



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estrategias para preservar los puentes disulfuro en cristales de lisozima de clara de huevo de *Gallus gallus*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Francisco Murphy Pérez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adela Rodríguez Romero
Facultad de Química

Dr. Gerardo Corzo Burguete
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos. Junio 2019



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.

Francisco Murphy Pérez: Estrategias para preservar los puentes disulfuro en cristales de lisozima de clara de huevo de *Gallus gallus*. © Junio 2019

A Lucía Murphy Carrera, por supuesto.

Te amo.

RESUMEN

Actualmente la cristalografía de rayos X es la principal técnica experimental para obtener la estructura de una macromolécula. El daño por radiación es un problema inherente en esta técnica.

Los experimentos de difracción de rayos X se realizan a una temperatura de -173°C , por lo que las únicas especies reactivas son los electrones solvatados, los átomos de hidrógeno y los huecos positivos. La captura de los primeros por parte de los puentes disulfuro de las proteínas, promueve la ruptura de los mismos. Este daño sobre residuos particulares de la macromolécula cristalizada, se conoce como daño específico.

En esta tesis se intentó mitigar este daño sobre los puentes disulfuro, al reducir el número de electrones solvatados dentro del cristal. Como modelo se usó la lisozima de clara de huevo de gallina (*Gallus gallus*), la cual es fácil de cristalizar y posee cuatro puentes disulfuro. Se abordaron dos diferentes estrategias para llevar a cabo este proyecto: (i) añadir, por medio de remojo, metales de transición al cristal macromolecular y (ii) cambiar el pH de la condición de cristalización.

El daño específico fue mayor en los cristales remojados con compuestos con átomos metálicos, a comparación del cristal nativo. En cuanto al cambio de pH en la condición de cristalización, de manera inesperada, el cristal relativamente más básico fue el que presentó menor daño sobre los puentes disulfuro.

En conclusión, a pesar de ser aceptores de electrones, los átomos metálicos elevan la dosis de radiación absorbida por el cristal macromolecular lo que hace que el daño por radiación sea mayor. Con respecto al cambio de pH en la condición de cristalización, los resultados obtenidos son contrarios a los esperados de acuerdo a la hipótesis planteada. Como perspectiva, se sugiere la investigación, con mayor detalle, del efecto del pH en el daño por radiación en cristales macromoleculares.

...if we were to name the most powerful assumption of all,
which leads one on and on in an attempt to understand life,
it is that all things are made of atoms, and that everything
that living things do can be understood in terms of the
jiggings and wiggings of atoms.

— Richard P. Feynman, The Feynman Lectures on Physics.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron a este trabajo de investigación.

- A los desarrolladores y/o documentadores de *software* libre, en específico aquellos involucrados en las aplicaciones que utilicé durante mi tesis: CCP4, PDB-RED0, Phenix, XDS, BUSTER, autoPROC, ADXV, PyMOL, Chimera, VMD, Coot, LaTeX, TeXStudio, Jabref y Sci-Hub.
- A todos los mexicanos que pagan impuestos; pues por año y medio, vía CONACYT, tuve acceso a una fuente de ingresos suficiente para sobrevivir.
- A la comunidad de T_EX en *stackexchange* y los suscritos en los *mailing lists* de CCP4 y Phenix, por responder mis preguntas.
- A Ulises Salazar Kuri y Vivian Stojanoff por la ayuda con los experimentos y X6a, respectivamente.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para participar en el Curso Internacional *Macromolecular Crystallography School "From data processing to structure refinement and beyond"* en el Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay (abril 2015).
- A la comunidad del Instituto de Biotecnología, en especial aquellos pertenecientes al laboratorio ocho, por la convivencia.
- Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por su tutoría y el café (ya deja la SA!).
- A mi generación de la maestría por el ejemplo y los buenos ratos.
- A mi familia por el apoyo y todo lo que me aguantaron.
- A Motorilo por invitarme a bicicletear y jugar fútbol.
- A Haly por acompañarme en esto que se llama vida
- A Lucy por ser.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Cristalografía de rayos X	1
1.2	Daño por radiación	2
1.2.1	Origen	2
1.2.2	Clasificación	2
1.2.3	Consecuencias	3
1.2.4	Métricas	3
1.3	Crioprotección	4
1.4	Límite de Garman	5
1.5	Radioprotectores	6
1.5.1	Incongruencias	6
1.6	Ruptura del puente disulfuro	7
1.7	Lisozima	8
2	ANTECEDENTES	9
2.1	Planteamiento del problema	9
2.2	Motivación	9
2.3	Estrategia I: adición de metales de transición	9
2.4	Estrategia II: cambio de pH de la condición de cristalización	11
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
4	MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1	Cristalización de lisozima	15
4.2	Crioprotección y adición de radioprotectores	16
4.3	Difracción de cristales	16
4.4	Procesamiento de datos	17
4.5	Afinamiento de estructuras	17
4.6	Dosis de radiación absorbida	18
4.7	Análisis del daño por radiación	18
5	RESULTADOS	19
5.1	Cristalización	19
5.2	Procesamiento de datos	20
5.3	Modelos estructurales	21
5.4	Dosis de radiación absorbida	22
5.5	Análisis del daño por radiación	23
5.6	Diferencia de densidad electrónica	25
6	DISCUSIÓN	29
6.1	Comparación con estudio previos	29
6.2	Métricas tradicionales	32
7	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	33
7.1	Estrategia I	33
7.2	Estrategia II	33

7.3	Perspectivas	34
A	SINCROTRONES	35
B	ESTADÍSTICAS CRISTALOGRÁFICAS	37
C	PROCESAMIENTO DE DATOS	39
D	AJUSTE DE LA DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA	41
	BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Patrón de difracción	1	
Figura 1.2	Mapas de diferencia de densidad electrónica	4	
Figura 1.3	Modelos de la ruptura del puente disulfuro	7	
Figura 1.4	Modelo estructural de la lisozima	8	
Figura 2.1	Complejos con metales de transición	10	
Figura 4.1	Difusión de vapor en modo gota colgante	15	
Figura 5.1	Cristales de lisozima	19	
Figura 5.2	Modelos iniciales	21	
Figura 5.3	Dosis estimada	22	
Figura 5.4	Intensidad promedio y R_{meas}	23	
Figura 5.5	Intensidad promedio y volumen de la celda unitaria	24	
Figura 5.6	Diferencia de densidad electrónica: C ₆ –C ₁₂₇	25	
Figura 5.7	Diferencia de densidad electrónica: C ₃₀ –C ₁₁₅	25	
Figura 5.8	Diferencia de densidad electrónica: C ₆₄ –C ₈₀	26	
Figura 5.9	Diferencia de densidad electrónica: C ₇₆ –C ₉₄	26	
Figura 5.10	Diferencia de densidad electrónica	27	
Figura 6.1	Figura cinco del estudio de De la Mora <i>et al.</i>	30	
Figura 6.2	Figura seis del estudio de Sutton <i>et al.</i>	30	
Figura 6.3	Figura ocho del estudio de De la Mora <i>et al.</i>	31	
Figura 6.4	Diferencia de densidad electrónica en 2YBH	32	
Figura A.1	Sincrotrón	35	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1	Parámetros de remojo	16	
Tabla 5.1	Procesamiento de datos	20	
Tabla 5.2	Modelos iniciales	21	
Tabla D.1	Ajuste de la dosis de radiación absorbida	41	

ACRÓNIMOS

CRX	Cristalografía de rayos X
BDP	Base de datos de proteínas
NLS	<i>National Synchrotron Light Source</i>
DRA	Dosis de radiación absorbida

INTRODUCCIÓN

1.1 CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Para determinar la estructura atómica de una macromolécula, es común emplear la resonancia magnética nuclear y/o la cristalografía de rayos X (CRX). Los modelos estructurales se depositan en la base de datos de proteínas (BDP) [1]. Cerca del 90 % de los depósitos se han dado gracias a la CRX.

El experimento de CRX es relativamente simple y consiste en la repetición de tres pasos: (i) incidir rayos X sobre el cristal de la macromolécula de interés, (ii) captar, por algún medio, el patrón de difracción resultante y (iii) rotar sobre un eje, respecto a un marco de referencia, el cristal. El objetivo radica en coleccionar suficientes patrones de difracción, los cuales contienen información necesaria para determinar la estructura macromolecular. La teoría en sí es un poco más complicada. En breve, la energía de los rayos X se puede transferir a los electrones de las moléculas que conforman el cristal. Si la transferencia se da de forma elástica, los electrones oscilarán con la misma frecuencia que la onda de rayos X incidente. Esto resulta en una emisión de rayos X que a su vez pueden interferir entre sí, de forma destructiva o constructiva. Únicamente si la diferencia entre las fases de las ondas de estos rayos X es exactamente igual a $n2\pi$ radianes, donde n es un número entero, la interferencia será constructiva [2]. Dicho evento se manifiesta como uno de los tantos puntos en un patrón de difracción (figura 1.1).

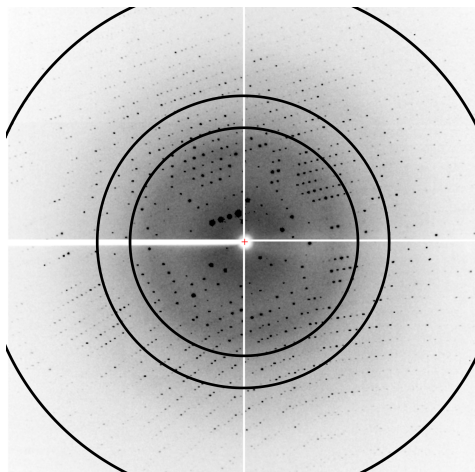


Figura 1.1: Patrón de difracción de un cristal de proteína. Cada pixel tiene asociada una intensidad, proporcional al número de fotones detectados. Los anillos concéntricos, o fajas de resolución, indican la resolución estructural de los datos: interno, medio y externo a 3.0, 2.4 y 1.5 Å. Imagen creada con [ADXV v. 1.9.13](#) y el patrón de difracción en <https://tinyurl.com/ydfw6asv>.

1.2 DAÑO POR RADIACIÓN

Una de las limitantes de la **CRX**, es el daño que causan los rayos X sobre el cristal macromolecular. Esto se conoce como daño por radiación y en última instancia provoca que cada cristal macromolecular presente un límite temporal, denominado tiempo de vida útil, donde la información contenida en los patrones de difracción se degrada hasta perderse. La cantidad de patrones de difracción que puedan obtenerse de un cristal macromolecular dependerá, entre otros factores, de su tiempo de vida útil. Entre mayor sea el daño por radiación, peores serán las consecuencias.

El daño por radiación ha sido un problema fundamental para la **CRX**, incluso desde la primer macromolécula determinada [3]. Para aquella época, a finales de la década de 1950, era común monitorear la intensidad de un par de puntos en el patrón de difracción y cambiar el cristal por uno nuevo si la intensidad se reducía entre 15 a 30 % de su valor inicial [4]. Por esta razón, la mayoría de los modelos estructurales depositados en la **BDP**, por lo menos antes del año 2000, representan un promedio de varios cristales [5].

1.2.1 Origen

El daño por radiación se da porque los electrones de las moléculas que conforman el cristal, absorben la energía de los fotones incidentes. La absorción tiene su causa en uno de dos fenómenos físicos: el efecto fotoeléctrico o la dispersión inelástica. La probabilidad de que se dé el primero es un orden de magnitud mayor que el segundo. El efecto fotoeléctrico consiste en la absorción total de un fotón por un electrón. Como consecuencia el electrón es expulsado de su orbital dejando una vacante electrónica, conocido como hueco positivo (h^+), en la molécula que lo contenía. La energía de los electrones liberados, llamados fotoelectrones, se disipa en la trayectoria que estos hayan tomado; generando cientos de iones, radicales libres y eventos de excitación molecular. Los radicales son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, por ende su reactividad es muy alta y su tiempo de vida es particularmente corto. Una reacción en cadena de radicales libres es inminente. Si algún radical, o cualquier especie química producto de la radiación, llegase a perturbar alguna molécula que forme parte de la red de los contactos cristalinos, se perdería entonces el orden cristalino [6]. Sin cristal no hay experimento, por lo que es crucial coleccionar suficientes patrones de difracción antes de que esto suceda.

1.2.2 Clasificación

El daño por radiación se clasifica de acuerdo con su escala temporal. El daño primario es la ionización dada por el efecto fotoeléctrico. El daño secundario es la subsecuente cascada de radicales libres, dependiente del tiempo y de la temperatura. El daño terciario se define como el daño físico, visible mediante un microscopio óptico, sobre el cristal. Esto implica que una fracción suficiente de macromoléculas ha sido afectada por el daño primario y secundario [7].

1.2.3 Consecuencias

Las consecuencias del daño por radiación se observan en: (i) la disminución de la intensidad de los puntos en el patrón de difracción, sobre todo aquellos en las fajas de alta resolución; (ii) un cambio del volumen de la celda unitaria¹, que causa la pérdida de la isomorfía cristalina; (iii) el aumento en los parámetros de desplazamiento atómico²; y (iv) la degradación general de las medidas que indican la calidad global de los datos [7]. El listado anterior se conoce como daño a nivel global. Por otra parte, el daño específico se refiere al daño estructural en la macromolécula cristalizada. Esto conlleva un orden dado: primero ocurre la reducción de átomos metálicos; después se da la ruptura de puentes disulfuro; luego la descarboxilación de aspartatos y glutamatos; y finalmente se pierde el grupo tiometilo de las metioninas [8, 9]. No todos los residuos de aminoácidos susceptibles son afectados de la misma manera. Las razones de esto no están del todo claras [10]. Por este motivo, aunque existen ciertos principios básicos para determinar el daño específico, es difícil predecirlo y saber de antemano el grado en que afectará el modelo estructural obtenido.

En último grado, puede ser imposible obtener una estructura macromolecular debido a la inherente susceptibilidad del cristal al daño por radiación o a la pérdida de isomorfía cristalina.

1.2.4 Métricas

La mejor manera de determinar el daño por radiación en un cristal macromolecular, es estimando la dosis de radiación absorbida (DRA) por el cristal. La DRA depende a su vez de la composición atómica del cristal y de algunos parámetros del haz de rayos X [11]. La DRA se mide en Grays (Gy) que, según el Sistema Internacional de Unidades, es equivalente a la absorción de un Joule de energía ionizante por kilogramo de material irradiado. En experimentos de CRX es típico encontrar valores de DRA del orden de MGy (1×10^6 Gy) [4]. En este aspecto, se han propuesto varias métricas para cuantificar el daño por radiación en función de la DRA; sin embargo, se ha demostrado que el uso de distintas métricas puede dar diferentes resultados [12]. Actualmente no existe una métrica que haya sido acordada por unanimidad.

Como ya se mencionó, anteriormente se monitoreaba la intensidad de algunos puntos del patrón de difracción y se cambiaba el cristal usado por uno nuevo cuando la intensidad de dichos puntos decaía hasta cierto nivel. Hoy en día es común comparar la intensidad promedio entre patrones de difracción o entre todo un conjunto de patrones de difracción. En general se toma la intensidad promedio a una dosis dada y se divide por la intensidad promedio inicial, es decir: \bar{I}_D / \bar{I}_0 . Dicha comparación tiene que darse entre patrones de difracción equivalentes, ya sea usando la imagen completa o considerando fajas de resolución específicas (véase [13] o [14], respectivamente).

Para visualizar el daño específico, es común crear mapas de diferencia de densidad electrónica entre conjuntos de datos con diferentes DRA (figura 1.2).

1 La unidad mínima que al ser repetida n veces por operaciones de translación en x , y y z , reproduce el cristal completo.

2 Una medida de la confianza en la ubicación de cada átomo del modelo estructural.

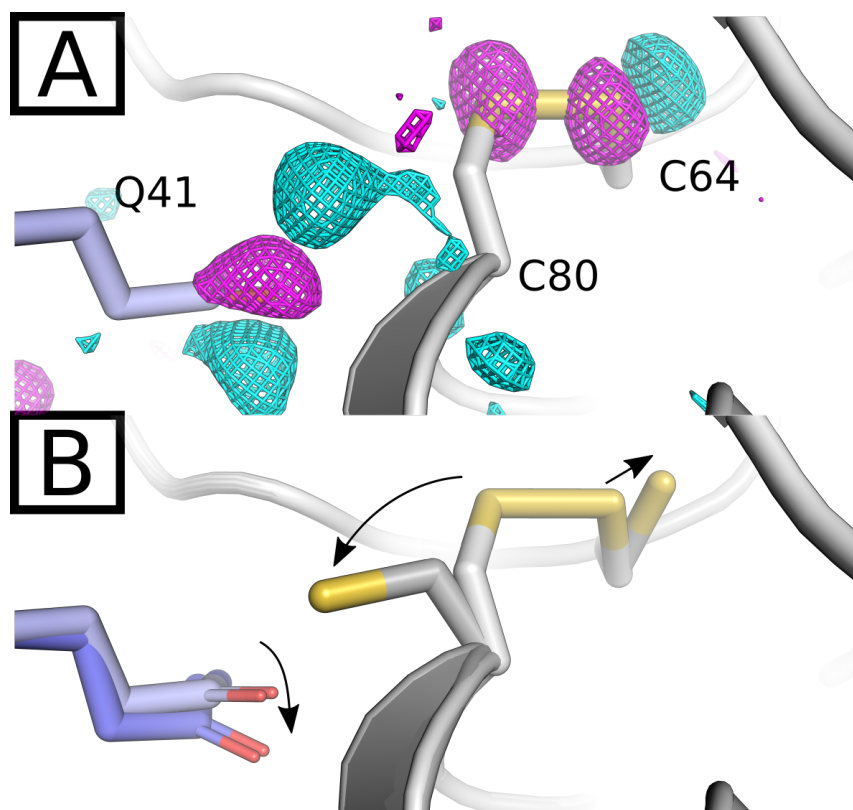


Figura 1.2: Mapas de diferencia de densidad electrónica entre dos conjuntos de datos. En [A] se muestra el modelo estructural obtenido del primer conjunto de datos. También se representa la diferencia de densidad electrónica entre el primer (DRA igual a 0.6 MGy) y el segundo (DRA igual a 3.2 MGy) conjunto de datos. La diferencia de densidad electrónica negativa (magenta) y la positiva (cian) están a $\pm 3.5 \sigma$, respectivamente. De acuerdo con el modelo estructural inicial, existe una densidad electrónica negativa en la posición de los átomos de azufre ($S\gamma$) involucrados en la formación del puente disulfuro. Esto implica que la posición de estos átomos para la segunda colecta de datos, no corresponde totalmente a la del modelo inicial; sino que una parte está dada por el puente disulfuro y otra parte por un nuevo confórmero de cada cisteína [B]. En pocas palabras, el daño por radiación promovió la ruptura de este puente disulfuro en un número significativo de celdas unitarias dentro del cristal. Nótese además que el nuevo confórmero de la cisteína 80 provoca un cambio en la conformación de la cadena lateral de la glutamina 41, un contacto cristalino. Imagen creada con PyMOL v. 2.2 y los datos correspondientes a 2BLX y 2BLY del estudio de Nanao *et al.* [15].

1.3 CRIOPROTECCIÓN

El primer estudio en el que se valoró el potencial de la crioprotección para reducir el daño por radiación, surgió por necesidad. Sucedió que ciertos cristales de insulina con átomos pesados, sufrían un rápido desgaste por la radiación. Con base en la observación de que el daño secundario es dependiente, en parte, de la temperatura; Low *et al.* compararon, de manera cualitativa, el deterioro de los

patrones de difracción colectados a 21, 0 y a -13°C . Los resultados fueron claros: a menor temperatura, mayor el tiempo de vida útil de los cristales [16].

El problema con la reducción de temperatura en cristales macromoleculares, era la formación de hielo dentro de estos. Fue Haas quien primero usó crioprotectores para prevenir este problema. En el primer caso logró reducir la temperatura hasta -50°C , remojando cristales de lisozima entrecruzados con glutaraldehído en una mezcla de agua con glicerol [17]. En un estudio posterior con cristales de lactato deshidrogenasa, el proceso de entrecruzamiento destruía los cristales. En cambio, si solo eran remojados por un par de días en una solución con sacarosa, el daño por radiación era diez veces menor [18]. Este enfoque fue generalizado por Petsko, quien obtuvo temperaturas de hasta -70°C en una docena de diferentes cristales de proteína. En diez de los doce cristales estudiados, el daño por radiación se declaró nulo [19]. Una de las desventajas de esta técnica es encontrar las condiciones de crioprotección adecuadas para cada macromolécula [19]. A pesar de este detalle, la crioprotección fue ganando adeptos de tal forma que para el año 2000 era parte de la rutina de la CRX [5]. Gracias a la crioprotección, en general era suficiente un único cristal macromolecular para obtener un conjunto de datos completo.

Por otro lado se dio un avance importante en el brillo³ de las fuentes de rayos X, en particular de los sincrotrones. Este adelanto permitió: (i) obtener patrones de difracción de mejor calidad, (ii) llevar a cabo el experimento en mucho menos tiempo y (iii) la posibilidad de emplear cristales de menor tamaño [20]. Desafortunadamente, a causa de este avance en brillo, el daño por radiación volvió a ser evidente a pesar del uso rutinario de la crioprotección [7-9, 21, 22].

1.4 LÍMITE DE GARMAN

El valor máximo de DRA para cristales macromoleculares se determinó experimentalmente en un estudio con cristales de apo y holoferritina [13]. Este límite, mejor conocido como límite de Garman, equivale a 30 MGy. En el mismo estudio se observó que este límite correspondía a un decaimiento de la intensidad inicial promedio, I_0 , hasta un valor igual a $0.7I_0$.

El límite de Garman es una aproximación para estimar el tiempo de vida útil de un cristal macromolecular, pero no es general. Es válido que ciertos cristales sean más susceptibles al daño por radiación y por lo tanto su límite sea menor. Por ejemplo, Liebschner *et al.* hallaron que en cristales de taumatina el valor de D_{70} , la DRA a la cual se tiene $0.7I_0$, correspondía a una tercera o una cuarta parte del límite de Garman, dependiendo de la energía de los rayos X usados [23]. En el otro extremo, se supone que si una colecta de datos supera dicho límite, el deterioro de los datos experimentales tendrá graves consecuencias, desde conseguir una estructura alterada en cierto grado por la radiación, hasta la incapacidad de conseguir una estructura a causa de la pérdida de isomorfía cristalina o del orden cristalino [13].

³ El brillo se define como la distribución del flujo de fotones en el espacio y el rango angular. El flujo se establece a su vez como el número de fotones por segundo que atraviesan un área definida por un ancho de banda dado [20].

1.5 RADIOPROTECTORES

Otra estrategia para mitigar el daño por radiación, es el uso de radioprotectores. El objetivo de estas moléculas es que reaccionen con los radicales, u otras especies químicas generadas por la radiación, antes que la macromolécula cristalizada. Las características principales que deben tener son: (i) no afectar el orden cristalino, (ii) tener una constante de reacción alta por la especie química a neutralizar y (iii) en caso de que se necesite su difusión, tener un tamaño adecuado para moverse a través de los canales de solvente en el cristal macromolecular. Además es claro que deben de tenerse en cuenta otras propiedades como la solubilidad, la toxicidad y el valor monetario.

En 1974 se realizó el primer estudio enfocado en esta estrategia por Zaloga y Sarma; quienes notaron que al añadir estireno a cristales de una inmunoglobulina G, se prolongaba su tiempo de vida útil [24]. Diez años después Cascio *et al.* introdujeron polietilenglicol⁴ en cristales de tres proteínas diferentes y notaron también un aumento en el tiempo de vida útil de los cristales [25]. Debido al éxito de la crioprotección para ese entonces, no hubo investigaciones que siguieran estos estudios. Fue hasta que el daño por radiación emergió de nuevo como un problema fundamental en la CRX, que los estudios en este aspecto se retomaron.

1.5.1 *Incongruencias*

Actualmente no hay una noción a favor del uso de radioprotectores en el campo de la CRX, básicamente por dos razones: la primera es que con suficientes cristales, se pueden conseguir suficientes patrones de difracción y entonces es posible determinar la estructura macromolecular [26]. En segundo lugar, los resultados de diferentes grupos de investigación no concuerdan entre sí. Por ejemplo: (i) Murray y Garman, usando cristales de lisozima, no consiguen recrear los resultados de Zaloga y Sarma [27]. (ii) Los resultados de Cascio *et al.* son puestos en duda por Southworth-Davies *et al.* al demostrar la ineffectividad del polietilenglicol para ciertas moléculas pequeñas que servían como modelos del puente disulfuro. Además en este estudio se probaron una veintena de posibles radioprotectores y solo dos destacaron; la 1,4-benzoquinona y el ácido ascórbico [28]. (iii) Kauffmann *et al.* en el 2006 investigaron el efecto del ácido nicotínico, glutatión y el ácido ditionitrobenzoico; en cristales de lisozima, taumatina y elastasa. Usaron un cristal por cada combinación. Los tres radioprotectores mostraron un efecto de protección en todos los casos, excepto el glutatión para la lisozima [29]. En contraparte, en el 2009, Nowak *et al.* compararon varios cristales de tripsina con y sin ácido nicotínico. Encontraron que dependiendo del cristal analizado, se podían obtener conclusiones totalmente diferentes: el ácido nicotínico era perjudicial o un buen radioprotector [30]. (iv) De la Mora y colaboradores cotejaron cristales de lisozima con y sin nitrato de sodio y observaron una tolerancia dos o cinco veces mayor a los rayos X, dependiendo de la métrica usada, si el cristal poseía dicho radioprotector. Cabe señalar que este es el único estudio en el que se ha observado la reducción de una molécula de nitrato, en la vecindad de un puente disulfuro, a nitrito [31].

Estos conflictos se deben al uso de distintas métricas, a diferentes formas de procesar los datos experimentales y a la variación entre cristales macromolecula-

⁴ Polietilenglicol 4000 o 20000, dependiendo del cristal macromolecular.

res, aún aquellos crecidos en la misma condición de cristalización [12]. El lector interesado podrá encontrar en el material suplementario del estudio anterior, un resumen de posibles radioprotectores investigados en la CRX hasta ese entonces.

1.6 RUPTURA DEL PUENTE DISULFURO

Uno de los fenómenos más notables del daño por radiación es la ruptura de los puentes disulfuro. Se han propuesto dos modelos para explicar este fenómeno. En el primero (figura 1.3 [A]), se propone la formación de un intermediario aniónico (1) que puede regresar a su estado original o descomponerse por una de dos vías: con la ruptura espontánea del enlace disulfuro (2), produciendo en tal caso el radical tiilo y el tiolato; o a través de una protonación (3), formando un radical con carga neutra para generar eventualmente un radical tiilo y una cisteína (4). La formación del radical aniónico se atribuye a electrones solvatados que pueden moverse desde los canales de solvente hacia la cadena principal de la proteína cristalizada, terminando en los puentes disulfuro de la misma. Además se plantea un mecanismo de reparación, dado por la transferencia de huecos positivos hacia el radical aniónico (-1).

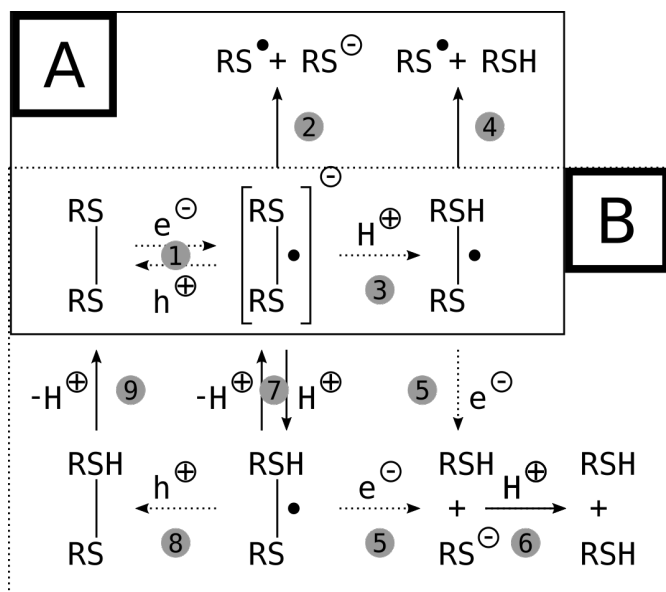


Figura 1.3: Modelos de la ruptura del puente disulfuro. En [A] se muestra el modelo de acuerdo con el estudio de Carpentier *et al.* [32] y en [B] el de Sutton *et al.* [33]. Las flechas punteadas representan reacciones con productos de la radiación: electrones (e^-), huecos positivos (h^+) y átomos de hidrógeno (H^+).

El segundo modelo (figura 1.3 [B]), se denominó como el modelo de múltiples rutas⁵ y toma en cuenta la interacción entre estas. La ruptura del enlace disulfuro es debida a una protonación, que puede ser reversible o no (7 o 3, respectivamente) y una segunda reducción por un electrón (5), proveniente precisamente de una ruta adyacente. Una segunda protonación resulta en los dos residuos de cisteína reducidos (6).

⁵ Una ruta se define como la trayectoria en la que un fotoelectrón disipa su energía.

1.7 LISOZIMA

La lisozima de clara de huevo de gallina (*Gallus gallus*), es una enzima de 129 residuos de aminoácidos con una masa aproximada de 14.3 kDa [34]. Su número de identificación es 3.2.1.17, lo que significa que es una hidrolasa, en específico una glucosidasa [35]. Su función consiste en romper el enlace entre los residuos que conforman el componente principal de la pared celular bacteriana, el peptidoglicano [35].

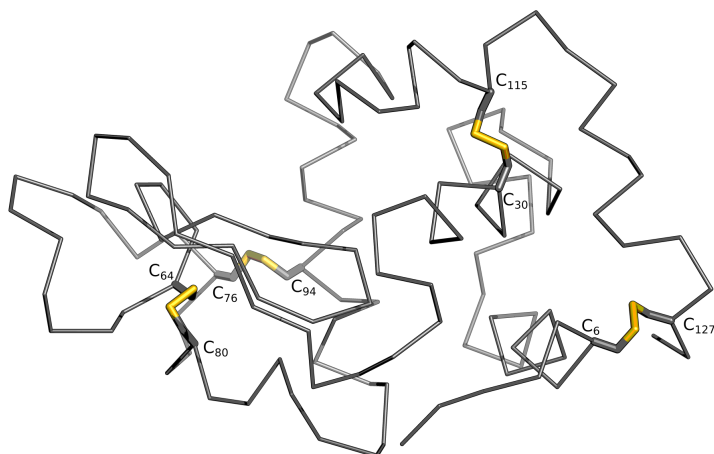


Figura 1.4: Modelo estructural de la lisozima. El identificador de este modelo estructural en la BDP es 3A8Z y tiene una resolución de 1.4 Å [36]. Se muestra el trazado de los C α de la proteína y sus respectivos puentes disulfuro. Imagen creada con PyMOL v. 2.2.

Gracias a la CRX, fue la primer enzima de la cual se obtuvo un modelo estructural y un posible mecanismo de función [37, 38]. La lisozima está formada por dos dominios, uno compuesto mayoritariamente por hebras β y el otro por hélices α . Además posee cuatro puentes disulfuros entre sus ocho residuos de cisteína: C₆-C₁₂₇, C₃₀-C₁₁₅, C₆₄-C₈₀ y C₇₆-C₉₄ (figura 1.4).

Esta macromolécula se ha usado como modelo en una gran cantidad de estudios pertinentes al daño por radiación; por esta razón y porque es fácil de cristalizar, se consideró como un modelo adecuado para este proyecto.

ANTECEDENTES

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es muy común exceder el límite de Garman en un experimento de CRX, sobre todo al usar sincrotrones de tercera generación. Debido a esto es típico encontrar daño específico en los modelos estructurales de macromoléculas depositados en la BDP. Las metaloproteínas, en general, son las más afectadas. Dichos modelos son usados por una cantidad de investigadores que, desafortunadamente, no tienen conocimiento alguno del daño por radiación. Si no se tiene cuidado en este aspecto, se podrían llegar a generar conclusiones erróneas en cuanto al funcionamiento de la macromolécula de interés [39].

Por otra parte, el daño por radiación es uno de los factores que limita en gran medida la determinación estructural de algunas proteínas [4].

2.2 MOTIVACIÓN

Se han investigado varias estrategias para minimizar el daño por radiación en cristales de macromoléculas. La crioprotección ha demostrado ser útil en este sentido. Buscar estrategias eficientes en la reducción del daño por radiación, es el motivo del presente trabajo. Con el fin de que las estrategias que se encuentren en este estudio puedan generalizarse e influyan, de manera positiva, en la calidad de modelos estructurales aún por venir.

El uso de radioprotectores podría combinarse fácilmente con la crioprotección. Con base en la idea general de los radioprotectores, se investigaron dos posibles maneras de reducir el daño por radiación: con la adición de metales de transición al cristal y cambiando el pH de la condición de cristalización.

2.3 ESTRATEGIA I: ADICIÓN DE METALES DE TRANSICIÓN

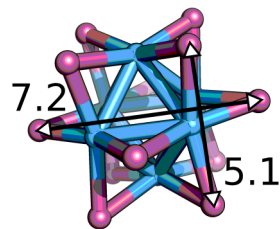
Durante la investigación de la sensibilidad de las enzimas a la radiación ionizante, *circa* 1960-1970, surgió evidencia experimental de que ciertos iones metálicos otorgaban un efecto radioprotector [40-42]. La hipótesis que se propuso entonces fue que los iones metálicos funcionaban como aceptores de electrones, recibiendo precisamente los electrones liberados por el efecto fotoeléctrico. En estos estudios, en general, las condiciones experimentales eran diferentes a las que se tienen en la CRX.

Teniendo en cuenta los estudios anteriores, Murray y Garman calcularon el resultado de la inclusión de algunos compuestos con metales de transición a cristales de apoferritina. Concluyeron que la sola presencia de iones metálicos dentro del cristal macromolecular, podría incrementar la DRA y por lo tanto el daño por radiación [27]. Esto sucede porque el cambio de la composición química del cristal, resulta en un cambio en su coeficiente de absorción μ^1 . Debido a

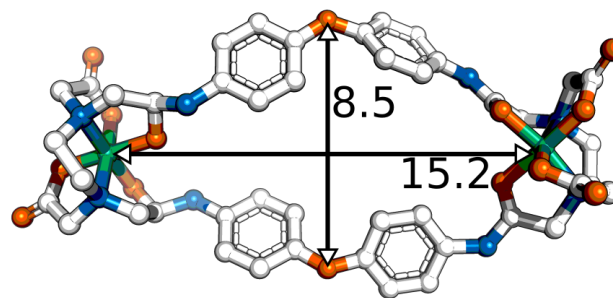
¹ En general $\mu \propto Z^4$, donde Z corresponde al número atómico [20]

este efecto deletéreo, hasta donde el autor tiene conocimiento, solo Macedo *et al.* han probado un par de compuestos con metales de transición como radioprotectores en cristales macromoleculares. Según sus conclusiones, el hexacionaferrato (III) de potasio fue el único compuesto que mitigó parcialmente la reducción del átomo de cobre en el centro metálico de la azurina [43].

Por otra parte es claro que la reducción de los átomos metálicos ocurre antes que la ruptura de los puentes disulfuro [44, 45]. Por lo tanto es posible que la introducción de compuestos con metales de transición al cristal macromolecular, pueda disminuir la ruptura de los puentes disulfuro. La constante de reacción del ion cobre (II) por el electrón solvatado es de $3 \times 10^{10} \text{ L M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [46]. Aquí se investigó el efecto de dos compuestos con iones cobre (II); el sulfato de cobre y el ciclofano binuclear de cobre. El primero es un precipitante de uso común en la CRX. El segundo se obtuvo gracias al Dr. Rogerio Sotelo Mundo, investigador del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo del estado de Sonora. Este compuesto posee dos átomos de cobre coordinados (figura 2.1) [47].



(a) Cluster de tantalio

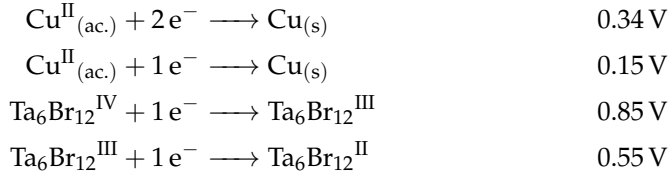


(b) Ciclofano binuclear de cobre

Figura 2.1: Modelos atómicos del *cluster* de tantalio y el ciclofano binuclear de cobre. Las coordenadas del primero se obtuvieron de la BDP, como coordenadas ideales. Al no haber estructura cristalográfica del segundo, se modeló en el programa Avogadro v. 1.2.7 [48], optimizando su geometría. Las flechas indican la distancia en Å. El código de colores es el siguiente. En (a); magenta y azul para bromo y tantalio, respectivamente. En (b); blanco, azul, naranja y verde para carbono, nitrógeno, oxígeno y cobre, respectivamente. Imagen creada con PyMOL v. 2.2

Por otra parte, estudiando la fotodinámica de *clusters* metálicos, se notó que la introducción del *cluster* de tantalio (figura 2.1) y de hexabromuro de platino

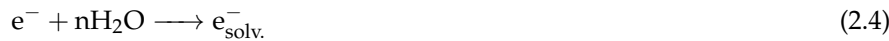
a un cristal de lisozima, parecían evitar la ruptura de los puentes disulfuro de esta macromolécula, por lo menos hasta una DRA aproximada de 10 MGy (figura 2 en [49]). A comparación, De la Mora *et al.* y Carpentier y colaboradores, notan la ruptura de los puentes disulfuro de la misma proteína a una DRA de 4.7 y 3.62 MGy, respectivamente (figura 5 en [31] y figura 3 en [32]). En este caso se cree que el *cluster* de tantalio podría funcionar como un sumidero de electrones y huecos positivos, ya que su estructura se mantiene a pesar de que cambie su número de oxidación [50]. El potencial de reducción estándar para el *cluster* de tantalio y el ión cobre se presenta a continuación [51, 52].



2.4 ESTRATEGIA II: CAMBIO DE PH DE LA CONDICIÓN DE CRISTALIZACIÓN

La observación de que residuos de aminoácidos idénticos parecen tener susceptibilidades diferentes al daño por radiación, implica que el daño específico es causado en buena parte por el daño secundario y no por el daño primario. Por otra parte, dado el uso rutinario de la crioprotección en la CRX, es normal realizar el experimento de difracción a una temperatura de -173°C . Esto significa que los mecanismos químicos del daño por radiación específico, se limitan a reacciones dadas por huecos positivos, electrones y átomos de hidrógeno; puesto que son las únicas especies químicas capaces de moverse a esta temperatura [53, 54].

Según las siguientes reacciones, la radiólisis del agua presente en el cristal macromolecular, produce tres tipos de radicales libres: el radical hidroxilo (HO^\bullet), el electrón solvatado ($e^-_{\text{solv.}}$) y el átomo de hidrógeno (H^\bullet) [55].



Las subsecuentes reacciones de recombinación pueden suceder:



El átomo de hidrógeno y el electrón solvatado se encuentran en un equilibrio ácido-base ($\text{p}K_a = 9.1$); por lo tanto el electrón solvatado se convierte en H^\bullet en una solución ácida.



Las constantes de reacción para las reacciones anteriores, 2.6-2.11, son del orden de 1×10^9 a $1 \times 10^{10} \text{ L M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [56].

Se propone aquí que a una mayor acidez, es decir, un exceso de protones, en el cristal macromolecular, habrá una mayor acumulación de átomos de hidrógeno (reacción 2.11) y por lo tanto mayor será su recombinación (reacción 2.9), evitando así reacciones adversas por parte de los electrones solvatados con los puentes disulfuro de la proteína.

Desafortunadamente también existe un problema con este enfoque, pues se ha sugerido que la acumulación de hidrógeno molecular dentro del cristal macromolecular podría ser la principal causa de los efectos del daño por radiación a nivel global [57].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis es que tanto los metales de transición como los protones pueden servir como radioprotectores en cristales de lisozima. En general las dos estrategias pretenden reducir el número de electrones solvatados; mitigando, en particular, la ruptura de los puentes disulfuro en cristales de lisozima de clara de huevo de gallina.

El objetivo general es conocer el efecto que tendrá el cambio de pH en la condición de cristalización y la adición de tres posibles radioprotectores con metales de transición, en cristales de lisozima; en específico sobre la ruptura de los puentes disulfuro de esta proteína.

Los objetivos particulares son:

1. Crear cristales de lisozima a tres valores de pH: 3.7, 4.7 y 5.7.
2. Añadir, por separado, los radioprotectores a cristales con un pH igual a 4.7.
3. Criopreservar cada cristal.
4. Colectar conjuntos de datos secuenciales para cada cristal obtenido.
5. Procesar los datos experimentales.
6. Obtener un modelo atómico para cada serie de colectas.
7. Comparar el daño por radiación, a dosis equivalentes, entre los diferentes cristales.

4.1 CRISTALIZACIÓN DE LISOZIMA

Todos los reactivos usados para los experimentos de cristalización fueron de grado ultrapuro y conseguidos de Sigma-Aldrich, incluida la lisozima con el número de catálogo L6876. Los cristales de proteína se crecieron con la técnica conocida como difusión de vapor, en modo gota colgante, con el siguiente protocolo (figura 4.1): (i) Colocar grasa de vacío en el borde de un pozo de una placa de cristalización y agregar 1 ml de la solución precipitante al pozo. Esta se prepara con acetato de sodio a 100 mM y 10% peso sobre volumen de cloruro de sodio a un pH de 4.7 a 25 °C. (ii) Sobre un cubreobjetos siliconizado añadir 2 μ l de la solución precipitante y 2 μ l de la solución con proteína, que en este caso es la misma solución precipitante pero con una concentración de 25 mg mL⁻¹ de lisozima. (iii) Cubrir el pozo con el cubreobjeto. La mezcla anterior, *i.e.* la gota de cristalización, debe quedar colgando. (iv) Mantener la placa de cristalización a 18 °C. 48 horas después buscar cristales dentro de la gota colgante, con ayuda de un microscopio óptico.

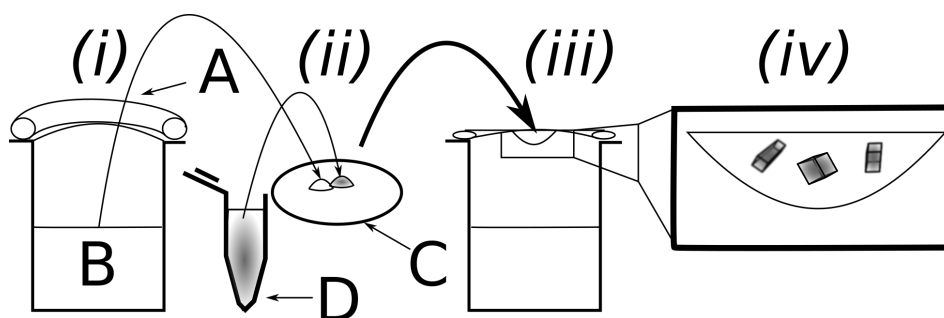


Figura 4.1: Esquema del experimento de cristalización. A, B, C y D señalan respectivamente: la grasa de vacío, la solución precipitante, el cubreobjetos y la solución con proteína.

Para evaluar el efecto de la estrategia II, el cambio de pH en la condición de cristalización, el protocolo anterior se repitió pero ajustando el pH a 3.7 o 5.7. Se decidió utilizar estos valores de pH, sencillamente porque correspondían a los límites del amortiguador de la condición de cristalización usada. El cambio de pH se realizó a 25 °C con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, dependiendo del efecto deseado. Por simplicidad, los cristales con diferente pH se designaron como: N37, N47 y N57. Cabe señalar que de estas tres condiciones, N47 es la condición nativa y por último, como la escala de pH es logarítmica, un cambio de pH de 5.7 a 3.7, representa un cambio de dos órdenes de magnitud en la concentración de protones (H⁺).

4.2 CRIOPROTECCIÓN Y ADICIÓN DE RADIOPROTECTORES

Previo a la difracción, los cristales obtenidos se remojaron durante un minuto en soluciones crioprotectoras, es decir, en su respectiva solución precipitante con la diferencia de que se reemplazó agua por 30% volumen sobre volumen de glicerol.

En el caso de la adición de radioprotectores, cada cristal se remojó nuevamente en su respectiva solución precipitante, pero sustituyendo esta vez agua por la concentración específica de cada posible radioprotector (tabla 4.1). Para cotejar resultados con el estudio de De la Mora [31], se realizó el procedimiento anterior con nitrato de sodio y ácido ascórbico (tabla 4.1).

Código	Tiempo de remojo [s]	Concentración [mM]
ASC	120	500
CIC	120	10
NIT	90	500
SUL	90	100
TAN	90	2

Tabla 4.1: Se muestra el tiempo de remojo y la concentración de radioprotector en cada solución radioprotectora.

Como se nota en la tabla anterior, nuevamente por simplicidad se usó el siguiente código para denominar los cristales remojados en cada radioprotector: ASC, CIC, NIT, SUL y TAN; que corresponden a ácido ascórbico, ciclofano binuclear de cobre, nitrato de sodio, sulfato de cobre y el *cluster* de tantalio, respectivamente.

4.3 DIFRACCIÓN DE CRISTALES

Se realizaron ocho series de experimentos de difracción con la ayuda, en algunas de las colectas de datos, de la Dra. Vivian Stojanoff y el entonces investigador en estancia postdoctoral Ulises Salazar Kuri. Las colectas de datos se llevaron a cabo en la línea X6a del NSLS (del inglés *National Synchrotron Light Source*) en Estados Unidos de América. Cabe señalar que este sincrotrón era de segunda generación y cerró oficialmente el 30 de septiembre de 2014, después de operar por 32 años.

El experimento de difracción consistió en irradiar el cristal por dos segundos, obtener el patrón de difracción y rotar el cristal un grado ($\Delta\varphi = 1$). Si se repite este proceso cien veces, digamos de $\varphi = 1$ hasta $\varphi = 100$, se obtiene un conjunto de datos conformado por cien patrones de difracción. Después de obtener una colecta de datos, se regresó el cristal a su orientación inicial ($\varphi = 1$) y se realizó una sobreexposición a los rayos X, vulgarmente denominada como “quemada”. Esto se hace con el único fin de exagerar el daño por radiación. A comparación de los parámetros para la colecta, en la quemada el cristal se irradia por un minuto

y se rota diez grados. Los patrones de difracción de las quemadas se descartan¹. Una ronda consiste de una colecta de datos seguida de una quemada. En general se intentaron realizar entre treinta o treinta y cinco rondas, dependiendo del tiempo disponible en la línea. Suponiendo treinta rondas, se tiene un tiempo total de exposición para cada cristal de 400 minutos². Cerca de 2.3 días en total. El haz de rayos X tenía una dimensión de 200x200 μm , una longitud de onda de 0.939 Å y un perfil tipo gaussiano con una anchura a la altura media del pico de 250 y 50 μm vertical y horizontalmente, respectivamente. Debido al área del haz de rayos X, los cristales se eligieron de un tamaño aproximado de 200x200x100 μm , con el fin de asegurar una dosis de radiación uniforme sobre el cristal.

No fue posible repetir los experimentos para llevar a cabo un análisis estadístico, en parte por el uso restringido del sincrotrón y en parte porque, como ya se mencionó, el sincrotrón estaba a pocos meses de cerrar. A pesar de esto, se logró obtener un tiempo de colecta útil para esta tesis.

4.4 PROCESAMIENTO DE DATOS

Una vez obtenidos los patrones de difracción, los siguientes pasos se realizan *in silico*. La imagen de la figura 1.1, es un típico patrón de difracción obtenido.

Los datos fueron indexados, integrados y escalados con `XDS v. 20180126` [58]. Por simplicidad, el corte de resolución correspondió al círculo más grande que podía estar completamente inscrito en el detector usado.

4.5 AFINAMIENTO DE ESTRUCTURAS

El modelo estructural `3A8Z` de la `BDP` (figura 1.4) se utilizó para comenzar el afinamiento de las estructuras de cada una de las ocho condiciones experimentales. Este modelo se escogió porque se obtuvo a partir de cristales de lisozima crecidos en condiciones experimentales similares a las de esta tesis y por lo tanto se espera que el grupo espacial sea el mismo y la celda unitaria sea isomorfa, permitiendo así la obtención de las fases por medio de una sustitución molecular, la forma más simple de un reemplazo molecular. Las estructuras se afinaron con `phenix.refine v. 1.13-2998` y el servidor `web PDB-REDO` que a su vez utiliza el programa `REFMAC5 v. 5.8.0216` para los afinamientos [59-61]. Entre afinamientos se fue completando el modelo estructural con `Coot v. 0.8.9` [62]. La estructura inicial fue afinada con las restricciones geométricas que se utilizan por defecto para los puentes disulfuro. Para obtener las estructuras subsecuentes se reafinó el modelo inicial, con la diferencia de que las restricciones geométricas se disminuyeron y se afinaron las cisteínas de manera independiente. Esto se hizo con el fin de obtener las coordenadas precisas de los átomos S_γ , involucrados en los puentes disulfuro.

¹ La sobreexposición satura el detector usado.

² Para poner esto en perspectiva, dependiendo del tamaño, calidad y simetría del cristal, así como del tipo de sincrotrón usado, se requiere alrededor de 90 s a 360 s de exposición para obtener un conjunto de datos completo de un cristal de lisozima.

4.6 DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA

Con el fin de estimar la [DRA](#) se usó el programa [RADD0SE-3D v. 2.1.0](#) [63]. En general se midió el flujo de la línea cada cinco rondas utilizando un fotodiodo de silicio con un espesor de 0.3 mm y un tamaño de 300 x 300 μm . Debido a que el sincrotrón era de segunda generación, el flujo de fotones decaía con el tiempo y por lo tanto en cada ronda la [DRA](#) era menor (ver apéndice [A](#)). Esto dificultó en parte el cálculo de la dosis.

4.7 ANÁLISIS DEL DAÑO POR RADIACIÓN

Se usó el programa [phenix.merging_statistics v. 1.13-2998](#) para calcular las métricas relacionadas con la calidad de los datos obtenidos. Por cada conjunto de datos se analizó la intensidad promedio, el volumen de celda unitaria y el factor R_{meas} [64]. Por otra parte se investigó el efecto sobre los puentes disulfuro, a la misma [DRA](#), con mapas de diferencia de densidad electrónica.

RESULTADOS

5.1 CRISTALIZACIÓN

Los resultados de los experimentos de cristalización se muestran en la figura 5.1.

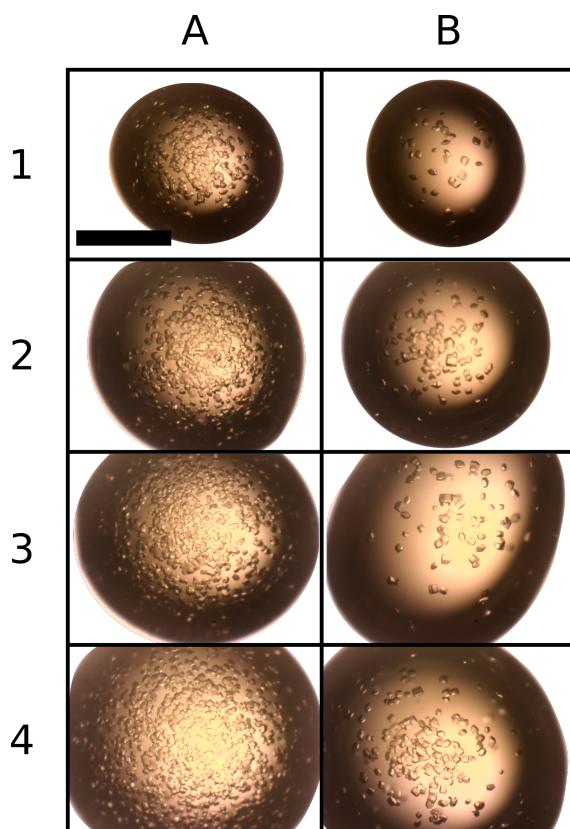


Figura 5.1: Cristales de lisozima, obtenidos a 50 (columna A) y 25 mg mL⁻¹ (columna B). El volumen final de la gota colgante es de 2, 4, 6 y 8 μL, en las filas 1, 2, 3 y 4, respectivamente. La barra negra en 1A mide 1 mm y todas las imágenes tienen el mismo nivel de aumento. La condición usada fue 2B.

No se obtuvieron cristales con el protocolo descrito en la sección 4.1 modificado para un pH de 5.7. Debido a esto, uno de los cristales crecidos de manera normal, es decir, con un pH igual a 4.7, se remojó por dos días previo a su difracción en la solución precipitante con un pH de 5.7. No se midió el pH en este cristal.

5.2 PROCESAMIENTO DE DATOS

Debido a que de aquí en adelante se incluyen varias métricas cristalográficas, se realizó un apéndice donde se explican brevemente estas métricas (apéndice B). Todos los cristales se obtuvieron en el grupo espacial $P4_32_12$. Los resultados del procesamiento de datos para las ocho estructuras iniciales se muestran a continuación.

	ASC	CIC	N37	N47
Intervalo de resolución (Å)	34.9-1.6 [1.65-1.6]	39.03-1.65 [1.70-1.65]	26.93-1.6 [1.65-1.6]	30.7-1.65 [1.70-1.65]
Parámetros de celda a, c (Å)	78.05, 37.11	78.07, 36.95	78.70, 36.94	77.83, 36.99
Puntos totales	122489 (11815)	109082 (10537)	123384 (11976)	108560 (10550)
Puntos únicos	15073 (1488)	14044 (1384)	14440 (1452)	14184 (1380)
Multiplicidad (%)	8.1 (7.9)	7.8 (7.6)	8.5 (8.2)	7.7 (7.6)
Integridad (%)	96.34 (98.54)	98.43 (99.28)	91.10 (94.47)	99.89 (100.00)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	44.68 (13.59)	38.98 (12.29)	25.94 (16.12)	31.04 (7.06)
B_{Wilson} (Å ²)	14.62	15.55	12.37	17.64
R_{mrg} (%)	2.86 (14.04)	3.13 (13.98)	6.38 (10.33)	4.00 (25.06)
R_{meas} (%)	3.05 (15.04)	3.36 (15.09)	6.83 (11.07)	4.29 (26.92)
R_{pim}	1.03 (5.21)	1.18 (5.46)	2.33 (3.84)	1.55 (9.71)
$CC_{1/2}$	1 (0.989)	1 (0.989)	0.996 (0.989)	1 (0.975)
CC^*	1 (0.997)	1 (0.997)	0.999 (0.997)	1 (0.994)
	N57	NIT	SUL	TAN
Intervalo de resolución (Å)	30.82-1.6 [1.65-1.6]	34.05-1.6 [1.65-1.6]	27.84-1.65 [1.70-1.65]	39.44-1.65 [1.70-1.65]
Parámetros de celda a, c (Å)	78.77, 37.00	77.86, 37.86	78.74, 36.88	78.88, 36.95
Puntos totales	112155 (12071)	123874 (12096)	111906 (10648)	113123 (10813)
Puntos únicos	14277 (1550)	15826 (1551)	14096 (1384)	14533 (1423)
Multiplicidad	7.9 (7.8)	7.8 (7.8)	7.9 (7.7)	7.8 (7.6)
Integridad (%)	89.73 (99.87)	99.57 (99.87)	97.38 (98.23)	99.84 (100.00)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	28.44 (6.37)	35.67 (19.50)	49.84 (19.05)	62.73 (29.54)
B_{Wilson} (Å ²)	15.24	11.88	12.85	10.20
R_{mrg} (%)	4.48 (31.17)	4.05 (8.66)	2.68 (9.65)	2.32 (6.56)
R_{meas} (%)	4.81 (33.41)	4.35 (9.29)	2.87 (10.34)	2.48 (7.03)
R_{pim}	1.69 (11.71)	1.54 (3.30)	0.98 (3.60)	0.88 (2.50)
$CC_{1/2}$	0.999 (0.963)	0.999 (0.996)	1 (0.995)	1 (0.998)
CC^*	1 (0.991)	1 (0.999)	1 (0.999)	1 (1)

Tabla 5.1: Procesamiento de datos. Los valores entre paréntesis corresponden a los valores en la última faja de resolución, especificada entre corchetes. Debido al grupo espacial, únicamente los parámetros de la celda unitaria mostrados son a y c .

El total de rondas para ASC, CIC, N37, N47, N57, NIT, SUL y TAN fue de 35, 29, 30, 17, 30, 35, 30, 35, respectivamente¹. N47 presenta 17 conjuntos de datos y esto fue por un malfuncionamiento del sincrotrón. El 27° conjunto de datos de CIC no se grabó. N57 presentó anillos de hielo en las fajas de resolución: 3.7–3.64, 2.28–2.22 y 1.94–1.88 Å y por lo tanto se procesó excluyendo dichas fajas.

¹ Debido a la cantidad de datos, se realizó un *script* para automatizar el proceso (apéndice C).

5.3 MODELOS ESTRUCTURALES

Los modelos estructurales obtenidos son bastante similares entre sí (figura 5.2 [A]). Las diferencias se observan en las zonas más desordenadas de la proteína (figura 5.2 [B]).

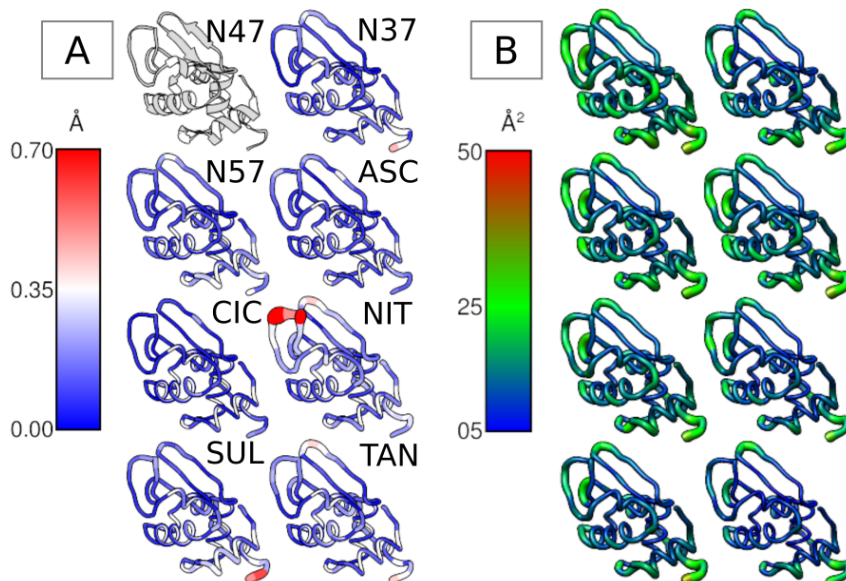


Figura 5.2: Modelos cristalográficos iniciales. En [A] se muestran los modelos coloreados por la raíz de la desviación cuadrática media, definida como $(1/n \sum_{i=1}^n (x_i - x_i^{\text{ref}}))^2)^{1/2}$ donde x_i y x_i^{ref} es la posición del i -ésimo $C\alpha$ en la estructura a comparar y la de referencia (N47) y n es el número de residuos de aminoácido en la proteína (129). En [B] se muestran los mismos modelos pero ahora coloreados por su parámetro de desplazamiento atómico, el factor B isotrópico. Las etiquetas en [B] son las mismas que en [A]. Figura creada con [Chimera v. 1.13.1](#).

Para estimar la calidad de manera global de los modelos estructurales obtenidos se obtuvo el ajuste entre el modelo y los datos experimentales observados (los patrones de difracción). Este ajuste se muestra en la tabla 5.2.

	ASC	CIC	N37	N47
R_{work} (%)	15.20 (17.89)	15.35 (16.87)	14.80 (15.05)	16.45 (23.31)
R_{free} (%)	17.73 (21.21)	17.79 (20.81)	17.76 (20.39)	20.68 (32.25)
	N57	NIT	SUL	TAN
R_{work} (%)	16.18 (18.44)	15.00 (15.41)	14.76 (15.53)	14.28 (14.40)
R_{free} (%)	18.17 (21.53)	18.14 (17.36)	17.04 (20.57)	17.16 (19.26)

Tabla 5.2: Calidad global de los modelos iniciales. Se muestran las métricas que determinan la calidad, global, del modelo atómico obtenido. Los valores entre paréntesis corresponden a los valores en la última capa de resolución, definida en la tabla anterior.

5.4 DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA

Debido a que los experimentos se realizaron en un sincrotrón de segunda generación, se determinó la **DRA** para cada cristal y con cada valor de flujo medido. Después se graficó la **DRA** contra la corriente en el anillo de almacenamiento y a esta gráfica se le realizó un ajuste lineal o cuadrático, dependiendo del ajuste obtenido (figura 5.3). La ecuación del ajuste se usó para determinar la **DRA** por el cristal en cada conjunto de datos. De esta forma es posible comparar las estructuras y su densidad electrónica, a un nivel aproximado de **DRA**.

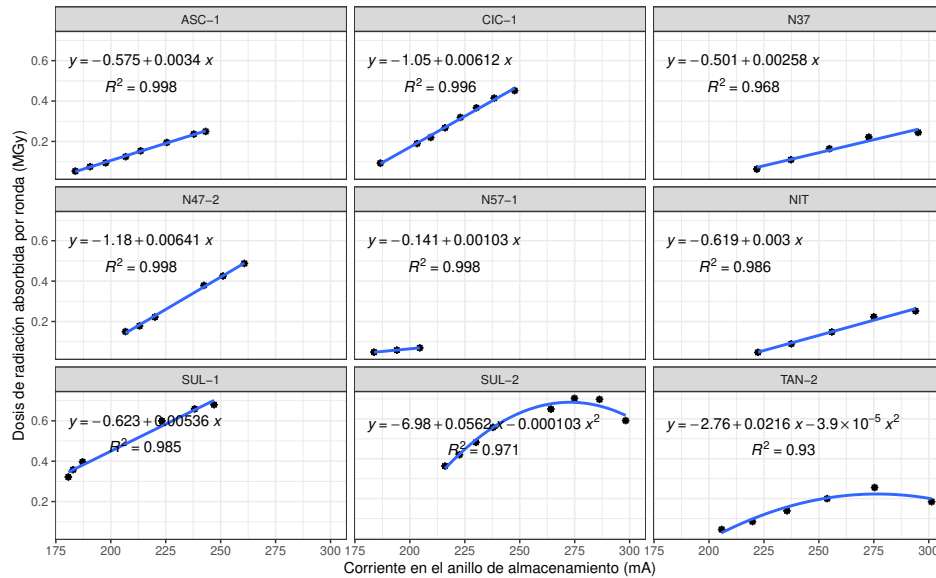


Figura 5.3: Gráficas de la **DRA** por ronda contra la corriente en el anillo de almacenamiento. El número después del guión en cada código corresponde a la n -ésima inyección. Por ejemplo, SUL-2 corresponde a la **DRA** en el cristal con sulfato de cobre durante una segunda inyección. El ajuste depende, principalmente, del tiempo transcurrido después de cada inyección. Si el flujo de fotones se medía minutos después de una inyección (corriente alta), el ajuste es cuadrático (SUL-2 y TAN-2); si la medición se realizaba horas después de la inyección, el ajuste es lineal (ASC-1, CIC-1, N47-2, N57-1, SUL-1). En el caso de N37 y NIT no hubo inyecciones durante la colecta de datos, los datos de flujo se tomaron cada cinco rondas y por eso el ajuste es lineal. Véase el apéndice A y D para más detalles.

Como el sincrotrón se encontraba en sus últimos días de funcionamiento, ciertos problemas técnicos dificultaron determinar la **DRA**. Por ejemplo, durante la colecta de datos de N57 se cayó el haz de rayos X tres veces, por lo que se tienen cuatro inyecciones. El flujo se midió tres veces en la primera inyección (N57-1); una vez en la segunda y la cuarta inyección; y ni una vez en la tercera inyección. En TAN-1 se midió el flujo dos veces. En N47-1 no se tiene ningún dato de flujo. Debido a esto la **DRA** correspondiente a N47 en la primer inyección, se estimó a partir de los datos de la segunda inyección (N47-2). Como consecuencia se tiene una incertidumbre en la **DRA** en todas las estructuras de N47 y a partir de la décima estructura de N57.

5.5 ANÁLISIS DEL DAÑO POR RADIACIÓN

La intensidad promedio y el R_{meas} se muestran a continuación.

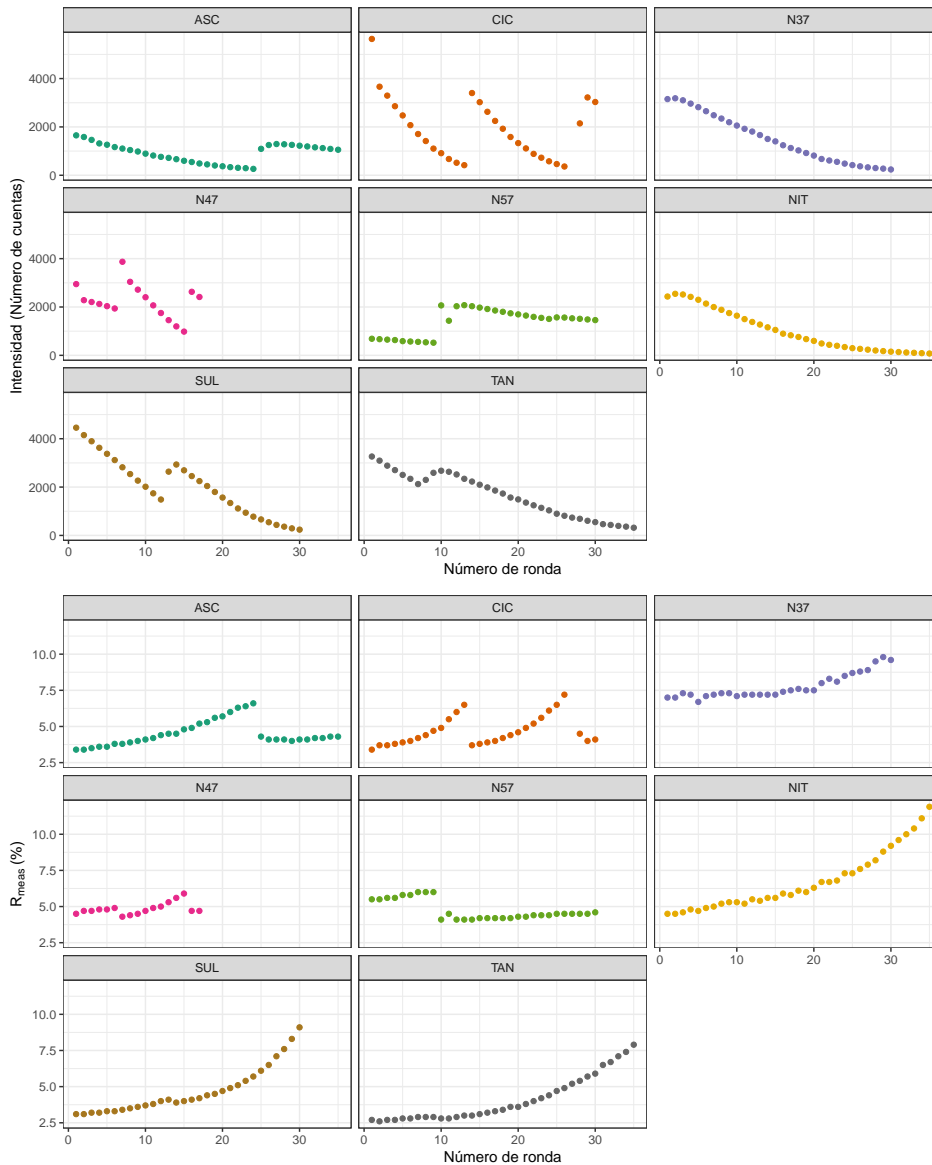


Figura 5.4: Intensidad promedio (superior) y el R_{meas} (inferior) por número de ronda.

La discontinuidad en las gráficas denota una nueva inyección de electrones al anillo de almacenamiento, lo que implica un mayor brillo. En algunos cristales se nota claramente como el R_{meas} varía inversamente a la intensidad promedio (ASC, CIC, N47 y N57). En otros cristales esta variación es apenas perceptible (SUL y TAN). En N37 y NIT no se tuvo ninguna inyección, por lo que los valores de R_{meas} incrementan conforme aumentan las rondas. Esto implica que la intensidad promedio depende del flujo de fotones y el R_{meas} de la intensidad promedio. Otros factores, como el estado del sincrotrón y la calidad del cristal, pueden contribuir a esta última dependencia.

La intensidad promedio y el cambio en el volumen de la celda unitaria se muestran enseguida.

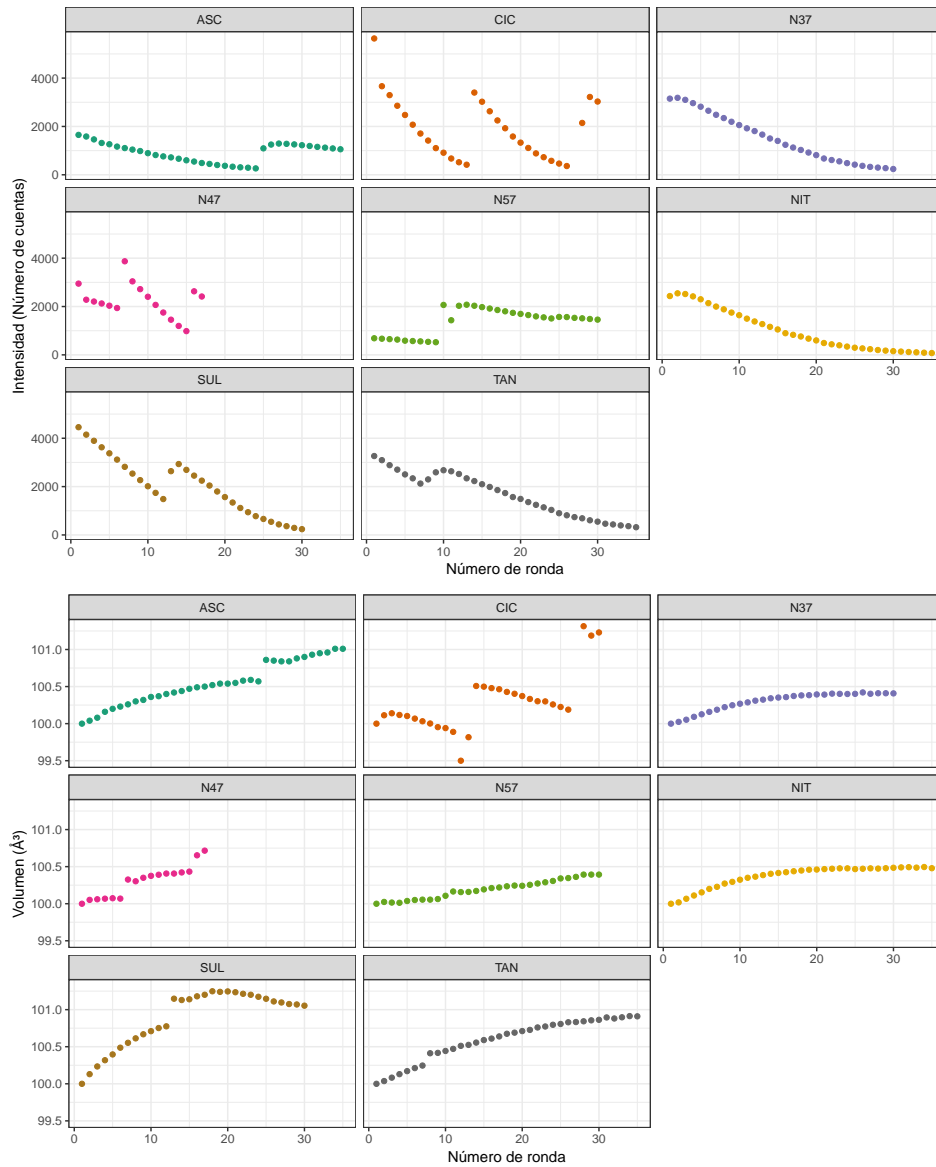


Figura 5.5: Intensidad promedio (superior) y el cambio en el volumen de la celda unitaria (inferior) por número de ronda. Se repite la gráfica de la intensidad promedio para señalar la dependencia del volumen con respecto a la intensidad promedio. El volumen inicial de la celda unitaria se toma como el 100 %. En la mayor parte de los casos el comportamiento es un incremento progresivo de la celda unitaria, pero no siempre es el caso (CIC). Es claro que los saltos de volumen corresponden a nuevas inyecciones de electrones. Se ha sugerido que el aumento de volumen se debe a una acumulación de hidrógeno molecular dentro del cristal macromolecular [57].

5.6 DIFERENCIA DE DENSIDAD ELECTRÓNICA

Las figuras 5.6-5.9 presentan la diferencia de densidad electrónica sobre los puentes disulfuro de los cristales difractados a una DRA aproximada de 3 MGy.

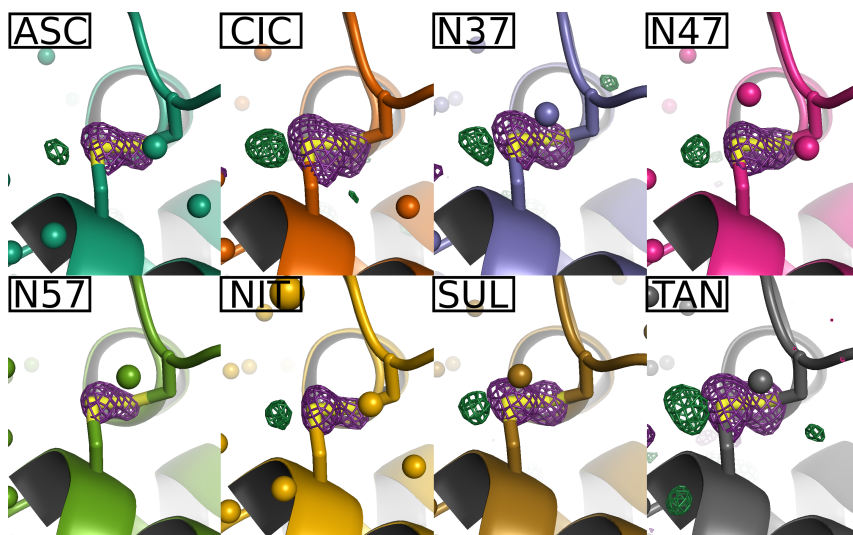


Figura 5.6: Diferencia de densidad sobre el puente disulfuro C_6-C_{127} . La malla de diferencia de densidad electrónica se dibuja a -3.5σ (magenta) y $+3.5\sigma$ (cian). Imagen creada con PyMOL v. 2.2.

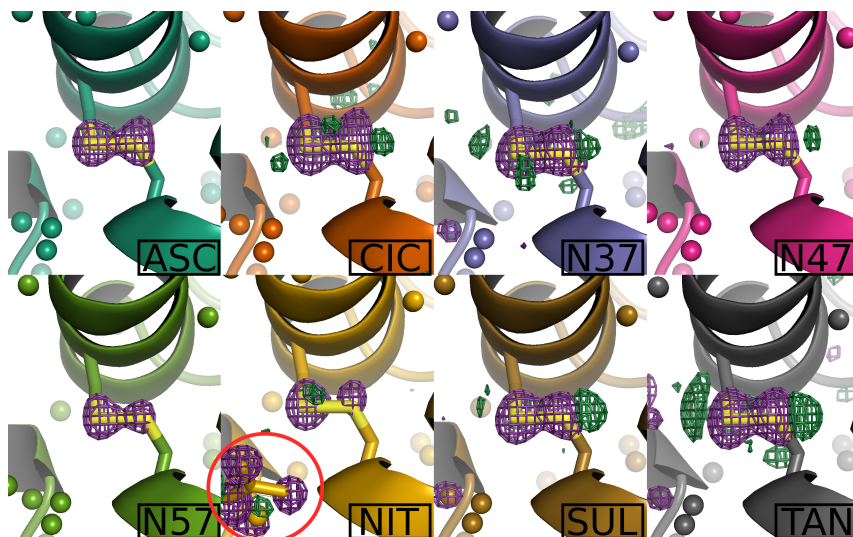


Figura 5.7: Diferencia de densidad sobre el puente disulfuro $C_{30}-C_{115}$. La malla de diferencia de densidad electrónica se dibuja a -3.5σ (magenta) y $+3.5\sigma$ (cian). Con un círculo rojo se marca una de las moléculas de nitrato presente en el cristal NIT. Imagen creada con PyMOL v. 2.2.

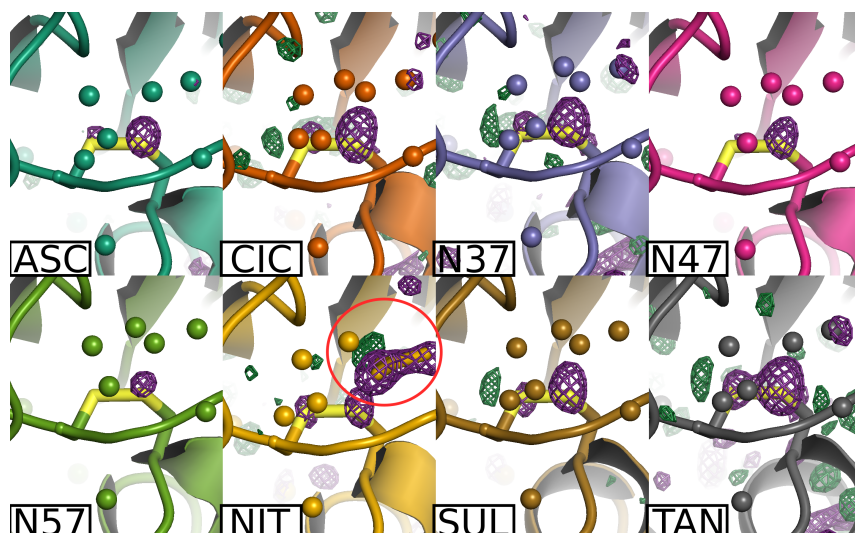


Figura 5.8: Diferencia de densidad sobre el puente disulfuro $C_{64}-C_{80}$. La malla de diferencia de densidad electrónica se dibuja a -3.5σ (magenta) y $+3.5\sigma$ (cian). Con un círculo rojo se marca una de las moléculas de nitrato presente en el cristal NIT. Imagen creada con PyMOL v. 2.2.

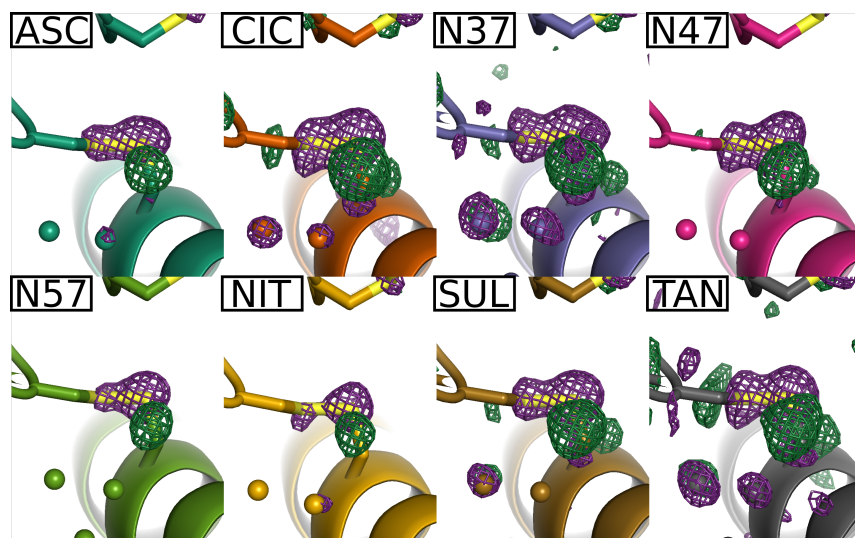


Figura 5.9: Diferencia de densidad sobre el puente disulfuro $C_{76}-C_{94}$. La malla de diferencia de densidad electrónica se dibuja a -3.5σ (magenta) y $+3.5\sigma$ (cian). Imagen creada con PyMOL v. 2.2.

En las imágenes previas se notan cuatro características: (i) el enlace disulfuro más estable es el $C_{64}-C_{80}$; (ii) el más lábil es el puente $C_{76}-C_{94}$; (iii) solo se nota una ligera diferencia de densidad electrónica sobre los átomos S_{γ} en N57 y NIT; y (iv) en la vecindad de dos de los cuatro puentes disulfuro, $C_{30}-C_{115}$ y $C_{64}-C_{80}$, se nota una molécula de nitrato afectada por el daño por radiación.

El daño específico sobre los puentes disulfuro se puede cuantificar y dicho resultado se demuestra en la siguiente gráfica.

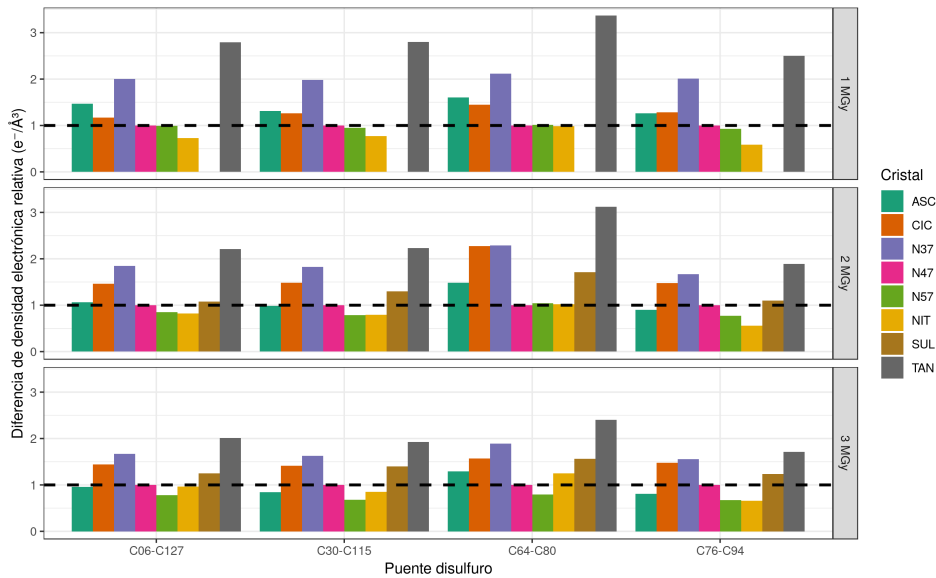


Figura 5.10: Se grafica la diferencia negativa de densidad electrónica por puente disulfuro a tres diferentes DRA: 1, 2 y 3 MGy. La diferencia mostrada es el promedio de ambos azúfres involucrados en la formación del respectivo puente disulfuro. Los datos están normalizados con respecto a N47, es decir, el valor promedio en cada disulfuro de N47 se escaló a uno (barras rosas). La diferencia por lo tanto es relativa a la diferencia de densidad electrónica que poseen los puentes disulfuro en la estructura de N47. Esto significa que valores debajo [arriba] de la línea horizontal punteada, presentan puentes disulfuro que en promedio son menos [más] susceptibles al daño por radiación, a comparación de N47. Debido a que el cristal denominado SUL contiene átomos de cobre, su coeficiente de absorción (μ) es mucho mayor que el del resto de los otros cristales, a causa de esto no se consiguió una estructura con una DRA cercana a 1 MGy, por ende este dato no se tiene disponible para la primer gráfica (ausencia de la barra café en la gráfica superior).

En la gráfica anterior se nota que los cristales TAN, CIC, N37 y SUL en promedio muestran un mayor daño sobre los puentes disulfuro, a comparación de N47. El patrón que muestran NIT, N57 y ASC es más complejo. En las tres DRA, NIT presenta menor daño sobre sus puentes disulfuro a comparación de N47, excepto por el puente C₆₄-C₈₀ a una DRA de 3 MGy. Al comparar NIT contra N57: a una DRA de 1 MGy, NIT presenta menor daño por radiación en todos sus puentes salvo por el disulfuro C₆₄-C₈₀; a una DRA de 2 MGy, el daño sobre los disulfuros es semejante en ambas estructuras, excepto por el puente C₇₆-C₉₄ que se encuentra menos dañado en NIT que en N57; a una DRA de 3 MGy, se revela ahora que el daño por radiación es menor en todos los puentes de N57. Por su parte, ASC a una DRA de 1 MGy se podría incluir en el grupo de los cristales que en promedio tienen mayor daño sobre los puentes disulfuro. Sin embargo, a una DRA de 3 MGy el comportamiento que presenta es parecido al de NIT.

DISCUSIÓN

6.1 COMPARACIÓN CON ESTUDIO PREVIOS

En varios estudios de daño por radiación en cristales macromoleculares se ha analizado, con mayor o menor detalle, la susceptibilidad de los puentes disulfuro de la lisozima. En la mayoría de estos trabajos los resultados están basados en mapas de diferencia de densidad electrónica entre conjuntos de datos a diferentes *DRA*, cuando este no sea el caso se mencionará en el texto. En 1999 Weik *et al.* colectaron tres conjuntos de datos de un cristal de lisozima y realizaron una quemada entre el segundo y el tercer conjunto de datos [9]. En ese estudio la *DRA* calculada por conjunto de datos y quemada fue de 10^5 y 10^7 Gy, respectivamente. Se propuso el puente C_6-C_{127} como el más susceptible al daño por radiación. Al cabo de unos años, en el 2006, Kaufmann *et al.* colectaron cinco conjuntos de datos por cristal de lisozima, entre otras proteínas, con y sin radioprotectores. Con respecto a la lisozima, observaron que el daño sobre los puentes disulfuro podía ser reducido parcialmente por los radioprotectores usados, excepto para el disulfuro $C_{76}-C_{94}$, por lo que se sugirió que este era el disulfuro más susceptible [29]. La *DRA* total fue de 4.5 MGy por cristal. En el 2011, Kmetko *et al.* colectaron varios conjuntos de datos mínimos, es decir, con una rotación total de cinco grados por conjunto de datos, de cristales de lisozima con y sin nitrato de sodio [65]. Las colectas se realizaron a -173 °C y a temperatura ambiente. A -173 °C y una *DRA* de 1.9 MGy, se determinó que los puentes $C_{76}-C_{94}$ y C_6-C_{127} eran los que sufrían mayor daño. A temperatura ambiente y una *DRA* de 0.12 MGy, el puente C_6-C_{127} fue el más dañado. Según su métrica, específica de su estrategia de colecta datos, el puente C_6-C_{127} mostró dos veces menos daño en cristales con nitrato de sodio que en cristales sin esta sal. Este efecto protector solo se notó en los cristales difractados a temperatura ambiente y no a -173 °C. Según sus conclusiones es más factible eliminar moléculas de la condición de cristalización que en última instancia pudieran aumentar el daño por radiación, que buscar moléculas radioprotectoras. También en el 2011, De la Mora *et al.* colectaron entre cinco y seis conjuntos de datos por cristal con un intervalo de *DRA* desde 0.8 MGy hasta 28.2 MGy [31]. En contraste con el estudio anterior se tiene una protección hasta cinco veces mayor sobre los puentes disulfuro en cristales de lisozima con nitrato de sodio que en el cristal nativo (figura 6.1). Una probable causa de esta diferencia, es que la concentración de nitrato de sodio usada en los cristales de De la Mora *et al.* fue cinco veces mayor, en comparación con la concentración usada en el estudio de Kmetko *et al.* En el 2013 Sutton *et al.* colectaron quince conjuntos de datos y según sus resultados los puentes disulfuro más dañados son el C_6-C_{127} y el $C_{30}-C_{115}$ (figura 6.2) [33]. En comparación con todos los trabajos anteriores, en esta tesis de maestría se tienen ocho series de colectas con un total de 24100 patrones de difracción; dos o tres órdenes de magnitud más datos que los estudios previos.

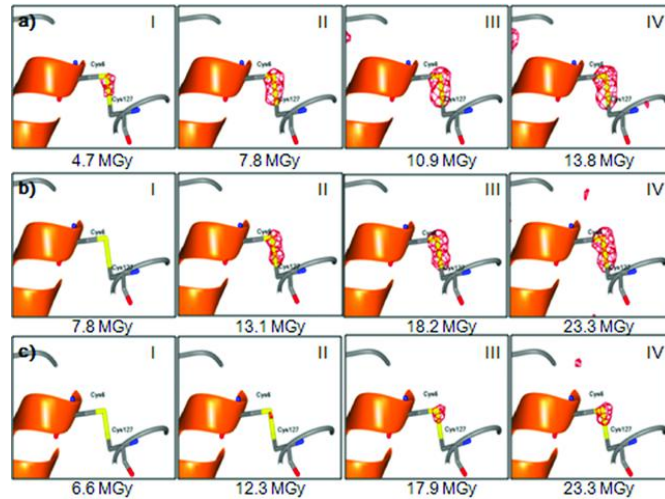


Figura 6.1: Se reproduce la figura cinco del estudio de De la Mora *et al* [31]. Los paneles corresponden a mapas de diferencia electrónica entre conjuntos de datos a una DRA cada vez mayor. Se muestran los mapas que corresponden al cristal nativo (a), el cristal con ácido ascórbico (b) y el cristal con nitrato de sodio (c). La diferencia de densidad electrónica se representa con una malla roja y se encuentra a un valor de -0.25 electrones/ Å^3 .

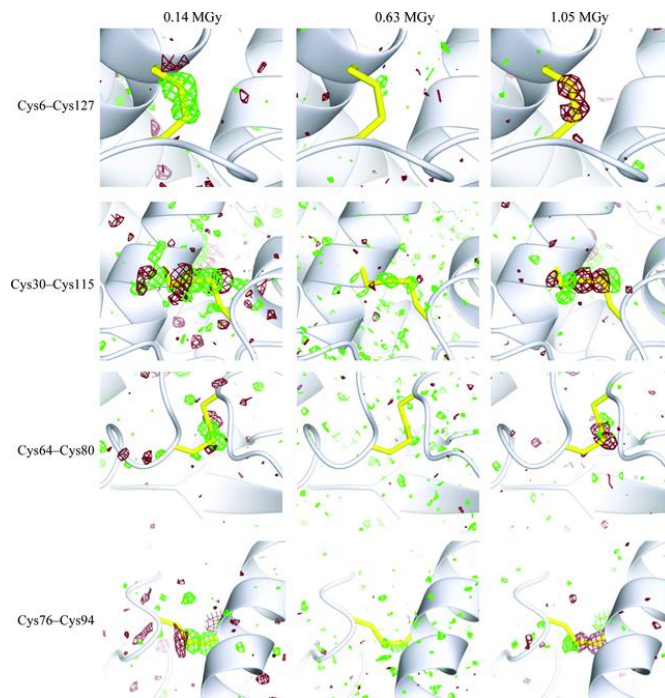


Figura 6.2: Se reproduce la figura seis del estudio de Sutton *et al* [33]. Los paneles corresponden a mapas de diferencia electrónica entre conjuntos de datos a una DRA cada vez mayor. La diferencia de densidad electrónica se muestra con una malla roja a -3σ y una malla verde a $+3\sigma$.

En el caso de esta tesis el orden de susceptibilidad fue: $C_{64}-C_{80} < C_6-C_{127} < C_{30}-C_{115} < C_{76}-C_{94}$. Este resultado es el promedio de la densidad electrónica negativa sobre cada $S\gamma$ de cada puente disulfuro. Cabe señalar que este orden se mantiene en la mayoría de los cristales desde una DRA de 1 MGy a 3 MGy. Solo en el caso de NIT ocurre algo diferente. NIT presenta un par de moléculas de nitrato cercanas a los puentes $C_{30}-C_{115}$ y $C_{64}-C_{80}$ (figuras 5.7 y 5.8). El orden de susceptibilidad en NIT, a 1 MGy, es el siguiente: $C_{64}-C_{80} < C_6-C_{127} < C_{76}-C_{94} < C_{30}-C_{115}$. En otras palabras, la susceptibilidad de los dos puentes disulfuro más dañados en los otros cristales se invierte en NIT. Después de 2 MGy los dos disulfuros más susceptibles presentan un nivel de daño semejante: $C_{64}-C_{80} < C_6-C_{127} < C_{76}-C_{94} \approx C_{30}-C_{115}$. La hipótesis de que el nitrato tuviera algún efecto sobre este cambio, se descarta al notar que en NIT no se tiene ningún nitrato cercano al disulfuro $C_{76}-C_{94}$.

Aunado a esto, en el estudio de De la Mora *et al.* se sugirió que la molécula de nitrato cercana al puente C_6-C_{127} , era la responsable de su protección. Este resultado está basado en que la desaparición de la densidad electrónica se da primero en el nitrato y después sobre el puente disulfuro (figura 6.3). Al realizar el análisis de los mapas de diferencia de densidad electrónica entre los conjuntos de datos que De la Mora *et al.* depositaron en la BDP, se observa una falta de correlación con respecto a la protección del puente disulfuro y la cercanía de la molécula de nitrato (figura 6.4). Este análisis y los resultados del párrafo anterior incitan a cuestionar dicho “efecto protector”, por lo menos a un nivel local.

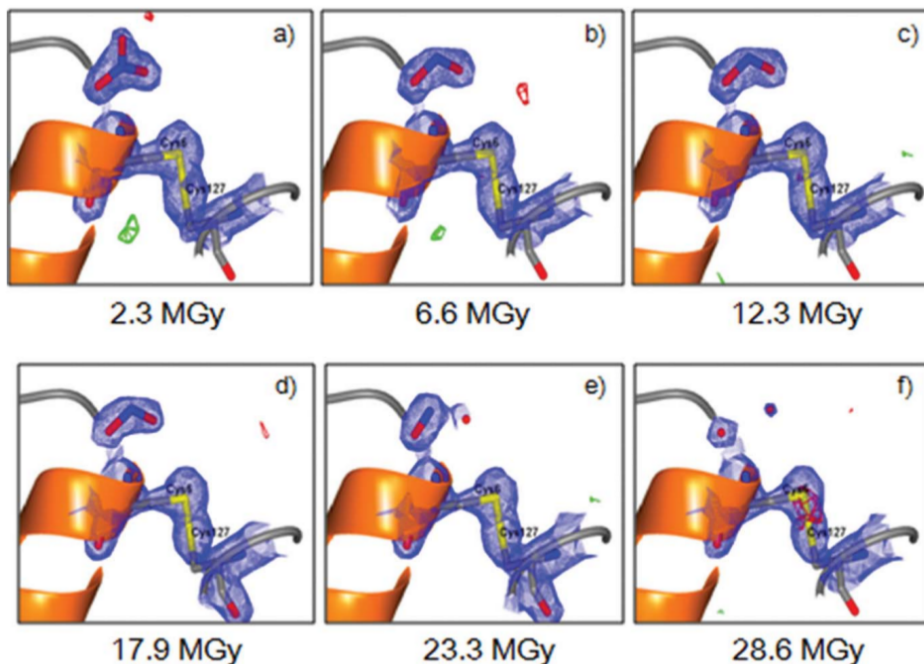


Figura 6.3: Se reproduce la figura ocho del estudio de De la Mora *et al.* [31]. Con esta figura, los autores pretenden demostrar que antes de la reducción del enlace disulfuro, C_6-C_{127} , se da la reducción del nitrato en su vecindad. Los paneles (a-f) corresponden a una DRA cada vez mayor. El mapa $2F_o - F_c$ se encuentra dibujado a 1σ (azul) y el mapa $F_o - F_c$ se muestra a $\sigma = \pm 3.0$ (verde y rojo, respectivamente).

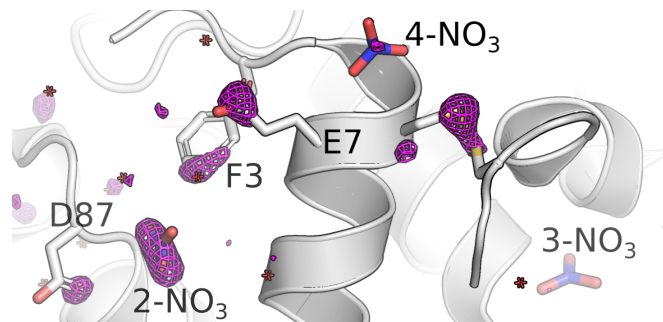


Figura 6.4: Se presenta la diferencia de densidad electrónica entre conjuntos de datos a una DRA de 28.6 MGy sobre la estructura 2YBH de De la Mora *et al* [31]. Para comparar esta imagen con la de la figura anterior, se intentó obtener la misma orientación espacial. El nitrato que se encuentra más cercano al puente disulfuro C_6-C_{127} , se encuentra menos dañado que el propio disulfuro. La malla de diferencia de densidad electrónica se dibuja a -3.5σ (magenta) y $+3.5\sigma$ (cian). Imagen creada con PyMOL v. 2.2.

6.2 MÉTRICAS TRADICIONALES

Las métricas para determinar el daño por radiación a nivel global dependen del flujo de fotones y por lo tanto su comparación es difícil. Esto se nota claramente en las gráficas presentadas en las figuras 5.4 y 5.5. Esto implica que es imperativo utilizar un sincrotrón de tercera generación para realizar estudios de daño por radiación; sin embargo, se debe tener en cuenta que el mayor brillo de estas fuentes de rayos X tendrá como consecuencia un mayor daño por radiación.

En cuanto al comportamiento de la intensidad promedio y el R_{meas} con respecto al número de colecta de datos, una explicación posible es que el haz de rayos X, muestrea un mayor número de celdas unitarias cuando el brillo es mayor. Por eso la calidad de los datos, según el R_{meas} , mejora inmediatamente después de una nueva inyección de electrones al anillo de almacenamiento del sincrotrón usado. Con respecto al cambio en volumen de la celda unitaria, se tiene que señalar que esta fue una de las primeras métricas propuestas para estimar el daño por radiación [66]. Poco después se observó que esta métrica era muy variable, incluso en cristales pertenecientes a la misma gota de cristalización [27]. Esto depende de cada cristal y de sus imperfecciones, pero también del brillo. Una observación a favor de esta dependencia, se da en el estudio de Ravelli *et al.* [22]. Ahí se colectan un par de conjuntos de datos de lisozima con un haz de rayos X atenuado y luego sin atenuar. En sus resultados es notable un “salto” en el aumento del volumen de la celda unitaria y corresponde exactamente a la irradiación del cristal con el haz sin atenuar. En cuanto a su comportamiento, por lo general se nota un aumento del volumen de la celda unitaria; sin embargo, no es raro obtener un decremento (véase [23, 27]). El aumento de la celda unitaria está correlacionado con la acumulación de H_2 dentro del cristal macromolecular [57]. El decremento podría estar dado por daño por radiación específico en los contactos cristalinos o por un número de factores experimentales como la deshidratación del cristal o cambios en su orientación espacial durante la difracción del cristal.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 ESTRATEGIA I

El daño por radiación sobre los puentes disulfuro de la lisozima de clara de huevo de gallina, aumentó al añadir compuestos con metales de transición al cristal macromolecular. Como se mencionó anteriormente, es probable que esto se deba a un incremento en el coeficiente de absorción del cristal [27]. A la longitud de onda de los rayos X utilizados, cualquier elemento dentro del cristal con un número atómico menor que el del azufre, contribuye de manera insignificante a la absorción total de rayos X. La absorción comienza a ser significativa entre mayor sea el número atómico. Es notable que de los ocho cristales difractados, aquellos que presentan un daño por radiación mayor que el cristal nativo (N47) son: TAN, N37, CIC y SUL. La aparición de N37 en el listado anterior no contradice la hipótesis de que el daño por radiación aumenta a causa de una mayor absorción de fotones, pues se usó una cantidad indeterminada de HCl¹ para modificar su pH. Estos resultados permiten concluir que la adición de metales de transición al cristal macromolecular elevan el daño por radiación dentro del mismo.

7.2 ESTRATEGIA II

El daño por radiación sobre los puentes disulfuro de la lisozima de clara de huevo de gallina aumentó o disminuyó al usar un pH relativamente más ácido o básico que el de la condición nativa, respectivamente. Esto va en contra de la hipótesis presentada en este trabajo. La causa de que N37 presente mayor daño por radiación en sus puentes disulfuro se menciona en el párrafo anterior. Con respecto a N57, a 1 MGy, esta condición se compara con N47 y es mejor que usar ácido ascórbico como radioprotector. A 3 MGy la condición N57 muestra menos daño por radiación en sus puentes disulfuro que los cristales con ácido ascórbico o nitrato de sodio. Cabe señalar que N57 demuestra un perfil insuficiente del flujo de fotones durante la colecta de datos; sin embargo, la DRA es en todo caso mayor que la calculada, por lo que N57 es probablemente mejor de lo que parece. El hecho de que N57 sea uno de los cristales con menor daño por radiación fue inesperado. Según las estadísticas cristalográficas N57 posee una mala calidad y esto es probable que sea por la exclusión de las fajas de resolución con anillos de hielo y/o por la variación entre cristales macromoleculares. Esto daría paso a la posibilidad de que no se observó todo el daño por radiación sino solamente una fracción del mismo²; sin embargo, los mapas de diferencia de densidad electrónica de N57 son los que poseen menor ruido, así que la causa no está del todo clara.

1 El cloro tiene un número atómico mayor que el del azufre.

2 Finalmente las estructuras cristalográficas son un promedio espacio-temporal.

7.3 PERSPECTIVAS

Si bien en la sección 5.4 se notó que la DRA de algunos cristales posee cierta incertidumbre, la coherencia del orden de susceptibilidad de los puentes disulfuro en todos los cristales, salvo en NIT, nos permite aceptar nuestros resultados. A opinión del autor, sería interesante realizar experimentos con un intervalo de pH mayor. En este aspecto es muy importante qué proteína elegir como modelo de estudio, pues debería de cristalizar en un amplio intervalo de pH con la calidad suficiente. Incluso si la calidad del cristal es mejor que 1.2 \AA , es posible visualizar la mayor parte de los átomos de hidrógeno y sería entonces posible realizar análisis con mayor detalle.

Además se hace énfasis en que es fundamental realizar experimentos de daño por radiación en sincrotrones de tercera generación. Así la DRA será constante por conjunto de datos colectado y su cálculo será más preciso y práctico.

SINCROTRONES

El sincrotrón es un tipo de acelerador de partículas (figura A.1).

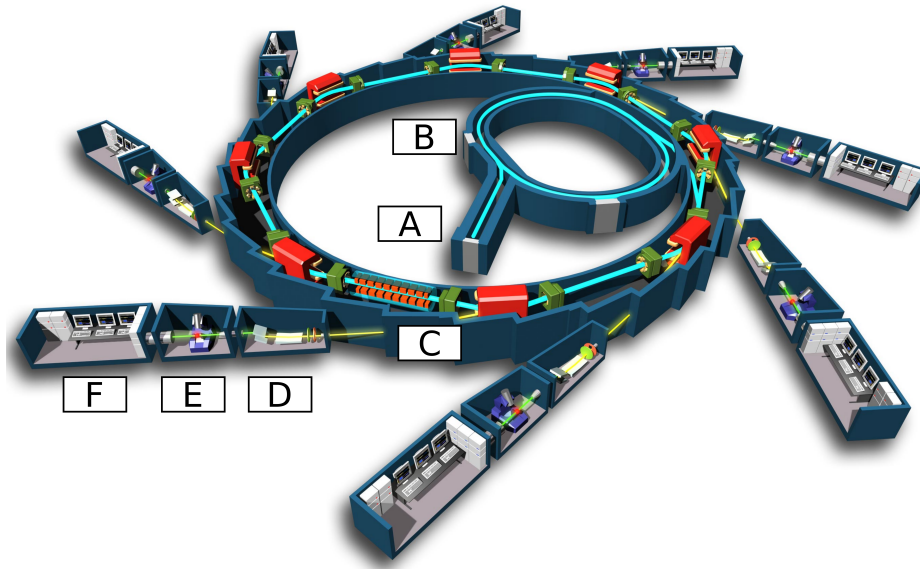


Figura A.1: Esquema de un sincrotrón. Un sincrotrón está compuesto por un acelerador lineal [A], que se utiliza para acelerar electrones; un anillo de propulsión [B], donde los electrones se aceleran todavía más; y un anillo de almacenamiento [C], donde se produce la radiación sincrotrón. La luz emitida se filtra en la cabina óptica [D]; el experimento de difracción se realiza en la cabina experimental [E]; y los patrones de difracción se obtienen en la cabina de control [F]. Imagen modificada de https://commons.wikimedia.org/wiki/Synchrotron_Soleil.

Una de las diferencias más importantes entre un sincrotrón de segunda y uno de tercera generación, es el modo en que se llena el anillo de almacenamiento. Un sincrotrón de tercera generación tiene un modo denominado *top-up*, lo cual significa que se inyectan electrones de manera semicontinua al anillo de almacenamiento. El resultado es entonces un flujo de fotones semiconstante [20]. En el caso del *NLSLS*, debido a la inevitable pérdida de electrones en el anillo de almacenamiento, se inyectaban electrones cada doce horas. Después de cada inyección, el flujo de fotones se estabiliza al cabo de un par de horas y posteriormente disminuye de manera lineal. La relevancia de esto se da precisamente en la estimación de la *DRA*, pues el flujo de fotones es uno de los parámetros necesarios para dicho cálculo. Como el flujo disminuía con el tiempo, la *DRA* también lo hacía. Por lo que fue necesario realizar el cálculo como se establece en la sección correspondiente de los resultados (5.4).

A continuación se presenta un resumen sobre las estadísticas cristalográficas. El lector interesado obtendrá mayor detalle en las siguientes referencias [68-72].

Los puntos de los patrones de difracción se indexan con tres números hkl y la intensidad de los puntos se integra. Esto se hace para todos los patrones de difracción obtenidos, resultando en una larga lista de índices hkl con su respectiva intensidad y su error estándar. Como se pueden dar varias observaciones del mismo punto hkl , ya sea idénticos o relacionados por simetría, se procede a la reducción de los datos al fusionar o combinar estas múltiples observaciones. Dado que la intensidad de los puntos se vuelve más débil conforme incrementa la resolución, las estadísticas del procesamiento de datos se dan en números generales, es decir, para todo el conjunto de datos y para la última faja de resolución.

La métrica cristalográfica más importante es la resolución de los datos, se mide en Å e indica el nivel de detalle que se puede alcanzar a distinguir en los mapas de densidad electrónica y por lo tanto en la construcción del modelo estructural. A grandes rasgos, la resolución se clasifica como: atómica (<1.2 Å), alta (<1.5 Å), media (<2.4 Å) y baja (>3.0 Å). El conjunto de datos puede no estar completo debido, entre otros factores, a la geometría del detector, a daño por radiación excesivo y/o a una alineación desafortunada del cristal durante la colecta de datos. Por ejemplo, si se tiene un conjunto de datos a 1 Å de resolución, pero con una integridad baja, realmente se tiene un conjunto de datos a una resolución menor. La integridad es la métrica cristalográfica que representa la cobertura, normalmente expresada en porcentaje, de todos los puntos únicos teóricamente posibles dentro del conjunto de datos observados. De la reducción de los datos se obtiene la multiplicidad o redundancia (n) y esta métrica es el número total de puntos observados sobre el número total de puntos únicos.

El nivel de la intensidad sobre el ruido, se expresa como un promedio sumado sobre las N observaciones en una faja de resolución:

$$\langle I/\sigma(I) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{hkl} \frac{I_{hkl}}{\sigma(I_{hkl})} \quad (\text{B.1})$$

La relación anterior proporciona un estimado de la utilidad de los datos en función de la resolución.

Por otro lado, en la [CRX](#) se intenta resolver la siguiente ecuación

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{-h}^h \sum_{-k}^k \sum_{-l}^l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})} \quad (\text{B.2})$$

Donde ρ es la densidad electrónica, V es el volumen de la celda unitaria, F es la amplitud del factor de estructura y α es su fase. Esta ecuación se tiene que resolver para cada punto hkl en el patrón de difracción.

Como ya se mencionó, los datos observados en la [CRX](#) son las intensidades de los puntos en el patrón de difracción, es decir I_{hkl} . A partir de las intensidades

se pueden obtener las amplitudes del factor de estructura porque $I_{hkl} \propto F_{hkl}^2$. En realidad esta proporcionalidad no se cumple exactamente debido a un número de factores y para obtener F_{hkl}^2 , se escalan las intensidades. El proceso de escalamiento hace que los intensidades sean consistentes entre sí. El valor B de Wilson, B_{Wilson} , es precisamente el factor de escala que se aplica en este proceso.

Una vez combinadas y escaladas las intensidades, el indicador tradicional para evaluar la calidad de los datos experimentales se obtiene por medio de la siguiente ecuación,

$$R_{\text{mrg}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^n |I_{hkl}^i - \hat{I}_{hkl}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^n I_{hkl}^i} \quad (\text{B.3})$$

que mide la dispersión de las n mediciones independientes de la intensidad de una reflexión, I_{hkl} , alrededor de su promedio, \hat{I}_{hkl} . La calidad de los datos se considera peor entre mayor sea el R_{mrg} . Un valor menor a 5 % o mayor a 10 %, indica un conjunto de datos bueno o subóptimo, respectivamente. En la última capa de resolución el R_{mrg} debe presentar un valor menor a 20 % [68].

Debido a que la intensidad de los puntos de difracción disminuye a mejor resolución, se hace un corte de resolución para descartar aquellas intensidades que supuestamente degradan la calidad del modelo obtenido. Tradicionalmente el corte de resolución se hace cuando el R_{mrg} excede un valor ~ 0.6 y/o antes de que la relación señal:ruido sea menor a 2.

En 1997 Diederichs *et al.* demostraron que el R_{mrg} dependía de la multiplicidad de los datos, por lo que se implementó el

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} (\frac{n}{n-1})^{1/2} \sum_{i=1}^n |I_{hkl}^i - \hat{I}_{hkl}|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^n I_{hkl}^i} \quad (\text{B.4})$$

La ecuación anterior ajusta la contribución de cada punto por un factor de $\sqrt{n/n-1}$, siendo n la multiplicidad [64].

Poco después se implementó el R_{pim} el cual varía en comparación con el R_{mrg} por un factor de $\sqrt{1/n-1}$ y según sus autores, describe la precisión de las intensidades ya promediadas [73].

Poco después se sugirió un coeficiente de correlación de Pearson entre dos conjuntos de datos provenientes de uno solo ($CC_{1/2}$). Esto se implementa al separar de manera aleatoria a la mitad los datos cristalográficos obtenidos [74]. Esta medida aborda directamente la consistencia interna de los datos.

Por otra parte, para medir el ajuste entre el modelo estructural obtenido con los datos observados se hace uso de:

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{hkl}^o - F_{hkl}^c|}{\sum_{hkl} F_{hkl}^o} \quad (\text{B.5})$$

Donde F_{hkl}^o y F_{hkl}^c son las amplitudes del factor de estructura observadas y calculadas, respectivamente. Debido a que en el proceso de afinamiento es posible disminuir el valor R , ya sea de manera intencional o no, se implementó un nuevo R que se calcula de manera idéntica pero con un subconjunto de los datos, de 5 % a 10 %, que nunca entran al ciclo de afinamiento. Este nuevo R se conoce como R_{free} y el primero como R_{work} .



PROCESAMIENTO DE DATOS

```
#!/bin/bash
#
# img2mtz
# Generates from a set of x-ray diffraction images
# the binary mtz file. Useful for doing radiation damage studies.
# Check the repo (https://github.com/murpholinox/img2mtz)
# for a more complete and documented version.
# This one is specific for HEWL, but you can change
# it to whatever protein you are using.
# img2mtz is licensed under the
# GNU General Public License v3.0
cd ~/data
for i in dir1 dir2 dirN
do
cd $i
for j in `ls -l`
do
cd "$j"
generateXDSINP.sh "$j"_001.img.bz2
sed 's/_001.img.bz2/_???.img.bz2/' XDS.INP > a
sed 's/P_NUMBER=0/P_NUMBER=96/' a > b
sed 's/ANTS= 70 80 90 90 90 90/ANTS= 78 78 37 90 90 90/' b > c
sed 's/A_RANGE=/A_RANGE=1 100/' c > d
sed 's/T_RANGE=/T_RANGE=1 100/' d > XDS.INP
rm a b c d ; xds_par
echo "GENERATE_FRACTION_OF_TEST_REFLECTIONS=0.05" > XDSCONV.INP
echo "INPUT_FILE=XDS_ASCII.HKL" >> XDSCONV.INP
echo "OUTPUT_FILE=temp.hkl CCP4_I" >> XDSCONV.INP
echo "FRIEDEL'S_LAW=FALSE" >> XDSCONV.INP
xdsconv
f2mtz HKLOUT temp.mtz<F2MTZ.INP
cad HKLIN1 temp.mtz HKLOUT out.mtz<<EOF
LABIN FILE 1 ALL
DWAWELENGTH FILE 1 1 0.93930
END
EOF
cd ..
done
done
```


AJUSTE DE LA DOSIS DE RADIACIÓN ABSORBIDA

Código	R_x^2	$R_{x^2}^2$	$R_{x^2}^2 - R_x^2$	Ajuste
ASC-1	0.998	0.998	0	lineal
CIC-1	0.996	0.996	0	lineal
N37-0	0.968	0.992	0.024	lineal
N47-2	0.998	0.998	0	lineal
N57-1	0.998	1	0.002	lineal
NIT-0	0.986	0.989	0.003	lineal
SUL-1	0.985	0.998	0.013	lineal
SUL-2	0.721	0.971	0.250	cuadrático
TAN-2	0.678	0.93	0.252	cuadrático

Tabla D.1: Modelo del decaimiento de la DRA según el mejor ajuste obtenido. En la primera columna se tiene el mismo código que en la gráfica 5.3. La columna dos y tres, corresponden al R^2 de un ajuste lineal o cuadrático, respectivamente. En la cuarta columna se tiene la diferencia entre los coeficientes de determinación de los diferentes ajustes. Si esta diferencia no era mayor a 0.1, es decir $R_{x^2}^2 - R_x^2 > 0.1$, entonces se escoge un ajuste lineal. La quinta columna establece el ajuste escogido para modelar la DRA por ronda en cada experimento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. M. Berman *et al.* "The Protein Data Bank." En: *Nucleic Acids Research* 28.1 (2000), págs. 235-42.
- [2] M. Lee. *X-ray diffraction for materials research*. Apple Academic Press, 2016.
- [3] J. C. Kendrew *et al.* "Structure of myoglobin: a three dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution". En: *Nature* 185.4711 (1960), págs. 422-427.
- [4] E. F. Garman. "Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care?" En: *Acta Crystallographica Section D* 66.Pt 4 (2010), págs. 339-51.
- [5] E. F. Garman. "Cool crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage". En: *Current Opinion in Structural Biology* 13.5 (2003), págs. 545-551.
- [6] C Nave. "Radiation damage in protein crystallography". En: *Radiation Physics and Chemistry* 45.3 (1995), págs. 483-490.
- [7] T. Teng y K. Moffat. "Primary radiation damage of protein crystals by an intense synchrotron X-ray beam". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 7.5 (2000), págs. 313-317.
- [8] W. P. Burmeister. "Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage". En: *Acta Crystallographica Section D* 56.3 (2000), págs. 328-341.
- [9] M. Weik *et al.* "Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.2 (2000), págs. 623-628.
- [10] E. Fioravanti *et al.* "Specific radiation damage to acidic residues and its relation to their chemical and structural environment". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 14.1 (2007), págs. 84-91.
- [11] J. W. Murray, E. F. Garman y R. B. G. Ravelli. "X-ray absorption by macromolecular crystals: the effects of wavelength and crystal composition on absorbed dose". En: *Journal of Applied Crystallography* 37.4 (2004), págs. 513-522.
- [12] E. G. Allan *et al.* "To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 20.1 (2013), págs. 23-36.
- [13] R. L. Owen, E. Rudiño-Piñera y E. F. Garman. "Experimental determination of the radiation dose limit for cryocooled protein crystals". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.13 (2006), págs. 4912-4917.
- [14] P. Sliz, S. C. Harrison y G. Rosenbaum. "How does radiation damage in protein crystals depend on X-ray dose?" En: *Structure* 11.1 (2003), págs. 13-19.
- [15] M. H. Nanao, G. M. Sheldrick y R. B. G. Ravelli. "Improving radiation-damage substructures for RIP". En: *Acta Crystallographica Section D* 61.9 (2005), págs. 1227-1237.
- [16] B. W. Low *et al.* "Studies of insulin crystals at low temperatures: effects on mosaic character and radiation sensitivity". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 56.6 (1966), 1746-1750.

- [17] D. J. Haas. "X-ray studies on lysozyme crystals at -50°C ". En: *Acta Crystallographica Section B* 24.4 (1968), pág. 604.
- [18] D. J. Haas y M. G. Rossmann. "Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75°C ". En: *Acta Crystallographica Section B* 26.7 (1970), págs. 998-1004.
- [19] G. A. Petsko. "Protein crystallography at sub-zero temperatures: cryo-protective mother liquors for protein crystals". En: *Journal of Molecular Biology* 96.3 (1975), págs. 381-392.
- [20] P. Willmott. *An introduction to synchrotron radiation: techniques and applications*. John Wiley & Sons Inc., 2011.
- [21] A. Gonzalez y C. Nave. "Radiation damage in protein crystals at low temperature". En: *Acta Crystallographica Section D* 50.6 (1994), págs. 874-877.
- [22] R. B. G. Ravelli y S. M. McSweeney. "The fingerprint that X-rays can leave on structures". En: *Structure* 8.3 (2000), págs. 315-328.
- [23] D. Lieschner *et al.* "Radiation decay of thaumatin crystals at three X-ray energies". En: *Acta Crystallographica Section D* 71.4 (2015), págs. 772-778.
- [24] G. Zaloga y R. Sarma. "New method for extending the diffraction pattern from protein crystals and preventing their radiation damage". En: *Nature* 251 (1974), págs. 551-552.
- [25] D. Cascio, R. Williams y A. McPherson. "The reduction of radiation damage in protein crystals by polyethylene glycol". En: *Journal of Applied Crystallography* 17.3 (1984), págs. 209-210.
- [26] Henry N Chapman *et al.* "Femtosecond X-ray protein nanocrystallography". En: *Nature* 470 (2011), pág. 73.
- [27] J. Murray y E. F. Garman. "Investigation of possible free radical scavengers and metrics for radiation damage in protein cryocrystallography". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 9.6 (2002), págs. 347-354.
- [28] R. J. Southworth-Davies y E. F. Garman. "Radioprotectant screening for cryocrystallography". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 14.1 (2007), págs. 73-83.
- [29] B. Kauffmann *et al.* "How to avoid premature decay of your macromolecular crystal: a quick soak for long life". En: *Structure* 14.7 (2006), págs. 1099-1105.
- [30] E. Nowak *et al.* "To scavenge or not to scavenge: that is the question". En: *Acta Crystallographica Section D* 65.9 (2009), 1004-1006.
- [31] E. De la Mora, I. Carmichael y E. F. Garman. "Effective scavenging at cryo-temperatures: further increasing the dose tolerance of protein crystals". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 18.3 (2011), págs. 346-357.
- [32] P. Carpentier *et al.* "Raman assisted crystallography suggests a mechanism of X-ray induced disulfide radical formation and reparation". En: *Structure* 18.11 (2010), págs. 1410-1419.
- [33] K. A. Sutton *et al.* "Insights into the mechanism of X-ray-induced disulfide bond cleavage in lysozyme crystals based on EPR, optical absorption and X-ray diffraction studies". En: *Acta Crystallographica Section D* 69.12 (2013), págs. 2381-2394.
- [34] R. Canfield. "The amino acid sequence of egg-white lysozyme". En: *Journal of Biological Chemistry* 238.8 (1963), págs. 2698-2707.

- [35] Nomenclature Committee of the IUBMB. *Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. 1.^a ed. Elsevier Inc, Academic Press, 1992.
- [36] T. Ueno *et al.* "Elucidation of metal ion accumulation induced by hydrogen bonds on protein surfaces by using porous lysozyme crystals containing Rh(III) ions as the model surfaces". En: *Chemistry – A European Journal* 16.9 (2010), págs. 2730-2740.
- [37] C. C. F. Blake *et al.* "Structure of hen egg-white lysozyme: a three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution". En: *Nature* 206 (1965), págs. 757-761.
- [38] C. C. F. Blake *et al.* "Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme". En: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 167.1009 (1967), págs. 378-388.
- [39] O. Carugo y K. D. Carugo. "When X-rays modify the protein structure: radiation damage at work". En: *Trends in Biochemical Sciences* 30.4 (2005), págs. 213-219.
- [40] J. A. V. Butler y A. B. Robins. "Metal ion redox systems as radiation protective agents". En: *Nature* 193.4816 (1962), págs. 673-674.
- [41] B.B. Singh y M.G. Ormerod. "The effect of metal ions on free radical formation and reactions in irradiated proteins". En: *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 10.4 (1966), págs. 369-378.
- [42] P. Cavatorta, P. R. Crippa y A. Vecli. "The effects of iron upon the radiation damage in non-heme iron proteins". En: *Biophysik* 7.4 (1971), págs. 269-275.
- [43] S. Macedo *et al.* "Can soaked-in scavengers protect metalloprotein active sites from reduction during data collection?" En: *Journal of Synchrotron Radiation* 16.2 (2009), págs. 191-204.
- [44] D. N. R. Rao, M. C. R. Symons y J. M. Stephenson. "Radiation-induced electron capture by proteins containing disulphide linkages: an electron spin resonance study". En: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2 5 (1983), págs. 727-730.
- [45] T. Beitlich *et al.* "Cryoradiolytic reduction of crystalline heme proteins: analysis by uv-vis spectroscopy and X-ray crystallography". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 14.1 (2007), págs. 11-23.
- [46] J. H. Baxendale, E. M. Fielden y J. P. Keene. "Absolute rate constants for the reactions of some metal ions with the hydrated electron". En: *Proc. Chem. Soc.* (August 1963), págs. 242-243.
- [47] R. Sugich-Miranda *et al.* "Antioxidant capacity of binuclear Cu(II)-cyclophanes, insights from two synthetic bioactive molecules". En: *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 24.6 (2010), págs. 379-383.
- [48] M. D. Hanwell *et al.* "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform". En: *Journal of Cheminformatics* 4.1 (2012), págs. 1-17.
- [49] John R. Helliwell *et al.* "X-ray diffraction in temporally and spatially resolved biomolecular science". En: *Faraday Discuss.* 177.0 (2015), págs. 429-441.

- [50] Nancy E. Cooke, Theodore Kuwana y James H. Espenson. "Electrochemistry of tantalum bromide cluster compound". En: *Inorganic Chemistry* 10.5 (1971), págs. 1081-1083.
- [51] J. H. Espenson y T. R. Webb. "Kinetic studies on the reduction of the tantalum cluster ion (Ta₆Br₁₂)₂₊ by chromium(II)". En: *Inorganic Chemistry* 11.8 (1972), págs. 1909-1912.
- [52] A. J. Bard, R. Parsons y J. Jordan. *Standard potentials in aqueous solution*. 1st. CRC Press, 1985.
- [53] H. Shiraishi *et al.* "Electron spin resonance studies on hydrogen atoms formed in pure and acidic ices under electron irradiation". En: *Journal of Physical Chemistry* 77.15 (1975), págs. 2400-2407.
- [54] J. McGeehan *et al.* "Colouring cryo-cooled crystals: online microspectrophotometry". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 16.2 (2009), págs. 163-172.
- [55] C. von Sonntag. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [56] G. V. Buxton *et al.* "Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solution". En: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 17.1988 (1988), págs. 513-886.
- [57] A. Meents *et al.* "Origin and temperature dependence of radiation damage in biological samples at cryogenic temperatures". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.3 (2010), págs. 1094-1099.
- [58] W. Kabsch. "XDS". En: *Acta Crystallographica Section D* 66.2 (2010), págs. 125-132.
- [59] P. D. Adams *et al.* "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution". En: *Acta Crystallographica Section D* 66.2 (2010), págs. 213-221.
- [60] R. P. Joosten *et al.* "The PDB-REDO server for macromolecular structure model optimization". En: *IUCrJ* 1.4 (2014), págs. 213-220.
- [61] G. N. Murshudov *et al.* "REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures". En: *Acta Crystallographica Section D* 67.4 (2011), págs. 355-367.
- [62] P. Emsley y K. Cowtan. "Coot: model-building tools for molecular graphics". En: *Acta Crystallographica Section D* 60.12 Part 1 (2004), págs. 2126-2132.
- [63] O. B. Zeldin *et al.* "Predicting the X-ray lifetime of protein crystals". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.51 (2013), págs. 20551-20556.
- [64] K. Diederichs y P. A. Karplus. "Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography". En: *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997), págs. 269-275.
- [65] Jan Kmetko *et al.* "Can radiation damage to protein crystals be reduced using small-molecule compounds?" En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 67.10 (2011), págs. 881-893.
- [66] Raimond B. G. Ravelli *et al.* "Unit-cell volume change as a metric of radiation damage in crystals of macromolecules". En: *Journal of Synchrotron Radiation* 9.6 (2002), págs. 355-360.

- [67] Hanna Kirsti S Leiros *et al.* "Is radiation damage dependent on the dose rate used during macromolecular crystallography data collection?" En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 62.2 (2006), págs. 125-132.
- [68] Alexander Wlodawer *et al.* "Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures". En: *FEBS Journal* 275.1 (2008), págs. 1-21.
- [69] Philip R. Evans. "An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics". En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 67.4 (2011), págs. 282-292.
- [70] K. Diederichs y P. A. Karplus. "Better models by discarding data?" En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69.7 (2013), págs. 1215-1222.
- [71] Harold R. Powell. "X-ray data processing". En: *Bioscience Reports* 37.5 (2017), BSR20170227.
- [72] Bernhard Rupp. "Against Method: Table 1—Cui Bono?" En: *Structure* 26.7 (2018), págs. 919-923.
- [73] Manfred S. Weiss. "Global indicators of X-ray data quality". En: *J. Appl. Crystallogr.* 34.2 (2001), págs. 130-135.
- [74] P. A. Karplus y K. Diederichs. "Linking Crystallographic Model and Data Quality". En: *Science* (80-.). 336.6084 (2012), págs. 1030-1033.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Por la presente declaro que, salvo cuando se haga referencia específica al trabajo de otras personas, el contenido de esta tesis es original y no se ha presentado total o parcialmente para su consideración para cualquier otro título o grado en esta o cualquier otra universidad. Esta tesis es el resultado de mi trabajo y no incluye nada que sea el resultado de algún trabajo realizado en colaboración, a menos que se indique específicamente en el texto.

Morelos, México, Junio 2019

Francisco Murphy Pérez