

Efecto del pH en la condición de cristalización sobre el daño por radiación en cristales de proteína

Francisco Murphy Pérez

6 de febrero de 2021

Colofón

Este documento se compuso con la ayuda de KOMA-Script and L^AT_EX usando la plantilla kaobook.

A Lucía, por supuesto.

– Con todo mi amor.

Aquí va el resumen, normalmente esto se escribe al final de la tesis.

Índice general

Índice general	vi
Acrónimos	ix
1 Introducción	1
1.1 Cristalografía de rayos X	1
1.2 Daño por radiación	2
Origen	3
Clasificación	3
Consecuencias	3
Métricas	4
1.3 Crioprotección	5
1.4 Sincrotrones	5
1.5 Radioprotectores	6
Bibliografía	7

Índice de figuras

1.1 Patrón de difracción	2
1.2 Diferencia de densidad electrónica	4

Índice de tablas

1.1 Número de estructuras por método experimental	1
---	---

Acrónimos

C

CCD Charge-coupled device. 1

CRX Cristalografía de rayos X. 1, 2, 4–6

P

PDB Protein Data Bank. 1

X

XFEL X-ray Free Electron Laser. 6

1

Introducción

1.1. Cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X (CRX) es el método experimental más común para obtener la estructura tridimensional de una molécula¹ (Tabla 1.1). En general, los modelos estructurales de las macromoléculas determinadas por medio de cualquier método experimental, se depositan en el banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) [1]. El repositorio digital del PDB, de libre acceso, se encuentra en el siguiente enlace <https://www.rcsb.org/>.

Método experimental	Estructuras	Porcentaje (%)
Cristalografía de rayos X	147020	88.88
Resonancia magnética nuclear	12937	7.82
Criomicroscopía electrónica	5037	3.04
Suma	164944	99.74

La teoría de la CRX se explica brevemente a continuación. La energía de los rayos X se puede transferir a los electrones de las moléculas que conforman el cristal. Si la transferencia de energía se da de manera elástica, los electrones oscilarán con la misma frecuencia que la onda de rayos X incidente. Esto, según la electrodinámica clásica, resulta en una nueva emisión de rayos X que a su vez pueden interferir entre sí, de forma destructiva o constructiva. Esta interferencia da lugar al concepto físico conocido como difracción. Si la diferencia entre las fases de las ondas de estos nuevos rayos X es exactamente igual a $n2\pi$ radianes, donde n es un número entero, la interferencia será constructiva. Fue William Lawrence Bragg, quien interpretó la difracción observada como una reflexión² de los rayos X por distintos planos dentro del cristal. Dada la estructura repetitiva del cristal, en general³, toda interferencia constructiva será amplificada y se podrá observar como un punto discreto en el patrón de difracción. Por otra parte, simultáneamente se dará la difracción por distintas familias de planos dentro del cristal, dando su forma final al patrón de difracción (Figura 1.1).

El experimento de CRX es relativamente simple y consiste en:

1. Incidir rayos X sobre el cristal de la macromolécula de interés.
2. Obtener el patrón de difracción.
3. Rotar el cristal en cierto eje.
4. Repetir los pasos anteriores n^4 veces.

Cabe resaltar algunos puntos: (i) Los rayos X son difractados dentro del cristal macromolecular; el producto final, es decir, el patrón de difracción, se obtiene gracias a un detector de fotones, conocido como dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés). El patrón de difracción contiene información de la estructura macromolecular, por lo que es necesario mantener una copia digital de cada patrón de difracción para su posterior análisis. (ii) El cristal está montado sobre un goniómetro.

1: En este proyecto nos añadimos las macromoléculas, en particular las proteínas.

[1]: Berman y col. (2000), «The protein data bank»

Tabla 1.1: Número de estructuras depositadas en el PDB por método experimental. La suma de estos tres métodos experimentales, representa el 99.74 % del total de estructuras depositadas. Fuente: búsqueda avanzada en el PDB por método experimental <https://www.rcsb.org/search/advanced>. Actualizada al 21 de junio del 2020.

2: Es tan usual este enfoque por su simplicidad que de manera tradicional y errónea los puntos en un patrón de difracción se denominan *reflexiones*. En este texto se utilizará el término *puntos de difracción* o simplemente *puntos*.

3: Existen ciertas condiciones de simetría que producen la *extinción* total de un punto de difracción.

4: En realidad

[2]: Dauter (1999), «Data-collection strategies»

Normalmente su rotación es perpendicular a la dirección del haz de rayos X. Se especifica tanto el incremento de rotación, denominado $\Delta\varphi$, como el intervalo total de rotación. Si $\Delta\varphi = 1^\circ$, es decir, después de cada exposición el cristal se rota un grado, un enfoque típico, entonces el intervalo de rotación estará dado por $(\varphi_{\text{final}} - \varphi_{\text{inicial}}) + 1$. (iii) En general, n está dado por la simetría del cristal; a mayor simetría, menor n [2].

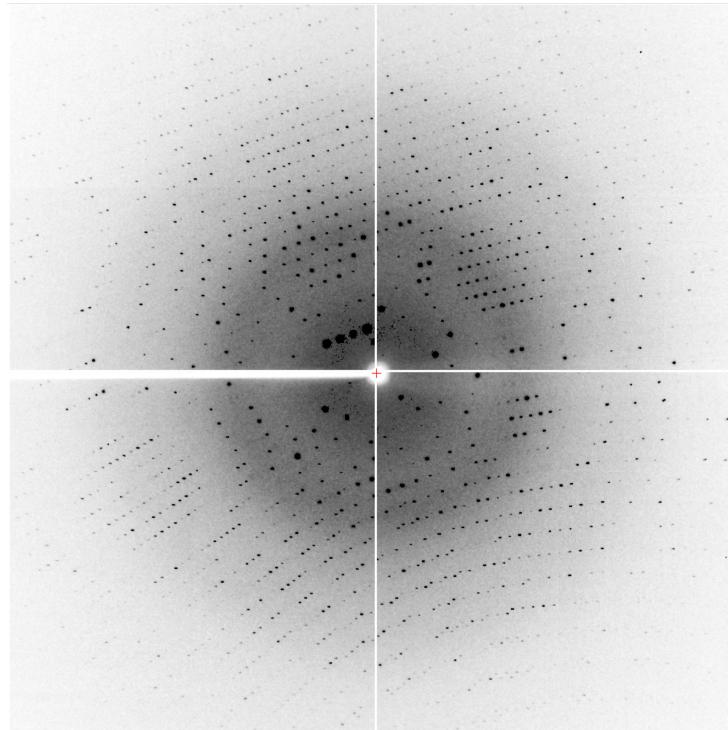


Figura 1.1: Patrón de difracción de la lisozima de la clara de huevo de gallina. Disponible en el siguiente enlace tinyurl.com/ydfw6asv. La resolución es la métrica principal que determina la calidad del modelo estructural de una proteína. Anillos concéntricos en el patrón de difracción, representan lo que se conoce como fajas de resolución. Las fajas de alta/baja resolución corresponden a anillos más externos/internos.

El objetivo del experimento de la CRX, es obtener un «dataset» completo, es decir, suficientes patrones de difracción para los pasos subsecuentes.

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 provoca que cada cristal macromolecular presente un límite temporal, denominado tiempo de vida útil, bajo el haz de rayos X. El daño por radiación se da porque los rayos X usados tienen una energía relativamente alta⁵. En el caso de un cristal macromolecular, su estabilidad física se da por pocas interacciones no covalentes por unidad de volumen, en comparación con un cristal de sal, por ejemplo. Por esto, su desintegración no requiere de mucha energía⁶. Por otro lado, es evidente que al perderse el orden cristalino, se pierde la amplificación del proceso de difracción y en consecuencia los patrones de difracción cada vez contienen menos información. En otras palabras, la calidad del cristal decae y por lo tanto la calidad de cada patrón de difracción obtenido. El daño por radiación es la principal causa de que sea difícil obtener un «dataset» completo.

5: Más información en la siguiente sección.

6: Incluso su manipulación tiene que darse con extrema precaución.

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, o 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 miles⁷ 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 la red de contactos cristalinos, se pierde el orden cristalino.

7: El promedio de la primera energía de ionización para los átomos presentes en una proteína es de 12.05 eV, la energía de un fotón con una longitud de onda de 1 Å es de 12 398.4 eV.

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 macroscópico sobre el cristal⁸. Esto implica que una fracción suficiente de macromoléculas dentro del cristal ha sido afectada por el daño primario y secundario [3].

8: Fisuras o cambios en su coloración, por ejemplo.

[3]: Teng y col. (2000), «Primary radiation damage of protein crystals by an intense synchrotron X-ray beam»

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 unitaria, que causa la pérdida de la isomorfía cristalina; (iii) el aumento en los parámetros de desplazamiento atómico; y (iv) el empeoramiento de las medidas que indican la calidad global de los datos [3]. El listado anterior se conoce como daño por radiación 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 [4, 5]. No todos los residuos de aminoácido susceptibles son afectados de la misma manera. Hasta el momento, las razones de esto no han sido esclarecidas. 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 el peor escenario, 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.

[4]: Weik y col. (2000), «Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation»

[5]: Ravelli y col. (2000), «The ‘fingerprint’ that X-rays can leave on structures»

Métricas

[6]: Murray y col. (2004), «X-ray absorption by macromolecular crystals: The effects of wavelength and crystal composition on absorbed dose»

[7]: Garman (2010), «Radiation damage in macromolecular crystallography: What is it and why should we care?»

[8]: Allan y col. (2013), «To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question»

La mejor manera de determinar el daño por radiación en un cristal macromolecular, es estimando la dosis de radiación absorbida por el cristal. La dosis depende a su vez de la composición atómica del cristal y de algunos parámetros experimentales referentes al haz de rayos X [6]. La dosis se mide en 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 del orden de MGy [7]. En este aspecto, se han propuesto varias métricas para cuantificar el daño por radiación en función de la dosis absorbida; sin embargo, se ha demostrado que el uso de distintas métricas puede dar diferentes resultados [8]. Actualmente no existe una métrica que haya sido acordada por unanimidad en el campo de la CRX.

El daño por radiación específico se puede visualizar al realizar colectas de datos idénticas y tomar la diferencia entre la densidad electrónica del modelo estructural de la colecta n y la colecta inicial.

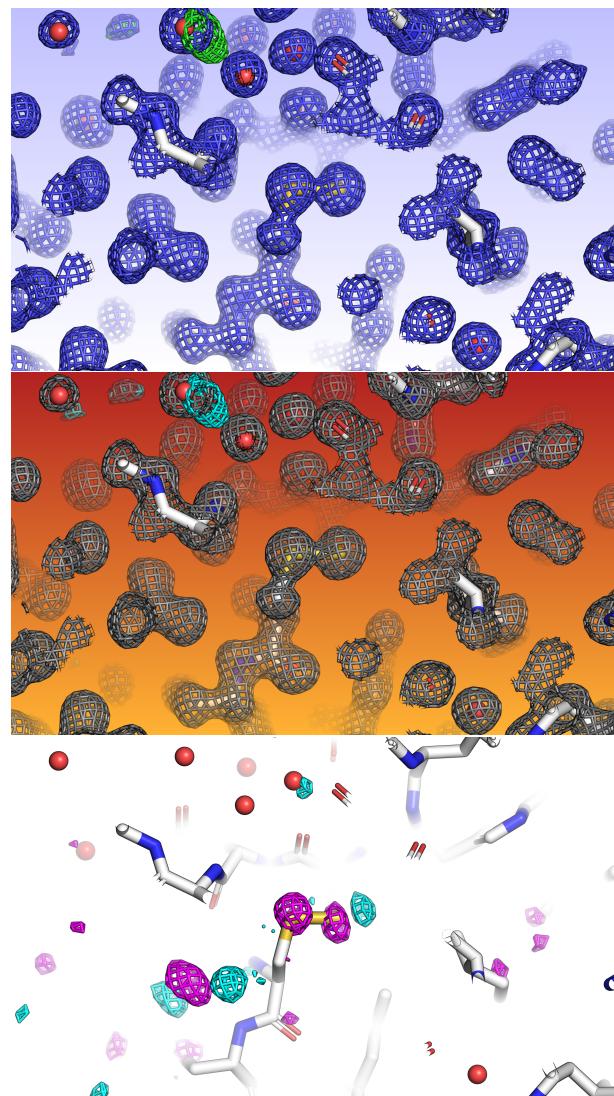


Figura 1.2: Diferencia de densidad electrónica entre colectas de datos idénticas. Arriba: primer colecta de un cristal de lisozima (dosis absorbida 0.6 MGy). En medio: segunda colecta del mismo cristal (dosis absorbida 3.2 MGy). Los mapas $2F_o - F_c$ y $F_o - F_c$ se encuentran dibujados a 1σ y $\pm 3.5\sigma$, respectivamente. Abajo: La diferencia de densidad electrónica entre colectas $F_{o,2} - F_{o,1}$. Donde la diferencia negativa (magenta) está a -3.5σ y la positiva (cian) a 3.5σ . Nótese como prácticamente no se observa una diferencia entre los mapas $2F_o - F_c$ (malla azul contra malla gris); sin embargo, sí existe una diferencia del modelo estructural inicial (el mismo en las tres imágenes) con respecto a la densidad electrónica de la segunda colecta. En otras palabras, para la segunda colecta, en una fracción de las proteínas cristalizadas este puente disulfuro se ha roto. Imagen realizada con PyMOL [9] y datos de [10].

1.3. Crioprotección

La primer estructura macromolecular determinada fue la de la mioglobina en 1958 por Kendrew y colaboradores [11]. La forma de contender con el daño por radiación en aquella época era utilizando decenas de cristales y promediar los patrones de difracción. La regla de dedo para cambiar el cristal irradiado por uno nuevo, era seguir la intensidad de algunas reflexiones y si esta llegaba a disminuir de 20 a 30 % de su valor inicial, entonces se procedía a reemplazar el cristal.

El primer estudio en el que se valoró el potencial de la crioprotección, para reducir el daño por radiación, surgió por necesidad. Sucedía que ciertos cristales de insulina con átomos pesados sufrían un rápido desgaste por la radiación, en comparación con cristales de insulina sin átomos pesados. 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 [12].

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 [13]. 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 [14]. Es hasta 1988 que Hope describe por primera vez lo que conocemos hoy en día como criocrystalografía de rayos X, donde básicamente se añade al cristal, o a la condición de cristalización, un crioprotector y el proceso de difracción del cristal se realiza a -173 °C [15]. Una de las desventajas de esta técnica es encontrar las condiciones de crioprotección adecuadas para cada macromolécula. 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 [16]. Gracias a la crioprotección, en general era suficiente un único cristal macromolecular para obtener un «dataset» completo.

1.4. Sincrotrones

La principales fuente de rayos X para realizar el experimento de CRX, es la radiación sincrotrón. La historia tecnológica de los sincrotrones se divide en generaciones. La primera generación de sincrotrones eran aquellos pertenecientes al campo de la física de partículas, donde los primeros estudios con respecto a la estructura de proteínas fueron realizados [17]. Para la década de 1980 se construyen los sincrotrones dedicados a la biología estructural, esta es la segunda generación. Para la década de 1990 llega la tercera generación. El primer sincrotrón perteneciente a la cuarta generación empezó a operar en 2016 [18]. Una de las características de un sincrotrón es su brillo espectral, que se define como la distribución del flujo de fotones en el espacio y el rango angular. El flujo se establece como el número de fotones por segundo que atraviesan un área definida por un

[11]: Kendrew y col. (1958), «A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis»

[12]: Low y col. (1966), «Studies of insulin crystals at low temperatures: effects on mosaic character and radiation sensitivity»

[13]: Haas (1968), «X-ray studies on lysozyme crystals at -50°C»

[14]: Haas y col. (1970), «Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75 °C»

[15]: Hope (1988), «Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method»

[16]: Garman (2003), «'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage.»

[17]: Phillips y col. (1976), «Applications of synchrotron radiation to protein crystallography: Preliminary results»

[18]: Owen y col. (2016), «Radiation damage and derivatization in macromolecular crystallography: a structure factor's perspective»

[19]: Willmott (2019), *An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*

9: Existen líneas especiales donde existe la posibilidad de usar cristales con un orden de magnitud menor, las denominadas líneas microfoco.

[20]: Martin-Garcia y col. (2016), «Serial femtosecond crystallography: A revolution in structural biology»

[3]: Teng y col. (2000), «Primary radiation damage of protein crystals by an intense synchrotron X-ray beam»

[4]: Wei k y col. (2000), «Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation»

[5]: Ravelli y col. (2000), «The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures»

[21]: Garman y col. (2017), «X-ray radiation damage to biological macromolecules: further insights»

[8]: Allan y col. (2013), «To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question»

[22]: Nowak y col. (2009), «To scavenge or not to scavenge: that is the question»

ancho de banda dado [19]. La revolución tecnológica de los sincrotrones se nota en la diferencia del orden de magnitud del brillo espectral [19]. Este aumento en brillo se ha permitido pues permite una gran ventaja: la posibilidad de utilizar cristales de menor tamaño. Esto es porque la principal limitante de la CRX es obtener cristales macromoleculares, en particular cristales de un tamaño adecuado (al menos unos cien micrómetros en sus tres dimensiones⁹.)

Actualmente se está desarrollando la tecnología para cambiar la metodología de la colecta de datos, usando cristales macromoleculares nanométricos y con una fuente de rayos X más poderosa denominada XFEL (del inglés *X-ray Free Electron Laser*). Existen ya varios estudios en los que se ha demostrado la posibilidad de obtener estructuras macromoleculares con esta nueva metodología [20]. Sin embargo, el acceso al tiempo experimental en un XFEL es actualmente muy limitado.

Como se mencionó en la sección anterior, ya para el año 2000, la noción general en el campo de la criocrystalografía era que el daño por radiación era insignificante, un problema del pasado. Precisamente esta noción cambia en ese mismo año, cuando tres estudios independientes muestran el efecto del daño por radiación en la entonces nueva generación de sincrotrones [3-5].

1.5. Radioprotectores

Al ser evidente que el daño por radiación aumentaba con el incremento en brillo, fue necesario buscar estrategias, como la crioprotección, que ayudaran a mitigar el daño por radiación. En el curso de los últimos veinte años, se han investigado varias estrategias pre y posteriores a la difracción con distintos enfoques [21]. Una de las tantas estrategias, es el uso de moléculas pequeñas que interactúan con los radicales libres generados por la radiación. Estas moléculas se denominan radioprotectores. Sin embargo, en la literatura científica existen varias incongruencias con respecto a la efectividad de los radioprotectores y es por esto que la comunidad cristalográfica no ha adoptado al cien por ciento el uso de radioprotectores de manera rutinaria [8, 22].

Bibliografía

Here are the references in citation order.

- [1] Helen M. Berman y col. «The protein data bank». En: *Nucleic Acids Research* 28.1 (2000), págs. 235-242. doi: [10.1093/nar/28.1.235](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235) (vid. pág. 1).
- [2] Zbigniew Dauter. «Data-collection strategies». En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 55.10 (1999), págs. 1703-1717. doi: [10.1107/S0907444999008367](https://doi.org/10.1107/S0907444999008367) (vid. pág. 2).
- [3] Tsu Yi Teng y Keith 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. doi: [10.1107/S0909049500008694](https://doi.org/10.1107/S0909049500008694) (vid. págs. 3, 6).
- [4] Martin Weik y col. «Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2000). doi: [10.1073/pnas.97.2.623](https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.623) (vid. págs. 3, 6).
- [5] Raimond B.G. Ravelli y Sean M. McSweeney. «The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures». En: *Structure* (2000). doi: [10.1016/S0969-2126\(00\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00109-X) (vid. págs. 3, 6).
- [6] James W. Murray, Elspeth F. Garman y Raimond 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. doi: [10.1107/S0021889804010660](https://doi.org/10.1107/S0021889804010660) (vid. pág. 4).
- [7] Elspeth F. Garman. «Radiation damage in macromolecular crystallography: What is it and why should we care?». En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* (2010). doi: [10.1107/S0907444910008656](https://doi.org/10.1107/S0907444910008656) (vid. pág. 4).
- [8] Elizabeth G. Allan y col. «To scavenge or not to scavenge, that is STILL the question». En: *Journal of Synchrotron Radiation* (2013). doi: [10.1107/S0909049512046237](https://doi.org/10.1107/S0909049512046237) (vid. págs. 4, 6).
- [9] LLC Schrödinger. «The {PyMOL} Molecular Graphics System, versión 2.4». Nov. de 2015 (vid. pág. 4).
- [10] Max H. Nanao, George M. Sheldrick y Raimond B. G. Ravelli. «Improving radiation-damage substructures for RIP». En: *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 61.9 (sep. de 2005), págs. 1227-1237. doi: [10.1107/S0907444905019360](https://doi.org/10.1107/S0907444905019360) (vid. pág. 4).
- [11] J. C. Kendrew y col. «A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis». En: *Nature* 181.4610 (mar. de 1958), págs. 662-666. doi: [10.1038/181662a0](https://doi.org/10.1038/181662a0) (vid. pág. 5).
- [12] B. W. Low y col. «Studies of insulin crystals at low temperatures: effects on mosaic character and radiation sensitivity». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 56.6 (dic. de 1966), págs. 1746-1750. doi: [10.1073/pnas.56.6.1746](https://doi.org/10.1073/pnas.56.6.1746) (vid. pág. 5).
- [13] D. J. Haas. «X-ray studies on lysozyme crystals at -50°C». En: *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 24.4 (1968), págs. 604-604. doi: [10.1107/s056774086800292x](https://doi.org/10.1107/s056774086800292x) (vid. pág. 5).
- [14] D. J. Haas y M. G. Rossmann. «Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75 °C». En: *Acta crystallographica. Section B: Structural crystallography and crystal chemistry* 26.7 (1970), págs. 998-1004. doi: [10.1107/S0567740870003485](https://doi.org/10.1107/S0567740870003485) (vid. pág. 5).
- [15] H. Hope. «Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method». En: *Acta Crystallographica Section B* 44.1 (1988), págs. 22-26. doi: [10.1107/S0108768187008632](https://doi.org/10.1107/S0108768187008632) (vid. pág. 5).
- [16] Elspeth Garman. «'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage». En: *Current opinion in structural biology* 13.5 (oct. de 2003), págs. 545-51. doi: [10.1016/j.sbi.2003.09.013](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.013) (vid. pág. 5).

- [17] J. C. Phillips y col. «Applications of synchrotron radiation to protein crystallography: Preliminary results». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1976). doi: [10.1073/pnas.73.1.128](https://doi.org/10.1073/pnas.73.1.128) (vid. pág. 5).
- [18] Robin L. Owen y Darren A. Sherrell. «Radiation damage and derivatization in macromolecular crystallography: a structure factor's perspective». En: *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* 72.3 (mar. de 2016), págs. 388-394. doi: [10.1107/S2059798315021555](https://doi.org/10.1107/S2059798315021555) (vid. pág. 5).
- [19] Philip Willmott. *An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*. 2nd ed. John Wiley & Sons, 2019, pág. 504 (vid. pág. 6).
- [20] Jose M. Martin-Garcia y col. «Serial femtosecond crystallography: A revolution in structural biology». En: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 602 (jul. de 2016), págs. 32-47. doi: [10.1016/j.abb.2016.03.036](https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.036) (vid. pág. 6).
- [21] Elspeth F Garman y Martin Weik. «X-ray radiation damage to biological macromolecules: further insights». En: *Journal of Synchrotron Radiation* 24.1 (ene. de 2017), págs. 1-6. doi: [10.1107/S160057751602018X](https://doi.org/10.1107/S160057751602018X) (vid. pág. 6).
- [22] Elzbieta Nowak y col. «To scavenge or not to scavenge: that is the question». En: *Acta Crystallographica Section D* 65.9 (sep. de 2009), págs. 1004-1006. doi: [10.1107/S0907444909026821](https://doi.org/10.1107/S0907444909026821) (vid. pág. 6).