda de vecinos se da a partir de interacciones, es decir, se define que un grupo es vecino de otro, si el centro geométrico de un grupo se encuentra dentro del radio de corte definido por un tipo de interacción, por ejemplo, un tratamiento electrostático de largo alcance. Al grupo vecino se le conoce como grupo de amortiguamiento.

El tercer paso es el integrador, se actualiza la configuración. El movimiento de los átomos es simulado resolviendo numéricamente las ecuaciones de

movimiento de Newton. Hay distintos integradores que son eficientes para la dinámica molecular, en cuyo caso solo describiremos los que se usaron en las simulaciones realizadas en esta tesis. El integrador salto de rana que usa las posiciones \mathbf{r} al tiempo t y las velocidades \mathbf{v} al tiempo $t + \frac{1}{2}\Delta t$, actualizándolas usando las fuerzas del potencial [AMBER](#) determinada por las posiciones al tiempo t , entonces,

$$\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\Delta t) = \mathbf{v}(t - \frac{1}{2}\Delta t) + \frac{\Delta t}{m}\mathbf{F}(t) \quad (51)$$

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\Delta t) \quad (52)$$

si expandimos $\mathbf{r}(t + \Delta t)$ en serie de Taylor, con $t = t - \Delta t$ como el tiempo de las posiciones antiguas obtenemos,

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \frac{1}{2}\frac{\mathbf{F}(t)}{m}\Delta t^2 + \mathcal{O}(\Delta t^4) \quad (53)$$

esta ecuación es el algoritmo de Verlet, es reversible temporalmente y es de tercer orden para las posiciones. Las ecuaciones de movimiento son modificados por el acoplamiento de temperatura y presión como lo vimos en las secciones anteriores.

Como último paso se guardan los datos obtenidos, posiciones, velocidades, energías, temperaturas, presiones, etcétera; y se vuelve al paso dos, así hasta que se deseé. En el siguiente apéndice se describirá lo necesario para realizar las dinámicas moleculares realizadas en esta tesis y uno se topa con las definiciones mostradas aquí. Usando el paquete Groningen Machine for Chemical Simulations ([GROMACS](#)).

GROMACS es un paquete de software libre que realiza dinámicas moleculares, como las que vimos en el capítulo anterior, simula las ecuaciones Newtonianas de movimiento para cientos a miles de partículas. Las dinámicas moleculares y cálculos de minimización de energía, pueden modelar biomoléculas y sistemas no biológicos empleando cálculos clásicos y cuánticos.

Aquí describiré los comandos y archivos necesarios para las dinámicas realizadas en esta tesis, usando los algoritmos ya descritos [se pueden encontrar los manuales completos para su uso general [116, 117]].

B.1 COORDENADAS Y TOPOLOGÍA

Para hacer una dinámica molecular primero es necesaria la estructura de nuestro objeto de estudio, un archivo que contenga las coordenadas de cada uno de los átomos de sistema en un formato específico. PDB (**.pdb*) es el formato que se utiliza de manera global en los programas de dinámica molecular (existe otro tipo de archivo propio de **GROMACS** con terminación **.gro*). Los archivos de coordenadas que se utilizaron fueron generados por AVOGADRO [http://avogadro.cc/wiki/Main_Page] y B [<http://casegroup.rutgers.edu/Biomer/>] paquetes de modelado y edición biomolecular de acceso libre. La visualización de las coordenadas, para el ADN de 25 pares de bases, que fueron generadas para las dinámicas, se puede ver en la Figura 1, por lo general estas son estructuras cristalinas que respetan la estructura que se obtiene de impresiones de rayos X.

Un archivo de topología será necesario, mismo que contendrá los parámetros del campo de fuerza (del potencial **AMBER** en nuestro caso) y la conectividad entre los diferentes tipos de átomos y sus combinaciones. Esta conectividad se puede clasificar por residuos químicos; por ejemplo, los nucleótidos del ADN, el archivo los clasifica como DA, DG, DC y DT. Para **GROMACS** existen tres archivos de topologías:

TOPOLOGÍA DEL SISTEMA contiene los atributos constantes generales de cada átomo, puede ser generada por el comando `gmx pdb2gmx` que ofrece los parametros de 16 potenciales distintos, además de poder configurar cualquier otro. Se genera un archivo con terminación **.top* que incluye el campo de fuerza que se seleccionó y las topologías específicas por partes del sistema.

TOPOLOGÍA ESPECÍFICAS archivo con terminación **.itp* se refiere a las distintas topologías del sistema. La topología guiada por el campo de fuerza seleccionado se encuentra en un archivo de este tipo, al igual que

las topologías del disolvente, los iones y las restricciones de las posiciones se encuentran en en archivos de este tipo, todos estos están contenidos en la topología del sistema se les llama con:

```
#include "directorio/nombre.itp"
```

TOPOLOGÍA DE RESIDUOS esta topología con archivos con terminación **.rtp* (residue topology parameter) enlista propiedades como la carga y las topologías de los bloques de construcción de sistemas poliméricos, como los aminoácidos que forman a las proteínas o las bases de los ácidos nucleicos, en general estos son proporcionados por el campo de fuerza que se usará.

La **topología** del sistema se generará con la siguiente línea de comando, proporcionando el archivo de coordenadas que obtuvimos de AVOGADRO y B, señalando el archivo de entrada por `-f` (file). GROMACS nos dará un nuevo archivo de coordenadas al que podemos nombrar como queramos señalando con `-o` (output file) el nombre del archivo que se creará también, le hemos dicho que ignore los hidrógenos del sistema poniendo `-ignh` ,

```
1 $ gmx pdb2gmx -f 25dna_FIXED.pdb -o 25dna_processed.gro
   -ignh
```

GROMACS ha generado tres archivos: el archivo de topología del sistema *topol.top*, un archivo que contiene parámetros para fijar las posiciones de átomos pesados (de mayor número atómico que el hidrógeno) llamado *posres.itp* y las coordenadas de salida con el nombre que hemos decidido con terminación **.gro*.

B.2 PERIODICIDAD, SOLVATACIÓN Y ADICIÓN DE IONES

La siguiente línea de comando es para dar **periodicidad** al sistema, esto es porque nuestra idea es simular ADN en agua, por lo que es conveniente proponer una celda geométrica que contenga nuestro sistema con condiciones de frontera periódicas, centrando el soluto,

```
$ gmx editconf -f 25dna_processed.gro -o 25dna_newbox.gro
   -c -d 0.3 -bt cubic
```

Una vez más `-f` indica el archivo de entrada y `-o` el de salida, `-c` indica que queremos que nuestra molécula se encuentre en el centro de la celda y `-d` es la distancia entre el soluto y la superficie de la celda; por último `-bt` indica la forma geométrica de la celda periódica, en este caso la hemos decidido cúbica.

El programa `gmx solvate` rellena la celda periódica ingresa sus coordenadas en el archivo de coordenadas del sistema y registra el número total

de moléculas generadas en el archivo de topología. La **solvatación** entonces es,

```
$ gmx solvate -cp 25dna_newbox.gro -cs spc216.gro -o
  25dna_solv.gro -p topol.top
```

Los prefijos `-cp` y `-cs` indican el nombre de los archivos de coordenadas del sistema y de las moléculas del solvente respectivamente, gromacs cuenta con un archivo de coordenadas para el agua como solvente `spc216.gro` que se puede utilizar para todos sus modelos. El prefijo en la línea de código `-p` registra el solvente y la cantidad de moléculas de este (en nuestro caso es agua) empleadas en el archivo `topol.top`.

Lo siguiente es adición de **iones**, esto se hace con la finalidad de que el sistema tenga carga eléctrica neutra debido a que en general las moléculas orgánicas tienen carga negativa y la naturaleza siempre tiende a la electro-neutralidad. GROMACS cuenta con un comando para adicionar iones, `gmx genion`. Este comando permite adicionar los iones que uno requiera dependiendo de las necesidades nuestra simulación, cambiar las concentraciones iónicas con propósitos de modificar la dinámica o neutralizar la solución. `gmx genion` reemplaza aleatoriamente moléculas disolventes con iones monoatómicos. El nombre de la molécula de ion debe darse con `-pname`, si el ion es positivo, o `-nname`, si el ion es negativo, indicando el número de iones con `-np/-nn` para positivos y negativos respectivamente, además se puede poner una concentración de sales iónicas con `-conc` (mol/litro) o neutralizar el sistema con `-neutral`. La sección de moléculas de la topología será actualizada como consecuencia, usando `-p`. El tipo de molécula de iones, los nombres de residuos y átomos en todos los campos de fuerza son los nombres de elementos capitalizados sin signo. Esta instrucción necesita un archivo con terminación `*.tpr` generado por el comando `gmx grompp` que es un preprocesador del paquete, lee un archivo de topología molecular, comprueba la validez del archivo, expande la topología de una descripción molecular a una descripción atómica, copia cada molécula según sea necesario.

```
$gmx grompp -f ionsD.mdp -c 25dna_solv.gro -p topol.top
  -o ions.tpr
```

```
$gmx genion -s ions.tpr -o 25dna_solv_ions.gro -p topol
  .top -pname NA -nname CL -np 48 -nn 0 -neutral -
  conc 3
```

`gmx grompp` necesita un archivo con terminación `*.mdp` este tipo de archivo que contiene una lista de opciones para cualquier dinámica valores que dependerán de lo que se quiere observar [Ver: <http://manual.gromacs.org/online/mdp.html>]. El archivo con los parámetros de la dinámicas molecular tiene la siguiente forma,

```
; ions.mdp - archivo de entrada para generar el archivo ions.tpr mediante el programa gmx
grompp
; Parámetros que definirán que hacer, qué información guardar y cuándo parar
```

```

integrator = steep ; Nombre del algoritmo de integración (steep = steepest descent minimization)
emtol = 1000.0 ; Parar la minimización cuando la fuerza máxima sea <1000.0 kJ/mol/nm
emstep = 0.01 ; Tamaño del paso de energía
nsteps = 50000 ; Número máximo de pasos a realizar en la minimización

```

; Parámetros que describen cómo encontrar los vecinos de cada átomo y cómo calcular sus interacciones

```

nstlist = 1 ; Frecuencia con la que se actualiza la lista de vecinos y la de fuerzas de largo alcance
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid ; Método para determinar la lista de vecinos (simple, cuadrícula)
coulombtype = PME ; Tratamiento de interacciones electrostáticas de largo alcance
rcoulomb = 1.0 ; Rango electrostático de corto alcance, cut-off
rvdw = 1.0 ; Rango de Van der Waals de corto alcance, cut-off
pbc = xyz ; Condiciones de frontera periódicas (yes/no)

```

Los prefijos en general se usan de la misma forma, `-f` llaman a archivos de entrada de coordenadas o parámetros, ahora que hay que llamar a los parámetros y archivos de coordenadas se usa `-f` y `-c` respectivamente, `-o` es para el archivo de salida, `-p` es para archivos de topología y `-s` es para llamar el archivo de la corrida en `gmx genion`.

B.3 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA

Antes de realizar una dinámica molecular es necesario realizar un minimización de energía para estabilizar el sistema. Se usa el comando `gmx grompp` nuevamente para crear el archivo binario que contiene la estructura inicial de la simulación, la topología molecular y los parámetros de la simulación (ya que esta en forma binaria no puede ser leído por un editor normal), este terminación `*.tpr`, mencionada en la sección anterior. El archivo de entrada con los parámetros de la dinámica está indicado a continuación de los comandos,

```
$gmx grompp -f em.mdp -c 25dna_solv_ions.gro -p topol.
top -o em.tpr
```

2

```
$gmx mdrun -v -deffnm em
```

El archivo de entrada para el comando `gmx grompp`,

; **minim.mdp** -archivo de entrada para generar el archivo `em.tpr` mediante el programa `gmx grompp`

```

integrator = steep ; Algoritmo (steep = steepest descent minimization)
emtol = 1000.0 ; Parar la minimización cuando la fuerza máxima sea <1000.0 kJ/mol/nm
emstep = 0.01 ; Tamaño del paso de energía
nsteps = 50000 ; Número máximo de pasos a realizar en la minimización

```

; Parámetros que describen cómo encontrar los vecinos de cada átomo y cómo calcular sus interacciones

```

nstlist      = 1      ; Frecuencia con la que se actualiza la lista de vecinos y la de fuerzas de largo alcance
cutoff-scheme = Verlet
ns_type      = grid   ; Método para determinar la lista de vecinos (simple, cuadrícula)
coulombtype  = PME    ; Tratamiento de las interacciones electrostáticas de largo alcance
rcoulomb     = 1.0    ; Rango electrostático de corto alcance, cut-off
rvdw        = 1.0    ; Rango de Van der Waals de corto alcance, cut-off
pbc         = xyz     ; Condiciones de frontera periódicas (yes/no)

```

El motor principal de la dinámica molecular computacional en [GROMACS](#) se efectúa ejecutando el comando `gmx mdrun`, este desempeña además de dinámicas moleculares, dinámicas estocásticas, minimizaciones energéticas, pruebas de inserción de partículas y cálculos de energías. La opción `-def nm` genera los archivos de salida con el nombre del archivo de entrada con sus respectivas terminaciones (tipos de archivo) o el nombre indicado sin terminación, en este caso *em*. La opción `-v` es para ver la estadística del tiempo restante de la simulación.

Hasta ahora tenemos el sistema completo solo hace falta empezar a poner las variables del sistema, como presión y temperatura. En la [Figura 31](#) podemos visualizar los pasos que hemos realizado.

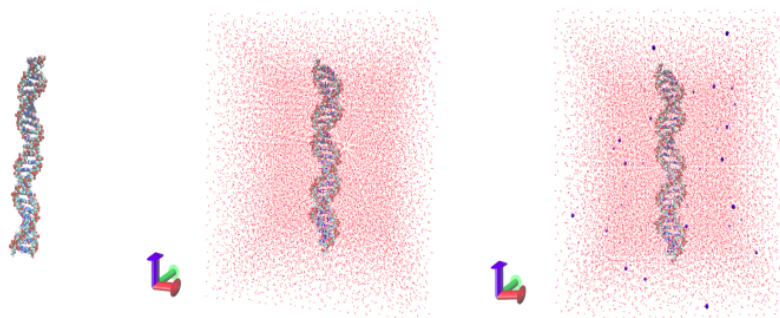


Figura 31: Visualización de la topología y optimización del sistema. En el primer cuadro observamos la estructura cristalina del ADN, que diseñamos en B por biomer, en el segundo el volumen que contiene el sistema solvatado y finalmente en el tercer cuadro vemos el sistema con iones y equilibrado.

B.4 EQUILIBRACIÓN

Esta etapa de la simulación es muy importante para que cuando se repitan estos experimentos virtuales tengamos un ensamble canónico con condiciones ergódicas, es decir, los promedios en el tiempo son igual a los promedios en el ensamble. Para ello es necesario acoplar la temperatura a nuestro sistema y reproducir el ensamble canónico con N (número de partículas),

V (volumen del sistema) y T (temperatura) constantes. De la misma manera debemos incorporar la presión a nuestro sistema para tener un sistema isobárico-isotérmico con N, P (presión) y T constantes.

Anteriormente se introdujo el comando `gmx grompp` que genera archivos binarios con la información necesaria para la corrida con `gmx mdrun` por lo que antes de acoplar temperatura al sistema en cuestión es necesario generar este archivo binario una vez más usando un archivo `*.mdp` indicado después de los comandos para el acoplamiento térmico.

```
$gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
```

2

```
$gmx mdrun -v -deffnm nvt
```

El siguiente archivo contiene las variables, he instrucciones necesarias para equilibrar el sistema con el acoplamiento de la temperatura,

```
title = AMBER 25-DNA NVT equilibration
define = -DPOSRES ; Constricción en la posición del DNA
; Parámetros de la dinámica
integrator = md ; Integrador, salto de rana
nsteps = 50000 ; 2 * 50000 = 100 ps
dt = 0.002 ; 2 fs
; Control de salida
nstxout = 500 ; Guardar coordenadas cada 1.0 ps
nstvout = 500 ; Guardar velocidades cada 1.0 ps
nstenergy = 500 ; Guardar energías cada 1.0 ps
nstlog = 500 ; Actualizar archivo log cada 1.0 ps
; Parámetros de enlace
continuation = no ; Primera corrida
constraint_algorithm = lincs ; Constricciones holonómicas  $f_j = (q_i, t); i = 1, \dots, n; j = 1, \dots, k$ 
constraints = all-bonds ; Todos los enlaces (incluyendo los átomos pesdos con enlaces de Hidrógeno) constreñidos
lincs_iter = 1 ; Precisión de LINCS
lincs_order = 4 ; Orden de la precisión
; Búsqueda de vecinos
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid ; Búsqueda de vecinos en celdas cuadriculadas
nstlist = 10 ; 20 fs, medida de irrelevancia con el esquema de Verlet
rcoulomb = 1.0 ; Rango electrostático de corto alcance, cutoff (en nm)
rvdw = 1.0 ; Rango de Van der Waals de corto alcance, cutoff (en nm)
; Electrostática
coulombtype = PME ; Partícula Mesh Ewald para electrostática de largo alcance
pme_order = 4 ; interpolación cúbica ; Temperatura de acoplamiento
fourierspacing = 0.16 ; espaciamiento de la cuadrícula para FFT
plamamiento activada
```

```

tcoupl    = V-rescale           ; Termostato de Berendsen modificado
tc-grps   = DNA Water_and_Ions ; Temperatura de acoplamiento para los grupos - más precisión
tau_t     = 0.1 0.1            ; Constante temporal, in ps
ref_t     = 300 300            ; Temperatura de referencia, una para cada grupo, en K
; Acoplamiento de presión desactivado
pcoupl    = no                 ; No hay acoplamiento de presión en NVT
; Condiciones de frontera periódicas
pbc       = xyz                ; 3-D PBC
; Corrección de dispersión
DispCorr  = EnerPres           ; Cuenta para el cut-off esquema de vdW
; Generación de Velocidades
gen_vel   = yes                ; Asigna velocidades de la distribución de Maxwell
gen_temp  = 300                ; Temperatura para la distribución de Maxwell
gen_seed  = -1                 ; Genera una semilla aleatoria

```

Nuevamente el paso a seguir es un acoplamiento pero ahora de presión de presión al sistema llevando a cabo una equilibración de este con el comando principal,

```
$gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.
top -o npt.tpr
```

2

```
$gmx mdrun -v -deffnm npt
```

Usando el archivo de entrada a `gmx grompp` siguiente,

```

title     = AMBER 25-DNA NPT equilibration
define    = -DPOSRES           ; Constricción en la posición del DNA
; Parámetros de la dinámica
integrator = md                ; Integrador, salto de rana
nsteps    = 50000              ; 2 * 50000 = 100 ps
dt        = 0.002              ; 2 fs
; Control de salida
nstxout   = 500                ; Guardar coordenadas cada 1.0 ps
nstvout   = 500                ; Guardar velocidades cada 1.0 ps
nstenergy = 500                ; Guardar energías cada 1.0 ps
nstlog    = 500                ; Actualizar archivo log cada 1.0 ps
; Parámetros de enlace
continuation = yes             ; Reiniciar después de NVT
constraint_algorithm = lincs    ; Constricciones holonómicas
constraints = all-bonds        ; Todos los enlaces (incluyendo los átomos pesados con enlaces de Hidrógeno) constreñidos
lincs_iter = 1                 ; Precisión de LINCS
lincs_order = 4                ; Orden de la precisión
; Búsqueda de vecinos

```

```

cutoff-scheme = Verlet
ns_type       = grid      ; Búsqueda de vecinos en celdas cuadriculadas
nstlist       = 10        ; 20 fs, medida de irrelevancia con el esquema de Verlet
rcoulomb      = 1.0       ; Rango electrostático de corto alcance, cutoff (in nm)
rvdw          = 1.0       ; Rango Van der Waals de corto alcance, cutoff (in nm)
; Electrostática
coulombtype   = PME       ; Partícula Mesh Ewald para electrostática de largo alcance
pme_order     = 4         ; Interpolación cúbica
fourierspacing = 0.16    ; Espaciamiento de la cuadrícula para FFT
; Acoplamiento de temperatura activo
tcoupl        = V-rescale      ; Termostato Berendsen modificado
tc-grps       = DNA Water_and_Ions ; Acoplamiento de los grupos - mayor precisión
tau_t         = 0.1 0.1       ; Constante de tiempo, in ps
ref_t         = 300 300       ; Temperatura de referencia, una para cada grupo, en K
; Acoplamiento de presión activo
pcoupl        = Parrinello-Rahman ; Acoplamiento de temperatura en NPT
pcoupltype    = isotropic      ; Escalamiento vectorial uniforme de la caja
tau_p         = 2.0           ; Constante de tiempo, en ps
ref_p         = 1.0           ; Presión de referencia, en bar
compressibility = 4.5e-5      ; Compresibilidad isotérmica del agua, bar-1
refcoord_scaling = com
; Condiciones de frontera periódicas
pbc           = xyz          ; 3-D PBC
; Dispersión correction
DispCorr      = EnerPres    ; Cuenta para el cut-off esquema de vdW
; Velocity generation
gen_vel       = no          ; Generación de la velocidad desactivada

```

B.5 DINÁMICA MOLECULAR

Nuestro sistema tiene ya incorporadas todas las variables que necesitamos por consiguiente ya es posible analizar como se comporta nuestra muestra computacional de estudio en nuestro caso un ADN de 25 pares de base. La dinámica molecular al igual que la adición de iones, optimización del sistema y equilibración acoplando temperatura y presión para obtener un ensamble canónico en nuestra simulación necesitamos de un archivo con los parámetros de la corrida en un archivo parecido a los anteriores.

Con los comandos escritos de manera análoga a lo anterior pedimos la dinámica molecular del sistema,

```
$gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.
top -o md25dna.tpr
```

2

```
$gmx mdrun -v -deffnm md25dna
```

Con el archivo que permitirá que el programa lea nuestros parámetros,

```

title = AMBER 25-DNA MD simulation v
; Parámetros de la dinámica
integrator = md ; Integrador, salto de rana
nsteps = 500000 ; 2 * 500000 = 1000 ps (10 ns)
dt = 0.002 ; 2 fs
; Output control
nstxout = 500 ; Guardar coordenadas cada 10.0 ps
nstvout = 500 ; Guardar velocidades cada 10.0 ps
nstenergy = 500 ; Guardar energías cada 10.0 ps
nstlog = 500 ; Actualizar archivo log cada 10.0 ps
nsthout-compressed = 500 ; Guardar coordenadas comprimidas cada 10.0 ps
; nsthout-compressed reemplaza nstxout
compressed-x-grps = System ; Reemplaza xtc-grps
; Parámetros de enlace
continuation = yes ; Reiniciar después de NPT
constraint_algorithm = lincs ; Constricciones holonómicas
constraints = all-bonds ; Todos los enlaces (incluyendo los átomos pesdos con enlaces de Hi-
drógeno) constreñidos
lincs_iter = 1 ; Precisión de LINCS
lincs_order = 4 ; Orden de precisión
; Búsqueda de vecinos
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid ; Búsqueda de vecinos en celdas cuadriculadas
nstlist = 10 ; 20 fs, medida de irrelevancia con el esquema de Verlet
rcoulomb = 1.0 ; Rango electrostático de corto alcance, cutoff (in nm)
rvdw = 1.0 ; Rango van der Waals de corto alcance, cutoff (in nm)
; Electrostática
coulombtype = PME ; Partícula Mesh Ewald para electrostática de largo alcance
pme_order = 4 ; Interpolación cúbica
fourierspacing = 0.16 ; Espaciamento de la cuadrícula para FFT
; Acoplamiento de temperatura activada
tcoupl = V-rescale ; Termostato Berendsen modificado
tc-grps = DNA Water_and_Ions ; Acoplamiento de los grupos - mayor precisión
tau_t = 0.1 0.1 ; Constante de tiempo, en ps
ref_t = 300 300 ; Temperatura de referencia, una para cada grupo, en K
; Acoplamiento de presión activada
pcoupl = Parrinello-Rahman ; Presión de acoplamiento en NPT
pcoupltype = isotropic ; Escalamiento vectorial uniforme de la caja
tau_p = 2.0 ; Constante de tiempo, en ps
ref_p = 1.0 ; Presión de referencia, en bar
compressibility = 4.5e-5 ; Compresibilidad isotérmica del agua, bar-1
; Condiciones de frontera periódicas
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Corrección de dispersión
DispCorr = EnerPres ; Cuenta para el cut-off esquema de vdW
; Generación de velocidades
gen_vel = no ; Generación de velocidades desactivada

```


Después de que la dinámica se ha realizado, se debe proceder a analizarla y visualizarla, primero verificando la dinámica con el siguiente comando,

```
$gmxcheck -f md25dna.xtc
```

Además ya que la simulación tiene condiciones de frontera periódicas en la visualización es posible ver la molécula fragmentada, esto no es un error, ya que si la molécula sale por la parte superior de la celda rectangular aparecerá por la parte de abajo y así con cada una de sus caras de forma paralela. Esto es debido a que la molécula es libre de moverse del centro de la celda donde inicialmente fue colocada. Esto es lo que se espera de la naturaleza. Para evitar los problemas a nuestra visualización hace falta solo corregir las coordenadas. Podemos hacer que la celda cúbica en la que se encuentra nuestro ADN se mueva con el,

```
$trjconv -s md25dna.tpr -f md25dna.xtc -o md25dnanojump
        .xtc -pbc nojump
```

- 3

```
$trjconv -s md25dna.tpr -f md25dnanojump.xtc -o md25
        dnanojump.pdb -pbc mol -center -dt 10
```

el comando `trjconv` nos permite convertir los archivos de trayectoria de muchas maneras. De los cambios más importantes son: cambiar de un formato a otro, seleccionar un grupo de átomos o cambiar la representación en la periodicidad de las fronteras, centrar los átomos en la caja que se va a visualizar, reducir el número de cuadros, etcétera. La opción `-pbc` (periodic boundary conditions) añadiendo `nojump` permite que no haya saltos de en la celda para corregir la visualización. Otra utilidad es corregir el análisis de la desviación cuadrática media (RMSD) con la opción `mol` después de `-pbc` ya que compara con la estructura inicial de la caja. El archivo de entrada, señalado por `-s` y terminación `*.tpr`, contiene la estructura inicial de la simulación, la topología molecular y los parámetros de la simulación, a lado de la trayectoria indicada por `-f` y terminación `*.xtc` nos pueden dar un output ya sea de trayectoria `*.xtc` o de coordenadas `*.pdb` de la trayectoria, permitiendo elegir el archivo que más convenga. Por último las opciones `-center` y `-dt` indican que queremos centrar la molécula en la celda y la reducción de cuadros cada a 1 por cada 10.

Los algoritmos para la integración de las ecuaciones de movimiento y para el acoplamiento de la temperatura y presión los describiremos a continuación.

Listing 1: Comandos para GROMACS

```
gmx pdb2gmx -f 25dna_FIXED.pdb -o 25dna_processed.gro
-ignh
2
gmx editconf -f 25dna_processed.gro -o 25dna_newbox.gro
-c -d 0.3 -bt cubic

gmx solvate -cp 25dna_newbox.gro -cs spc216.gro -o 25
dna_solv.gro -p topol.top
7
gmx grompp -f ionsD.mdp -c 25dna_solv.gro -p topol.top
-o ions.tpr

gmx genion -s ions.tpr -o 25dna_solv_ions.gro -p topol.
top -neutral

gmx grompp -f em.mdp -c 25dna_solv_ions.gro -p topol.
top -o em.tpr
12
gmx mdrun -v -deffnm em

gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
17
gmx mdrun -v -deffnm nvt

gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.
top -o npt.tpr

gmx mdrun -v -deffnm npt
22
gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top
-o md25dna.tpr

gmx mdrun -v -deffnm md25dna
```

REFERENCIAS

- [1] J.D. Watson y F.N.C. Crick. «Molecular structure of nucleic acids. A structure of deoxyribose nucleic acid.» En: *Nature* 171 (1953), págs. 737-738.
- [2] F.N.C. Crick y J.D. Watson. «The complementary structure of deoxyribonucleic acid». En: *Proc. R. Soc. London A*-223 (1954), págs. 80-96.
- [3] R.E. Franklin y R.G. Gosling. «Molecular structure of nucleic acids. Molecular configuration in sodium thymonucleate». En: *Nature* 171 (1953), págs. 740-741.
- [4] M.H.F. Wilkins, W.E. Seeds, A.R. Stokes y H.R. Wilson. «Helical structure of crystalline deoxypentose nucleic acid». En: *Nature* 172 (1953), págs. 759-762.
- [5] R.O. Rahn, R.G. Shulman y J.W. Longworth. «Phosphorescence and Electron Spin Resonance Studies of the uv-Excited Triplet State of DNA». En: *The Journal of chemical physics* 45.8 (1966), págs. 2955-2965.
- [6] S.C. Lillicrap y E.M. Fielden. «The Effect of 5-Bromouracil on Energy Transfer in DNA and Related Model Systems. Purine: Pyrimidine Crystal Complexes». En: *Radiation Research* 38.3 (1971), págs. 432-446.
- [7] Svetlana Kilina, Sergei Tretiak, Dzmitry Yarotski, Jian-Xin Zhu, Norman Modine, Antoinette Taylor y Alexander Balatsky. «Electronic properties of DNA base molecules adsorbed on a metallic surface». En: *The Journal of Physical Chemistry C* 111.39 (2007), págs. 14541-14551.
- [8] *DNA nanocircuits*. URL: <http://physicsworld.com/cws/article/news/2009/aug/21/dna-scaffolds-could-make-nano-circuits>.
- [9] Warren C.W. Chan y Shuming Nie. «Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection». En: *Science* 281.5385 (1998), págs. 2016-2018.
- [10] Chun-Yang Zhang, Hsin-Chih Yeh, Marcos T. Kuroki y Tza-Huei Wang. «Single-quantum-dot-based DNA nanosensor». En: *Nature materials* 4.11 (2005), págs. 826-831.
- [11] Karo Michaelian y Norberto Padilla. «DNA Denaturing through UV-C Photon Dissipation: A Possible Route to Archean Non-enzymatic Replication». En: *bioRxiv* (2014), pág. 009126.
- [12] Karo Michaelian. «Thermodynamic origin of life». En: *arXiv preprint arXiv:0907.0042* (2009).
- [13] Karo Michaelian. «Thermodynamic dissipation theory for the origin of life». En: *Earth system Dynamics*. Vol. 2. 2011, págs. 37-51.
- [14] C. Darwin. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. 1859.

- [15] A.L. Oparin. *The origin of life*. 1936.
- [16] L.E. Orgel. «Unnatural selection in chemical system». En: *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 39 (2004), págs. 99-123.
- [17] L.E. Orgel. «Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world». En: *Acc. Chem. Res.* 28 (1995), págs. 109-118.
- [18] W. Gilbert. «The RNA World». En: *Nature* 319 (1986), pág. 618.
- [19] F. Hoyle y N.C. Wickramasinghe. «Lifecloud, The Origin of Life in the universe». En: *J.M. Dent and Sons, Ltd.* (1978).
- [20] Bayden R. Wood. «The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues». En: *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016), págs. 1980-1998.
- [21] Z.G. Kudritskaya y V.I. Danilov. «Quantum mechanical study of bases interactions in various associates in atomic dipole approximation». En: *J. Theor. Biol.* 59 (1976), págs. 303-318.
- [22] R.L. Ornstein, R. Rein, D.L. Breen y R.D. Macelroy. «An optimized potential function for the calculation of nucleic acid interaction energies. I - Base stacking». En: *Biopolymers* 17 (1978), 2341-2360.
- [23] John SantaLucia. «A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.4 (1998), págs. 1460-1465.
- [24] *UMelt*. URL: <https://www.dna.utah.edu/umelt/um.php>.
- [25] Josep M. Huguet, Cristiano V. Bizarro, Núria Forn, Steven B. Smith, Carlos Bustamante y Felix Ritort. «Single-molecule derivation of salt dependent base-pair free energies in DNA». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.35 (2010), págs. 15431-15436.
- [26] Richard D. Blake, Jeff W Bizzaro, Jonathan D. Blake, GR Day, SG Delcourt, J Knowles, Kenneth A Marx y Jr SantaLucia. «Statistical mechanical simulation of polymeric DNA melting with MELTSIM.» En: *Bioinformatics* 15.5 (1999), págs. 370-375.
- [27] Karo Michaelian. *Thermodynamic Dissipation Theory of the Origin and Evolution of Life: Salient characteristics of RNA, DNA and other fundamental molecules suggest an origin of life driven by UV-C light*. 2016.
- [28] L.P. Knauth. «Isotopic Signatures and Sedimentary Records». En: *Lecture Notes in Earth Sciences*, 43 (1992). Ed. por N. Clauer y S. Chaudhuri, págs. 123-152.
- [29] L.P. Knauth. «Temperature and salinity history of the Precambrian ocean: implications for the course of microbial evolution». En: *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleocology* 219 (2005), págs. 53-69.
- [30] L.P. Knauth y D.R. Lowe. «High Archean climatic temperature inferred from oxygen isotope geochemistry of cherts in the 3.5 Ga Swaziland group». En: *South Africa, Geol. Soc. Am. Bull* 115 (2003), págs. 566-580.

- [31] Karo Michaelian y Simeonov. «Fundamental molecules of life are pigments which arose and co-evolved as a response to the thermodynamic imperative of dissipating the prevailing solar spectrum». En: *Biogeosciences* 12 (2015), págs. 4913-4937.
- [32] *Animal Genetics*. 2015. URL: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=303&typ=html.
- [33] M. Schidlowski. «A 3.800-millionyear isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks». En: *Nature* 333 (1988), págs. 313-318.
- [34] M. Schidlowski, J.M. Hayes e I.R. Kaplan. «Isotopic Inferences of Ancient Biochemistries: Carbon, Sulfur, Hydrogen, and Nitrogen, in: Earth's Earliest Biosphere its Origin and Evolution». En: (1983). Ed. por J. W Schopf, págs. 149-186.
- [35] Ignasi Ribas, Edward F Guinan, Manuel Güdel y Marc Audard. «Evolution of the solar activity over time and effects on planetary atmospheres. I. High-energy irradiances (1-1700 Å)». En: *The Astrophysical Journal* 622.1 (2005), pág. 680.
- [36] Carl Sagan y George Mullen. «Earth and Mars: evolution of atmospheres and surface temperatures». En: (1972).
- [37] I. Cnossen, J. Sanz-Forcada, F. Favata, O. Witasse, T. Zegers y N.F. Arnold. «The habitat of early life: Solar X-ray and UV radiation at Earth's surface 4–3.5 billion years ago.» En: *J Geophys Res*. 112 (2007). DOI: [10.1029/2006JE002784](https://doi.org/10.1029/2006JE002784).
- [38] Anthony S. Serianni. *DNA denaturation spectra*. 2005. URL: <https://www3.nd.edu/~aseriann/CHAP5B.html/sld036.htm>.
- [39] Chris T. Middleton, Kimberly de La Harpe, Charlene Su, Yu Kay Law, Carlos E. Crespo-Hernández y Bern Kohler. «DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double Helix». En: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 60 (2009), págs. 217-239.
- [40] Edward S. Fry. «Visible and near-ultraviolet absorption spectrum of liquid water: comment». En: *Optical Society of America* (2000).
- [41] J.T. Hardy. «The sea-surface Microlayer». En: *Biology, Chemistry and Anthropogenic Enrichment, Prog. Oceanogr.* 11 (1982), págs. 307-328.
- [42] M. Kuznetsova, C. Lee, J. Aller y N. Frew. «Enrichment of amino acids in the sea surface microlayer at coastal and open ocean sites in the North Atlantic Ocean». En: *Limnology and oceanography* 49 (2004), págs. 1605-1619.
- [43] Stanley L. Miller. «The endogenous synthesis of organic compounds». En: *The Molecular Origins of Life* (1998), págs. 59-85.
- [44] M.W. Powner, B. Gerland y J.D. Sutherland. «Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible condition». En: *Nature* 459 (2009), págs. 239-242.

- [45] John D. Sutherland. «The Origin of Life—Out of the Blue, Review, Prebiotic Systems Chemistry». En: *Angewandte, Chemie.International.Edit.* (2015), págs. 104-121.
- [46] B.H. Patel, Claudia Percivalle, D.J. Ritson, Colm Duffy y J.D. Sutherland. «Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism». En: *Nature Chemistry* (2015), págs. 301-307.
- [47] Karo Michaelian. «A non-linear irreversible thermodynamic perspective on organic pigment proliferation and biological evolution». En: *Journal of Physics: Conference Series*. Vol. 475. 1. IOP Publishing. 2013, pág. 012010.
- [48] James P. Ferris y L.E. Orgel. «An Unusual Photochemical Rearrangement in the Synthesis of Adenine from Hydrogen Cyanide¹». En: *Journal of the American Chemical Society* 88.5 (1966), págs. 1074-1074.
- [49] Jack W Szostak. «The eightfold path to non-enzymatic RNA replication». En: *Journal of Systems Chemistry* 3.1 (2012), pág. 2.
- [50] Crespo-Hernandez CE, Cohen B y Kohler B. «Base stacking controls excited-state dynamics in A·T DNA». En: *Nature* 436 (2005), págs. 1141-1144.
- [51] Takashi Kodama, Ankur Jain y Kenneth Goodson. «Heat conduction through a DNA-gold composite». En: *Nano Lett* 9.5 (2009), págs. 2005-2009.
- [52] R. J. H. Davies. «Ultraviolet Radiation Damage in DNA». En: *Biochemical Society Transactions* 23 (1994), págs. 407-418.
- [53] Jean-Marc L. Pecourt, Jorge Peon y Bern Kohler. «DNA excited-state dynamics: ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides». En: *Journal of the American Chemical Society* 123.42 (2001), págs. 10370-10378.
- [54] Carlos E. Crespo-Hernández, Boiko Cohen, Patrick M. Hare y Bern Kohler. «Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids». En: *Chemical reviews* 104.4 (2004), págs. 1977-2020.
- [55] Roberto Improta, Fabrizio Santoro y Lluís Blancafort. «Quantum mechanical studies on the photophysics and the photochemistry of nucleic acids and nucleobases». En: *Chem. Rev* 116.6 (2016), págs. 3540-3593.
- [56] Felix Plasser, Adélia J.A. Aquino, Hans Lischka y Dana Nachtigallová. «Electronic excitation processes in single-strand and double-strand DNA: a computational approach». En: *Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids II*. Springer, 2014, págs. 1-37.
- [57] T. Gustavsson, R. Improta y D. Markovitsi. «DNA/RNA: Building Blocks of Life Under UV Irradiation». En: *Journal of Physical Chemistry Letters* 1 (2010), págs. 2025-2030. DOI: [10.1021/jz1004973](https://doi.org/10.1021/jz1004973). URL: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00496298>.

- [58] Thomas Gustavsson, Ákos Bányász, Elodie Lazzarotto, Dimitra Markovitsi, Giovanni Scalmani, Michael Frisch, Vincenzo Barone y Roberto Improta. «Singlet Excited-State Behavior of Uracil and Thymine in Aqueous Solution: A Combined Experimental and Computational Study of 11 Uracil Derivatives». En: *Journal of the American Chemical Society* 128.2 (2006). PMID: 16402849, págs. 607-619. DOI: [10.1021/ja056181s](https://doi.org/10.1021/ja056181s).
- [59] Luis Serrano-Andres, Manuela Merchan y Antonio Borin. «A three-state model for the photophysics of guanine». En: *Journal of the American Chemical Society* 130.8 (2008), págs. 2473-2484.
- [60] Mario Barbatti, Zhenggang Lan, Rachel Crespo-Otero, Jaroslaw Szymczak, Hans Lischka y Walter Thiel. «Critical appraisal of excited state nonadiabatic dynamics simulations of 9 H-adenine». En: *The Journal of chemical physics* 137.22 (2012), 22A503.
- [61] Patrick M. Hare, Carlos E. Crespo-Hernandez y Bern Kohler. «Solvent-dependent photophysics of 1-cyclohexyluracil: ultrafast branching in the initial bright state leads nonradiatively to the electronic ground state and a long-lived $1n\pi^*$ state». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 110.37 (2006), págs. 18641-18650.
- [62] Tomohisa Takaya, Charlene Su, Kimberly de La Harpe, Carlos E. Crespo-Hernández y Bern Kohler. «UV excitation of single DNA and RNA strands produces high yields of exciplex states between two stacked bases». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.30 (2008), págs. 10285-10290.
- [63] Carlos E. Crespo-Hernández, K.; De La Harpe y B. Kohler. «Ground-state recovery following UV excitation is much slower in G×C-DNA duplexes and hairpins than in mononucleotides». En: *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008), págs. 10844-10845.
- [64] Bern Kohler. «Nonradiative decay mechanisms in DNA model systems». En: *The Journal of Physical Chemistry Letters* 1.13 (2010), págs. 2047-2053.
- [65] Akos Banyasz, Thomas Gustavsson, Delphine Onidas, Pascale Changenet-Barret, Dimitra Markovitsi y Roberto Improta. «Multi-Pathway Excited State Relaxation of Adenine Oligomers in Aqueous Solution: A Joint Theoretical and Experimental Study». En: *Chemistry-A European Journal* 19.11 (2013), págs. 3762-3774.
- [66] Xiuxiu Wu, Tolga N. V. Karsili y Wolfgang Domck. «Excited-State Deactivation of Adenine by Electron-Driven Proton-Transfer Reactions in Adenine–Water Clusters: A Computational Study». En: *Chem. Phys. Chem.* 17 (2016), págs. 1298-1304.
- [67] Vladimir V. Didenko. «DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications». En: *Biotechniques* 31.5 (2001), pág. 1106.

- [68] Adrian Lange y John Herbert. «Both intra-and interstrand charge-transfer excited states in aqueous B-DNA are present at energies comparable to, or just above, the $1\pi\pi^*$ excitonic bright states». En: *Journal of the American Chemical Society* 131.11 (2009), págs. 3913-3922.
- [69] Joseph-C. Genereux y Jacqueline-K. Barton. «Mechanisms for DNA charge transport». En: *Chemical reviews* 110.3 (2009), págs. 1642-1662.
- [70] Sanjay Premi, Silvia Wallisch, CamilaM. Mano, AdamB. Weiner, Antonella Bacchiocchi, Kazumasa Wakamatsu, Etelvino-J.H. Bechara, Ruth Halaban, Thierry Douki y DouglasE. Brash. «Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure». En: *Science* 347.6224 (2015), págs. 842-847.
- [71] Evelyn M. Witkin. «Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*.» En: *Bacteriological reviews* 40.4 (1976), págs. 869.
- [72] Carlos Crespo-Hernández y Bern Kohler. «Influence of secondary structure on electronic energy relaxation in adenine homopolymers». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 108.30 (2004), págs. 11182-11188.
- [73] B. Bouvier, T. Gustavsson, D. Markovitsi y P. Millié. «Dipolar coupling between electronic transitions of the DNA bases and its relevance to exciton states in double helices». En: *Chemical Physics* 275.1 (2002), págs. 75-92.
- [74] Benjamin Bouvier, Jean-Pierre Dognon, Richard Lavery, Dimitra Markovitsi, Philippe Millié, Delphine Onidas y Krystyna Zakrzewska. «Influence of conformational dynamics on the exciton states of DNA oligomers». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 107.48 (2003), págs. 13512-13522.
- [75] E. Emanuele, K. Zakrzewska, D. Markovitsi, R. Lavery y P. Millie. «Exciton States of Dynamic DNA Double Helices: Alternating dCdG Sequences». En: *J. Phys. Chem. B* 109.33 (2005), págs. 16109-16118.
- [76] Ivan Buchvarov, Qiang Wang, Milen Raytchev, Anton Trifonov y Torsten Fiebig. «Electronic energy delocalization and dissipation in single- and double-stranded DNA». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.12 (2007), págs. 4794-4797.
- [77] Daphne Klotsa, Rudolf Römer y Matthew Turner. «Electronic transport in DNA». En: *Biophysical journal* 89.4 (2005), págs. 2187-2198.
- [78] Eric R. Bittner. «Lattice theory of ultrafast excitonic and charge-transfer dynamics in DNA». En: *The Journal of chemical physics* 125.9 (2006), págs. 094909.
- [79] T.; Takaya, C.; Su, K.; De La Harpe, Carlos E. Crespo-Hernández y B. Kohler. «UV excitation of single DNA and RNA strands produces high yields of exciplex states between two stacked bases». En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008), págs. 10285-10290.
- [80] T. Dauxois, M. Peyrard y A.R. Bishop. «Entropy-driven DNA denaturation». En: *Phys. Rev. E* 47 R (1993), págs. 44.

- [81] Lluís Blancafort. «Energetics of Cytosine Singlet Excited-State Decay Paths—A Difficult Case for CASSCF and CASPT₂». En: *Photochemistry and photobiology* 83.3 (2007), págs. 603-610.
- [82] Fan Jin, Min Wei, Chengbu Liu y Yuchen Ma. «The mechanism for the formation of OH radicals in condensed-phase water under ultraviolet irradiation». En: *Physical Chemistry Chemical Physics* 19.32 (2017), págs. 21453-21460.
- [83] Per-Olov Löwdin. «Proton tunneling in DNA and its biological implications». En: *Reviews of Modern Physics* 35.3 (1963), pág. 724.
- [84] Víctor Guallar, Abderrazzak Douhal, Miquel Moreno y José Lluch. «DNA mutations induced by proton and charge transfer in the low-lying excited singlet electronic states of the DNA base pairs: A theoretical insight». En: *The Journal of Physical Chemistry A* 103.31 (1999), págs. 6251-6256.
- [85] Thomas Schultz, Elena Samoylova, Wolfgang Radloff, Ingolf V. Hertel, Andrzej L. Sobolewski y Wolfgang Domcke. «Efficient deactivation of a model base pair via excited-state hydrogen transfer». En: *Science* 306.5702 (2004), págs. 1765-1768.
- [86] Andrzej L. Sobolewski y Wolfgang Domcke. «Ab initio studies on the photophysics of the guanine–cytosine base pair». En: *Physical Chemistry Chemical Physics* 6.10 (2004), págs. 2763-2771.
- [87] Katharina Röttger, Hugo J.B. Marroux, Arsène F.M. Chemin, Emma Elsdon, Thomas A.A. Oliver, Steven T.G. Street, Alexander S. Henderson, M. Carmen Galan, Andrew J. Orr-Ewing y Gareth Roberts. «Is UV-Induced Electron-Driven Proton Transfer Active in a Chemically Modified A· T DNA Base Pair?» En: *The Journal of Physical Chemistry B* 121.17 (2017), págs. 4448-4455.
- [88] Xiuxiu Wu, Tolga N. V. Karsili y Wolfgang Domck. «Role of Electron-Driven Proton-Transfer Processes in the Ultrafast Deactivation of Photoexcited Anionic 8-oxoGuanine-Adenine and 8-oxoGuanine-Cytosine Base Pairs». En: *Molecules* 22 (2017), pág. 135.
- [89] R.B. Setlow y W.L. Carrier. «IDENTIFICATION OF ULTRAVIOLET-INDUCED THYMINE DIMERS IN DNA BY ABSORBANCE MEASUREMENTS». En: *Photochemistry and Photobiology* 2.1 (1963), págs. 49-57.
- [90] Garcès F. y Davila C.A. «Alterations in DNA irradiated with ultraviolet radiation—I. The formation process of cyclobutylpyrimidine dimers: cross sections, action spectra and quantum yields». En: *Photochem. Photobiol.* 35 (1982), págs. 9-16.
- [91] Mark Pearson, D.W. Whillans, J.C. LeBlanc y H.E. Johns. «Dependence on wavelength of photoproduct yields in ultraviolet-irradiated poly U». En: *Journal of molecular biology* 20.2 (1966), págs. 245-261.

- [92] Patrick M. Hare, Carlos E. Crespo-Hernández y Bern Kohler. «Internal conversion to the electronic ground state occurs via two distinct pathways for pyrimidine bases in aqueous solution». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.2 (2007), págs. 435-440.
- [93] Delphine Onidas, Thomas Gustavsson, Elodie Lazzarotto y Dimitra Markovitsi. «Fluorescence of the DNA double helices (dAdT)_n·(dAdT)_n studied by femtosecond spectroscopy». En: *Physical Chemistry Chemical Physics* 9.37 (2007), págs. 5143-5148.
- [94] Ka-Yiu Wong y B.Montgomery Pettitt. «The pathway of oligomeric DNA melting investigated by molecular dynamics simulations». En: *Biophysical journal* 95.12 (2008), págs. 5618-5626.
- [95] William L. Jorgensen, Jayaraman Chandrasekhar, Jeffrey D. Madura, Roger W. Impey y Michael L. Klein. «Comparison of simple potential functions for simulating liquid water». En: *The Journal of chemical physics* 79.2 (1983), págs. 926-935.
- [96] Karen Drukker, Guosheng Wu y George Schatz. «Model simulations of DNA denaturation dynamics». En: *The Journal of Chemical Physics* 114.1 (2001), págs. 579-590.
- [97] M. Peyrard y A.R. Bishop. «Statistical mechanics of a nonlinear model for DNA denaturation». En: *Phys. Rev. Lett.* 62.23 (1989), págs. 2755-2758. DOI: [10.1103/PhysRevLett.62.2755](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.2755). URL: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.62.2755>.
- [98] Thierry Dauxois, Michel Peyrard y A.R. Bishop. «Dynamics and thermodynamics of a nonlinear model for DNA denaturation». En: *Phys. Rev. E* 47.1 (1993), págs. 684-695. DOI: [10.1103/PhysRevE.47.684](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.47.684). URL: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.47.684>.
- [99] Tom Michoel e Yves Van-de Peer. «Helicoidal transfer matrix model for inhomogeneous DNA melting». En: *Phys. Rev. E* 73.1 (2006), pág. 011908. DOI: [10.1103/PhysRevE.73.011908](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.73.011908). URL: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.73.011908>.
- [100] C. Izanloo, G.A. Parsafar, H. Abroshan y H. Akbarzadeh. «Denaturation of Drew-Dickerson DNA in a high salt concentration medium: Molecular dynamics simulations.» En: *Journal of Computational Chemistry* 32.16 (2011), págs. 3354-3361.
- [101] Kresten Lindorff-Larsen, Stefano Piana, Kim Palmo, Paul Maragakis, John Klepeis, Ron Dror y David Shaw. «Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field». En: *Proteins* 78 (2010), págs. 1950-1958.
- [102] H.Ch. Spatz y Donald-M. Crothers. «The rate of DNA unwinding». En: *Journal of molecular biology* 42.2 (1969), págs. 191-219.
- [103] M.-Thomas Record y Bruno-H. Zimm. «Kinetics of the helix-coil transition in DNA». En: *Biopolymers* 11.7 (1972), págs. 1435-1484.

- [104] Gabriel Calvo y Ramón Alvarez-Estrada. «The time duration for DNA thermal denaturation». En: *Journal of Physics: Condensed Matter* 20.3 (2007), pág. 035101.
- [105] Marco Baiesi y Enrico Carlon. «Models of DNA denaturation dynamics: universal properties». En: *arXiv preprint arXiv:1402.6492* (2014).
- [106] Manoel Manghi y Nicolas Destainville. «Physics of base-pairing dynamics in DNA». En: *Physics Reports* 631 (2016), págs. 1-41.
- [107] Mogurampelly Santosh y Prabal-K. Maiti. «Force induced DNA melting». En: *Journal of Physics: Condensed Matter* 21.3 (2008).
- [108] Ken Brameld, Siddharth Dasgupta y William Goddard. «Distance dependent hydrogen bond potentials for nucleic acid base pairs from ab initio quantum mechanical calculations (LMP2 cc-pVTZ)». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 101.24 (1997), págs. 4851-4859.
- [109] Marco Baiesi y Roberto Livi. «Multiple timescales in a model for DNA denaturation dynamics». En: *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical* 42.8 (2009), pág. 082003.
- [110] Peter Fong. «The unwinding of the DNA molecule». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 52.2 (1964), págs. 239-246.
- [111] Karo Michaelian, Oliver Manuel y col. «Origin and evolution of life constraints on the solar model». En: *Journal of Modern Physics* 2.06 (2011), pág. 587.
- [112] Michele Parrinello y Aneesur Rahman. «Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method». En: *Journal of Applied physics* 52.12 (1981), págs. 7182-7190.
- [113] Michele Parrinello y Aneesur Rahman. «Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study». En: *Physical Review Letters* 45.14 (1980), pág. 1196.
- [114] H.J.C. Berendsen. «Transport properties computed by linear response through weak coupling to a bath». En: *Computer Simulation in Materials Science*. Springer, 1991, págs. 139-155.
- [115] Giovanni Bussi, Davide Donadio y Michele Parrinello. «Canonical sampling through velocity rescaling». En: *The Journal of chemical physics* 126.1 (2007), pág. 014101.
- [116] GROMACS, *online reference*. URL: <http://manual.gromacs.org/online.html>.
- [117] GROMACS, *Groningen Machine for Chemical Simulations, User manual, Version 5.05*. 2015.