

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE
PÉPTIDO(S) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA, PRESENTE(S) EN EL VENENO
DE ESCORPIÓN *Tityus macrochirus* (BUTHIDAE)**

CLARA ANDREA RINCÓN CORTÉS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2017

**IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE
PÉPTIDO(S) CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA, PRESENTE(S) EN EL VENENO
DE ESCORPIÓN *Tityus macrochirus* (BUTHIDAE)**

CLARA ANDREA RINCÓN CORTES

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Bioquímica

Director:

EDGAR ANTONIO REYES MONTAÑO MsC y Dr. Sci

Profesor Asociado

Departamento de Química

Universidad Nacional

Línea de Investigación:

Diseño y Evaluación de Péptidos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Proteínas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2017

Parte del trabajo experimental fue realizado en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

A mi familia por su gran e incondicional apoyo y porque acá hay un poquito de cada uno de ellos.

A mi esposo John Patrick Ospina Lara, por ser mi compañía incondicional, mi socio en esta travesía.

A mi amigo Edgar Reyes, por brindarme su confianza y ejemplo para el desarrollo de esta idea.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, por la oportunidad de pertenecer al programa de Ciencias- Bioquímica.

A la Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, por su colaboración y apoyo para poder realizar las actividades del doctorado.

Colciencias, quienes financiaron, parte del programa de doctorado y se logró realizar, las actividades propuestas.

Director de Tesis Edgar Antonio Reyes M, por su orientación, colaboración, seguimiento y confianza para el desarrollo de este trabajo.

A los jurados evaluadores, Dr. Gerardo Corzo, Dr. Jimmy Guerrero y Dra. Adriana Umaña, por tomarse el tiempo de leer el trabajo y evaluarlo.

Al Grupo de Investigación en Proteínas GRIP, de la Universidad Nacional de Colombia: profesora Nohora Angélica Vega Castro por su aceptación al grupo, el apoyo, colaboración y orientación en el desarrollo del proyecto.

A los Amigriptos y compañeros de lucha: Nury Vargas, Zulma Casa, Andrea Wilches, Nury Carreño, Tania Cortazar, Deisy Hidalgo, Jessica Espinosa, Aura Reginfo, Ariadna Rodríguez, Paula Espinosa, Ángel Pérez, Juan Martínez, Cesar Machuca, Daniel Romero, Edwin Reyes, Roberto García, Juan Flórez, Orlando Pérez.

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México- Cuernavaca: Dr. Lourival D. Possani por su aceptación y enseñanzas durante la pasantía, y a su equipo por toda su colaboración, enseñanzas y asesorías: Mary Jiménez, Timoteo Olamendi, Fernando Zamudio, Fredy Coronas, Ignacio Veytia, María del Carmen Martínez, Jimena Isaías, Guillermo Fernández, Iván García, Iván de la Cruz, Rita Restano, Georgina Gurrola, Cipriano Balderas, Teresa Romero, Leonel Vargas, Gamse, Leopoldo Guereca, Gustavo Delgado, Lidia Riaño Linda Espinosa, David Jauregui, Carmen Najera, Alberto Romero, Edson Carcamo, Eduardo Santibañez, Laura Valdez, Gonzalo, Oscar, Baltazar Becerril, Remi Rodríguez, Rosalba Sánchez-Alcala, Ilse Gómez, Ernesto Ortiz, Edmundo González,

Compañeros y amigos de la U.D.C.A. Cheyron Castellanos, Cristina Lenis, Giovanna Meza, Sergio Cuervo, Gina Méndez, Jeaneth Rodríguez, Ruben Torrenegra, Ricardo Aguilera, Daniel Izquierdo, John Jairo Gómez, Elizabeth Luna, Concepción Bailon, Ricardo Urrego, Dani Sanjuanelo, Kengy Calderon, Daniel Vicentes, Diego Muñoz, Ismael Ortiz. Marina, Mónica Daza, Camilo, Deisy, Jaime Roa.

A los mocehuneros, por su compañía: Helder, Daniela, Cristina, Liz, Magaly, Sugeidy, Samuel, Rivelino, Paco, Beatriz, Alejandra, Señor Nelson y Señora Beatriz.

A los habitantes de la vereda Los Moyas, y en especial a los de la vereda de Placitas, por toda su ayuda en la recolección de escorpiones, a la señora Milena, Señor Javier y sus hijos.

A los profesores Eduardo Flórez, Zully Rivera, Fredy Ramos, Andrés Cabrera, Ricardo Bravo, por sus asesorías, enseñanzas y colaboración.

A Mis padres Luz Marina Cortes y Gabriel Rincón, por todas sus enseñanzas, con las que he logrado realizar todos mis sueños.

A mis Hermanos, Gabriel M. Rincón, Leticia Rincón, Lise Laitón, mi sobrina Natalia Rincón y tía Martha Celis. Por ser el apoyo, la alegría y estar en todo momento.

A mi esposo John Patrick Ospina, por ser mi “socio” y darme el ánimo para seguir adelante.

A todas mis tías, tíos, primos y suegros, por su colaboración y compañía.

A mis amigos Andrés Aristizabal, Julián Contreras, Carolina Rodríguez, Nury Vargas, Yamile Guataquí, July Clavijo, Martiza Landaeta por ser un gran aliciente

Resumen

El veneno de escorpión ha sido objeto de estudio por varias décadas, dado en gran parte a los péptidos que lo conforman, ya que son los directamente responsables de los efectos tóxicos que desarrolla en sus presas o en otros organismos que entran en contacto con la sustancia. En Colombia hay gran diversidad de especies de escorpiones, pero pocas han sido estudiadas a nivel bioquímico, por lo cual se planteó realizar la caracterización estructural y funcional de péptidos del veneno de escorpión *Tityus macrochirus*, siendo el primer estudio realizado a nivel bioquímico de este veneno que se ha reportado. Así a partir de métodos bioquímicos, se logró identificar y determinar las características estructurales de la mayoría de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, definiéndolos como péptidos con pesos moleculares de 3 a 7 kDa, conformados de 37 a 70 residuos de aminoácidos, caracterizados porque en ellos se pueden encontrar entre 6 y 8 residuos de cisteína y algunos de ellos reconocen canales iónicos, como el canal de potasio que fue reconocido por el péptido denominado FVI8-2. Igualmente se logró determinar que tanto el veneno total como algunas de sus fracciones de péptidos generan citotoxicidad en líneas celulares provenientes de tumores de forma selectiva, en un rango de concentración de 0,25 µg/mL a 10 µg/mL. Estas características estructurales y funcionales permiten postular a algunos de estos péptidos como posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Palabras clave: *Tityus macrochirus*, péptidos, canales iónicos, líneas celulares cancerosas, cáncer.

Abstract

Scorpion venom has been studied for several decades, largely due to the peptides that make it up, as they are directly responsible for the toxic effects it develops on its prey or other organisms that come in contact with the substance. In Colombia there is a great diversity of species of scorpions, but few have been studied at biochemical level. Therefore, it was proposed to carry out the structural and functional characterization of peptides of scorpion venom *Tityus macrochirus*, being the first biochemical study of this poison Which has been reported. Thus from biochemical methods, it was possible to identify and determine the structural characteristics of most of the peptides present in the venom of *T. macrochirus*, defining them as peptides with molecular weights of 3 to 7 kDa, formed of 37 to 70 amino acid residues, characterized in that 6 to 8 cysteine residues can be found in them and some of them recognize ion channels, such as the potassium channel that was recognized by the peptide called FVI8-2. It was also possible to determine that both total venom and some of its peptide fractions generate cytotoxicity in tumor cell lines selectively in a concentration range of 0.25 µg /mL to 10 µg /mL. These structural and functional characteristics allow to postulate some of these peptides as possible therapeutic agents for the treatment of different types of cancer.

Keywords: *Tityus macrochirus*, peptides, Ion channels, cancer cell lines, cancer

Contenido

RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1. ESTADO DEL ARTE	3
1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESCORPIONES	3
1.3. VENENO DE ESCORPIÓN	6
1.3.1. Péptidos presentes en los venenos de escorpión	8
1.3.1.1. Toxinas NaScTxS:	11
1.3.1.2. Toxinas KScTxS:	12
1.4. EFECTOS DE LOS VENENOS DE ESCORPIÓN Y SUS PÉPTIDOS EN EL CÁNCER	15
1.5. HIPÓTESIS	19
1.6. OBJETIVOS	20
1.6.1. Objetivo general	20
1.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPÍTULO 2	21
2. RECOLECCIÓN DE INDIVIDUOS DEL ESCORPIÓN <i>TITYUS MACROCHIRUS</i>, OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DE SU VENENO	21
2.1. EL ESCORPIÓN <i>TITYUS MACROCHIRUS</i>	21
2.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>TITYUS MACROCHIRUS</i> .	22
2.3. DESARROLLO METODOLÓGICO	25
2.3.1. Recolección de individuos <i>Tityus macrochirus</i>	25
2.3.2. Obtención y preparación del veneno	26
2.3.3. Cuantificación de proteína total presente en el veneno de <i>T. macrochirus</i> .	28
2.3.4. Análisis e identificación del perfil proteico del veneno total de <i>T. macrochirus</i>	28
• ELECTROFORESIS SDS-PAGE:	28
2.4. RESULTADOS	30
2.4.1. Obtención del veneno y cuantificación de proteína total.	30
2.4.2. Identificación y estimación de pesos moleculares y punto isoeléctrico:	32

2.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS:	35
------------------------------	----

CAPÍTULO 3	37
-------------------	-----------

3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PÉPTIDOS	37
---	-----------

3.1. MÉTODOS BIOQUÍMICOS EMPLEADOS PARA LA PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS PRESENTES EN VENENOS DE ESCORPIÓN.	37
--	----

3.2. DESARROLLO METODOLÓGICO PARA LA PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS PRESENTES EN EL VENENO DE <i>T. MACROCHIRUS</i> .	39
---	----

3.2.1. MÉTODOS GENERALES DE PURIFICACIÓN	39
--	----

Purificación de los péptidos presentes en el veneno de <i>T. macrochirus</i> :	39
--	----

3.2.1.1. Cromatografía de filtración en gel:	39
--	----

3.2.1.2. Cromatografía de intercambio iónico	40
--	----

3.2.1.3. Ultrafiltración:	41
---------------------------	----

3.2.1.4. Cromatografía Líquida De Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC):	42
--	----

3.3. PROCEDIMIENTOS	43
---------------------	----

3.3.1. PROCEDIMIENTO 1	43
------------------------	----

3.3.2. PROCEDIMIENTO 2	44
------------------------	----

3.3.3. PROCEDIMIENTO 3	45
------------------------	----

3.3.4. PROCEDIMIENTO 4	46
------------------------	----

3.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PÉPTIDOS PURIFICADOS DEL VENENO DE <i>T. MACROCHIRUS</i>	47
---	----

3.4.1. Análisis de espectrometría de masas	47
--	----

3.4.2. Reducción y alquilación de fracciones puras	49
--	----

3.4.3. Digestión enzimática de péptidos purificados	49
---	----

3.4.4. Determinación de amino terminal y secuencia completa de los péptidos purificados.	50
--	----

3.5. RESULTADOS	51
-----------------	----

3.5.1. PROCEDIMIENTO 1, Cromatografía de columna abierta:	51
---	----

3.5.2. PROCEDIMIENTO 2, Ultrafiltración:	51
--	----

3.5.3. PROCEDIMIENTO 3, Cromatografía Líquida De Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC):	54
---	----

3.5.4. PROCEDIMIENTO 4, Purificación de péptidos presentes en el veneno de <i>T. macrochirus</i> , por medio de tres métodos cromatográficos.	58
---	----

3.5.4.1. Cromatografía de filtración en gel por Sephacryl S-100:	58
--	----

3.5.4.2. Cromatografía de intercambio catiónico por CarboxiMetil-Celulosa:	60
--	----

3.5.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa:	63
--	----

3.5.5. Análisis de masas de las fracciones de péptidos purificadas, obtenidas por los procedimientos 3 y 4.	67
---	----

3.5.6. Determinación de secuencia primaria	70
--	----

3.5.7. Análisis LC-MS/MS:	76
---------------------------	----

3.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	78
------------------------------	----

CAPÍTULO 4	85
4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL VENENO Y DE LAS FRACCIONES DE PÉPTIDOS PURIFICADOS.	85
4.1. VENENO DE ESCORPIÓN Y SUS EFECTOS EN LAS CÉLULAS.	85
4.2. DESARROLLO METODOLÓGICO:	89
4.2.1. Evaluación de la actividad citotóxica del veneno de <i>T. macrochirus</i> y sus péptidos purificados, en líneas celulares provenientes de tumores	89
4.2.2. Toxicidad en mamíferos e insectos del veneno de <i>T. macrochirus</i> :	90
4.2.3. Actividad de péptidos purificados sobre canales de potasio	91
4.2.4. Actividad enzimática del veneno total de <i>T. macrochirus</i> :	91
4.2.4.1. Actividad Fosfolipasa:	91
4.2.4.2. Actividad Proteolítica:	92
4.2.4.3. Actividad de Hialuronidasa:	93
4.2.4.4. Actividad Proteolítica y de Hialuronidasa:	94
4.3. RESULTADOS	95
4.3.1. Citotoxicidad del veneno total de <i>T. macrochirus</i> . en líneas celulares provenientes de cáncer.	95
4.3.2. Toxicidad en mamíferos e insectos del veneno de <i>T. macrochirus</i> :	99
4.3.3. Actividad en canales iónicos.	102
4.3.4. Actividad enzimática del veneno total de <i>T. macrochirus</i> :	103
4.3.4.1. Actividad Fosfolipasa:	103
4.3.4.2. Actividad Proteolítica:	104
4.3.4.3. Actividad de Hialuronidasa:	105
4.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	109
4.4.1. Citotoxicidad en líneas celulares provenientes de tumores	109
4.4.2. Toxicidad del veneno total de <i>T. macrochirus</i> , y péptidos parcial y totalmente purificados.	113
4.4.3. Actividad en canal iónico hKv1.3.	115
4.4.4. Actividad enzimática del veneno de <i>T. macrochirus</i> :	115
CAPÍTULO 5.	117
5. MODELAMIENTO DE ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PÉPTIDOS	117
5.2. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LOS PÉPTIDOS PRESENTES EN VENENOS DE ESCORPIÓN	117
5.3. DESARROLLO METODOLÓGICO	119
5.3.1. Alineamiento de secuencias de péptidos obtenidos a partir del proceso de purificación del veneno de <i>T. macrochirus</i> .	119
5.3.2. Predicción de la estructura tridimensional del péptido FV2-16 del veneno de <i>T. macrochirus</i> .	120
5.4. RESULTADOS	121

5.4.1. Alineamiento de secuencias de péptidos obtenidos a partir del proceso de purificación del veneno de <i>T. macrochirus</i> .	121
5.4.2. Predicción de la estructura tridimensional del péptido FV2-16 del veneno de <i>T. macrochirus</i> .	127
5.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	131
CAPÍTULO 6.	134
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	134
6.2. CONCLUSIONES	134
6.3. RECOMENDACIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO A: PREPARACIÓN DE GELES SDS-PAGE- TRIS-TRICINA.	159
ANEXO B: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL SOLUBLE DEL VENENO DE T. MACROCHIRUS, POR MEDIO DEL MÉTODO DE BCA.	161
ANEXO C: CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA ABIERTA	165
ANEXO D. MÉTODO DE ULTRAFILTRACIÓN:	172
ANEXO E. PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN EL PROCEDIMIENTO 4.	176
ANEXO F: RESULTADOS PRELIMINARES DE CITOTOXICIDAD	193
ANEXO G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL VENENO TOTAL DE T. MACROCHIRUS Y DE LAS FRACCIONES DE PÉPTIDOS PURIFICADAS.	197

Lista de figuras

Figura 1. Anatomía de un escorpión.....	4
Figura 2. Distribución geográfica de los géneros representativos de la familia Buthidae en Colombia.....	5
Figura 3. Perfil electroforético del veneno de diferentes especies de escorpión.....	8
Figura 4. Estructuras tridimensionales de las clases de péptidos presentes en venenos de escorpión.....	11
Figura 5. Estructuras representativas de α -Toxinas y β - Toxina de escorpión.	12
Figura 6. Epitopes funcionales de toxinas clasificadas como KScTxS.	14
Figura 7. Efecto del veneno de <i>Odontobuthus doriae</i> , realiza efecto sobre líneas tumorales MCF-7.	16
Figura 8. Efecto Citotóxico del veneno de <i>C. tecomanus</i>	17
Figura 9. Citotoxicidad de las fracciones parcialmente purificadas de péptidos a partir del veneno de <i>C. tecomanus</i>	18
Figura 10. Individuo macho de <i>Tityus macrochirus</i>	22
Figura 11. Principales características morfológicas de <i>Tityus macrochirus</i> (macho).	23
Figura 12. Telson de <i>Tityus macrochirus</i>	24
Figura 13. Sitios de recolección de individuos <i>Tityus macrochirus</i>	25
Figura 14. Obtención del veneno del escorpión <i>T. macrochirus</i> , por estimulación eléctrica.....	27
Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE del veneno total de <i>T. macrochirus</i>	33
Figura 16. Electroforesis bidimensional del veneno total de <i>T. macrochirus</i>	34
Figura 17. Perfil cromatográfico de RP-HPLC (método A, 45 minutos) del veneno total de <i>T. macrochirus</i> , y las fracciones obtenidas de la ultrafiltración.	53
Figura 18. . Cromatograma del análisis del veneno total de <i>T. macrochirus</i> , por RP-HPLC.	55
Figura 19. Perfil cromatográfico de la purificación de los componentes proteicos del veneno de <i>T. macrochirus</i> por cromatografía de filtración en gel de Sephacryl S-100HR	59
Figura 20. Perfil cromatográfico de la separación realizada por intercambio catiónico de la Fracción V, obtenida en filtración en gel.....	61
Figura 21. Perfil cromatográfico de la separación realizada por intercambio catiónico de la Fracción VI, obtenida en filtración en gel.....	62
Figura 22. Perfil cromatográfico de la purificación de las fracciones obtenidas en cromatografía de intercambio cationico por RP-HPLC.	66

Figura 23. Amino terminal de la fracción Tmac48.	71
Figura 24. Perfil cromatográfico del péptido T.mac48, reducido y alquilado analizado por RP-HPLC.	71
Figura 25. Perfil cromatográfico del análisis del péptido T.mac48RA, después de la digestión enzimática por RP-HPLC.	72
Figura 26. Perfil cromatográfico del análisis del péptido Tmac48, después de la digestión enzimática con Lys-C, por RP-HPLC	73
Figura 27. Secuencia de aminoácidos del péptido Tmac48.	74
Figura 28. Electroforesis bidimensional del veneno total de <i>T. macrochirus</i>	76
Figura 29. Actividad citotóxica que desarrolla en diferentes líneas celulares, el veneno total de <i>T. macrochirus</i> , y sus fracciones purificadas y parcialmente purificadas de péptidos.	98
Figura 30. Identificación de la actividad de dos péptidos purificados del veneno de <i>T. macrochirus</i> , en el canal hKv1.3.	102
Figura 31. Identificación de fosfolipasas en el veneno de <i>T. macrochirus</i>	103
Figura 32. Identificación de la actividad proteolítica del veneno de <i>T. macrochirus</i> . Por medio de Zimograma, empleando como sustrato gelatina y caseína.	105
Figura 33. Grafica de la curva de calibración de concentración de ácido hialurónico, para medir la actividad de hialuronidasa en el veneno de <i>T. macrochirus</i>	106
Figura 34. Porcentaje de la actividad de Hialuronidasa.	107
Figura 35. Identificación de la actividad de hialuronidasa, en el veneno de <i>T.</i> <i>macrochirus</i> . y de las fracciones FI, FII, FIII y FIV. Por medio de Zimograma, empleando como sustrato ácido hialurónico.	108
Figura 36. Cladograma que muestra el agrupamiento de las secuencias obtenidas por diferentes métodos.	122
Figura 37. Secuencia de aminoácidos del péptido FV2-16.	128
Figura 38. Predicción de la estructura secundaria del péptido FV2-16.	128
Figura 39. Normalización de la predicción del modelo de estructura secundaria del péptido FV2-16 de <i>T. macrochirus</i>	129
Figura 40. Alineamiento de 10 secuencias con mayor identidad al péptido FV2-16 y valor de Z-score de cada uno de los alineamientos realizados.	129
Figura 41. Modelos estructurales generados para la secuencia del péptido FV2-16.	131

Lista de tablas

Tabla 1. Escorpiofauna colombiana.....	6
Tabla 2. Cuantificación de proteína total presente en tres muestras de veneno de <i>T. macrochirus</i>. La concentración de proteína se determinó por medio de métodos colorimétricos y de absorción.	31
Tabla 3. Ultrafiltración del veneno total de <i>T. macrochirus</i>. La ultrafiltración se realizó desde el Amicon Ultra-0,5® con un tamaño de exclusión de 10 kDa, hasta 3 kDa, con veneno total.....	52
Tabla 4. Fracciones obtenidas de la purificación por el método C de HPLC-RP C18 del Veneno total de <i>T. macrochirus</i>. A cada una de las fracciones se determinó su concentración, cantidad de proteína y masa molecular. Se resalta la fracción 48 por su pureza, cantidad de proteína obtenida y masa molecular estimada.....	56
Tabla 5. Fracciones de péptidos obtenidas por re-purificación en RP-HPLC. Se muestra la masa molecular de los péptidos presentes en las fracciones obtenidas de la re purificación de cada fracción.	57
Tabla 6. Fracciones obtenidas por filtración en gel, empleando un soporte de Sephacryl S-100HR.....	60
Tabla 7. Fracciones obtenidas al realizar cromatografía de intercambio catiónico (CIC).	62
Tabla 8. Fracciones obtenidas al realizar cromatografía de intercambio catiónico (CIC) (continuación).	63
Tabla 9. Purificación de las fracciones obtenidas por Filtración en Gel de Sephadex-(S-100) e intercambio catiónico (CIC-CM-Celulosa). Se muestra cada una de las fracciones con la cantidad de proteína analizada y las fracciones obtenidas en la purificación por RP-HPLC.	64
Tabla 10. Purificación de las fracciones obtenidas por Filtración en Gel de Sephadex-(S-100) e intercambio catiónico (CIC-CM-Celulosa) Se muestra cada una de las fracciones con la cantidad de proteína analizada y las fracciones obtenidas en la purificación por RP-HPLC.....	65
Tabla 11. Fracciones de péptidos obtenidas por el procedimiento 4. Se detalla cada una de las fracciones purificadas y parcialmente purificadas con el valor de masa.	67
Tabla 12. Fracciones de péptidos puros obtenidas por los procedimientos de purificación. Se detalla cada una de las fracciones purificadas, el método de obtención y el valor de masa determinado.	69

Tabla 13. Fracciones de péptidos con la secuencia de amino terminal determinada. Se detalla cada una de las fracciones purificadas con la información de su secuencia de aminoácidos.....	75
Tabla 14. Secuencias de proteínas y péptidos obtenidas por medio de electroforesis bidimensional del veneno total de <i>T. macrochirus</i> y sus proteínas semejantes.	77
Tabla 15. Curva de calibración de ácido hialurónico. Empleado para el método de actividad de Hialuronidasa. *Corresponde a la muestra de veneno o de la fracción evaluada. El volumen usado depende de la concentración de la muestra evaluada.	93
Tabla 16. Toxicidad del veneno de <i>T. macrochirus</i>, y sus fracciones de péptidos puros y parcialmente purificados, en mamíferos e insectos.	100
Tabla 17. Actividad de proteasa del veneno total de <i>T. macrochirus</i>, empleando como sustrato azocaseína.	104
Tabla 18. Datos de absorbancia y cálculo de la actividad de Hialuronidasa del veneno de <i>T. macrochirus</i> y las fracciones I a IV.	106
Tabla 19. Porcentaje de identidad del péptido FV2-16.	123
Tabla 20. Resultados del alineamiento del amino terminal del péptido Tmac48, por medio de Blastp.	124
Tabla 21. Tipos de péptidos y porcentaje de identidad de los amino terminales purificados del veneno de <i>T. macrochirus</i>.	125
Tabla 22. Secuencias de amino terminales de los péptidos purificados del veneno de <i>T. macrochirus</i> y cálculo de aminoácidos faltantes en cada una de las secuencias.	126

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Relación para obtener la cantidad de residuos de cisteína en la secuencia de aminoácidos	47
Ecuación 2. Determinación del porcentaje de actividad de la Hialuronidasa.	94

Lista de Diagramas

Diagrama 1. Procedimiento de la Ultrafiltración del veneno total de <i>T. macrochirus</i>, por el sistema de Amicon® Ultra0.5.	41
Diagrama 2. Procedimiento 1 para la purificación de péptidos presentes en el veneno de <i>T. macrochirus</i>.....	43
Diagrama 3. . Ultrafiltración del veneno total de <i>T. macrochirus</i>	44
Diagrama 4. Purificación de péptidos presentes en el veneno total de <i>T. macrochirus</i>.	45
Diagrama 5. Purificación de péptidos presentes en el veneno total de <i>T. macrochirus</i>.	46

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
°C	Temperatura	°C	$^{\circ}C = ^{\circ}K - 273$
Da	Masa	Da	$1,66 \times 10^{-27}$ Kg
Km	Longitud	Km	10^3
M	Concentración	mM	10^{-3}
M	Longitud	cm	10^{-2}
Mg	Masa	mg	10^{-3}
Min	Tiempo	min	60min = 1Hora
mL	Volumen	mL	10^{-3}
Nm	Longitud	nm	10^{-9}
pH	Ácido-base	pH	$pH = -\log[H]$
pI	Ácido-base	pI	$pI = \frac{pK_a + pK_b}{2}$
Ppm	Concentración	ppm	$\mu\text{g/mL}$
Psi	Presión	psi	1Atmosfera = 14,7psi
UV	Radiación Ultravioleta	UV	4×10^{-7} a $1,5 \times 10^{-8}$ m
v/v	Volumen	mL	mL/mL

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
M	Masa	μg	10^{-6}

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
M	Volumen	μL	10^{-6}

Abreviaturas

Abreviatura	Término
%T	Concentración total de monómeros de acrilamida y Bisacrilamida
%C	Concentración del reticulador
α -NaScTx	Toxinas de canales de sodio tipo alfa
β -NaScTx	Toxinas de canales de sodio tipo beta
α -KTx,	Toxinas de canales de potasio tipo alfa
β -KTx	Toxinas de canales de potasio tipo beta
γ -KTx	Toxinas de canales de potasio tipo gamma
κ -KTx	Toxinas de canales de potasio tipo kappa
A.A	Aminoácidos
Asp-N	Endopeptidasa Aspartico-Amino
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CFG	Cromatografía filtración en Gel
ChTx	Charybtoxin
CID	Disociación por colisión inducida
CIC	Cromatografía de Intercambio Catiónico
CITx	Clorotoxina
CM	Carboxi-Metil
CS $\alpha\beta$	Cysteine Stabilized $\alpha\beta$
C-Terminal	Carboxilo- Terminal
Cys	Cisteína
DBPs	Péptidos con puentes disulfuro
DEAE	Dietilaminoetil

Abreviatura	Término
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
EMEM	Eagle's minimal essential medium
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas rápida
FI	Fracción I
FII	Fracción II
FIII	Fracción III
FIV	Fracción IV
FV	Fracción V
FVI	Fracción VI
HCD	Disociación por colisión con alta energía
hKv1.3	Canal de potasio dependiente de voltaje
IBTx	Iberotoxina
IpTxa	Imperatoxin A
KScTxs	Toxinas de canales de potasio
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida-Espectrometría de masas
Lys-C	Endoproteasa Lys-C
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTT	Tetrazolium
MV	Muestras de veneno
NaScTxs	Toxinas de canales de sodio
NDBPs	Péptidos sin puentes disulfuro
NL	No Lineal
PBS	Buffer de sales de fosfato
PLA ₂	Fosfolipasas de tipo A2
RA	Reducida y Alquilada
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Dodecil Sulfato Sodico

Abreviatura	Término
TEA	Tetraetilamonio
TFA	Ácido Trifluoroacético
Tmac48	Péptido <i>T. macrochirus</i> 48
UA	Unidades de Absorbancia

Introducción

Los escorpiones se caracterizan por ser animales invertebrados, pertenecientes al tipo Arthropoda, subtipo Chelicerata, clase Arácnida y orden Scorpionida; y se reconocen actualmente 20 familias, de las cuales en "Catalog of the scorpions of the world" (1), se aceptan 16 familias. Dentro de estas se destacan ocho, debido a su distribución a nivel mundial, estas son: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Chaerilidae, Diplocentfidae, Iuridae, Scorpionidae y Vaejovidae (2-9). En general los escorpiones son reconocidos por su antigüedad, al encontrarse en fósiles correspondientes al Silúrico y por sus particularidades morfológicas, biológicas y fisiológicas únicas dentro del Reino Animal, como la resistencia a alteraciones climáticas, radiaciones y las más llamativas que dependen de su morfología entre las que se encuentran las pinzas o quelas de sus pedipalpos y el telson. Este último se compone por una base bulbosa que contiene el veneno, las glándulas que lo producen y una afilada espina curva que sirve para inyectarlo a sus presas, ya así dominarlas o también como mecanismo de defensa (2-7, 10-13). Particularmente el veneno de escorpión se ha convertido en objeto de estudio en diferentes campos de investigación, para analizar sus componentes en detalle, no solo para la producción de sueros anti-escorpiónicos, sino para su utilización en diferentes campos como la medicina y el control de plagas de cultivos. Estas aplicaciones se basan principalmente en las toxinas o péptidos que se encuentran en el veneno, los cuales se pueden dividir en cuatro familias: -familia 1; péptidos que contienen de 60 a 70 residuos de aminoácidos, con cuatro puentes disulfuro y modifican la actividad de los canales de sodio (14); familia 2; péptidos de cadena larga con 60-64 residuos de aminoácidos y de cadena corta con 30-40 residuos de aminoácidos, estabilizadas con tres o cuatro puentes disulfuro, que

bloquean canales de potasio(15, 16); -familia 3; péptidos de aproximadamente 36 residuos de aminoácidos, con cuatro puentes disulfuro que pueden actuar sobre canales de cloro (17, 18); y -familia 4; se encuentran los péptidos que alteran funcionalmente los canales de calcio dependientes de rianodina (19). En general los diferentes péptidos reconocen canales iónicos y modifican la excitabilidad celular en mamíferos, crustáceos, arañas e insectos. Otros componentes que se encuentran en menor proporción son mucopolisacáridos, fosfolipasas, serotonina, histamina, enzimas inhibitorias, aminoácidos libres, sales orgánicas, lípidos y hialuronidasa (20-23).

Los venenos producidos por diferentes especies de escorpiones, pertenecientes a la familia Buthidae, en los últimos años se han reconocido por su capacidad de producir efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales, mecanismos atribuidos en gran medida a los péptidos o toxinas que se encuentran en esta sustancia; por ejemplo, algunos de los péptidos purificados y caracterizados del veneno de *T. serrulatus*, poseen efectos sobre líneas celulares proveniente de cáncer de mama, próstata, pulmón y glioblastosoma (24). En Colombia, se encuentra gran diversidad de especies del género *Tityus*, y con algunas de estas se han realizados ensayos preliminares para observar la composición peptídica y posibles funciones, por lo cual el principal objetivo de este trabajo fue la caracterización estructural y funcional de los péptidos que componen el veneno del escorpión *Tityus macrochirus*, una especie ubicada en los cerros orientales del departamento de Cundinamarca- Colombia, logrando determinar que posee 70 péptidos, con pesos moleculares de 3000 a 7800Da, y que tanto el veneno como los péptidos purificados poseen efectos citotóxicos sobre líneas celulares provenientes de tumores que tienen mayor incidencia en el mundo, como es el de mama, pulmón, cérvix, colon y próstata. Estos resultados demostraron diferentes efectos, que se encuentran relacionados con la posible actividad sobre canales iónicos, que realizan los péptidos del veneno de *T. macrochirus*, siendo los primeros estudios realizados sobre la estructura y función de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*.

Capítulo 1

1. Estado del arte

1.2. Características de los escorpiones

Los escorpiones, o alacranes como también se les conoce, son animales muy antiguos pues se ha calculado que existen en el planeta desde hace unos 500 millones de años, lo que ha mostrado su alta capacidad de desarrollar resistencia a alteraciones tanto climáticas como de radiaciones. Igualmente, por su poca dispersión y adaptabilidad a condiciones limitadas del medio ambiente, los escorpiones son catalogados como organismos indicadores de condiciones ecológicas y usados para estudios biogeográficos (2-5, 10, 13). Los escorpiones se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones faunísticas del planeta, pero la mayoría de las especies se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales, siendo posible hallarlos desde el nivel del mar hasta los 4.910 msnm, con mayor abundancia de especies entre los 0 y 2.000 msnm, en las zonas tropicales y subtropicales; sin embargo, se puede encontrar especies muy específicas capaces de aprovechar gran número de biotopos y otras que son exclusivas en ciertas vegetaciones y microhábitats (4, 5, 10, 25). Entre las particularidades históricas, biológicas y ecológicas destacables y únicas dentro del reino Animal, se encuentra la producción de veneno, la viviparidad y sus órganos sensoriales o peines en la región antero-ventral del abdomen (25). De acuerdo a su comportamiento se caracterizan por ser depredadores con hábitos nocturnos, y emplean las pinzas de los pedipalpos y el aguijón para inyectar el veneno producido en las glándulas del telson (figura 1), y así defenderse e

inmovilizar sus presas, las cuales son arañas, insectos o vertebrados como ranas y lagartijas (10-13).

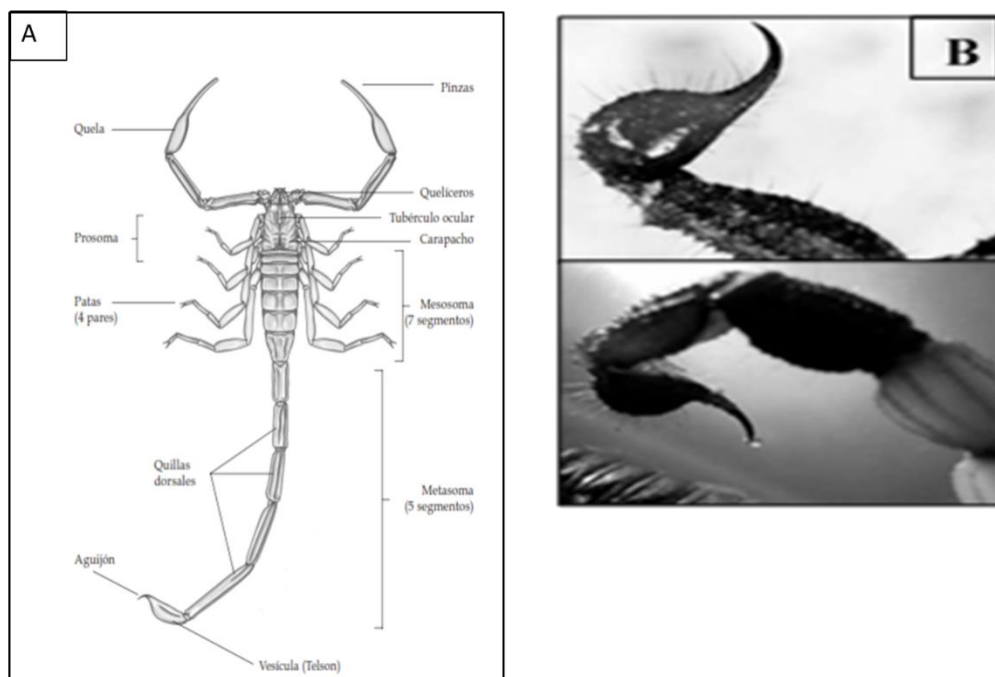


Figura 1. Anatomía de un escorpión.

A. Esquema general de la morfología del escorpión (26). **B.** Último segmento del Metasoma o telson donde se encuentra el aguijón y la glándula productora de veneno. (27)

Taxonómicamente los escorpiones se clasifican en: Reino: Animalia; Sub-Reino: Invertebrados; Tipo: Arthropoda; Subtipo: Chelicerata; Clase: Arachnida; Orden: Scorpionida. Se distinguen de 12 a 20 familias, aceptadas 16 (1), dentro de las cuales, se reportan la existencia de 2080 especies. (1, 28, 25, 29)

Dentro de las familias del orden Scorpionida, se destaca la familia Buthidae, por su diversificación, mayor distribución geográfica en el planeta y la única con especies que se consideran peligrosas para el ser humano. Dentro de estas se diferencian 73 géneros (incluyendo el género fósil *Palaeolychas*), 6 subgéneros, 529 especies y 165 subespecies (1, 13). En América se encuentra el género

Tityus siendo el más diverso con alrededor de 212 especies. En Colombia se registra la familia Buthidae, con 37 especies dentro de los géneros *Tityus*, *Centruroides*, *Anateris*, *Rhopalurus* y *Microtityus*, de las cuales 30 corresponden al género *Tityus* (figura 2), sin dejar de nombrar otras familias como Chactidae, Diplocentridae, Liochelidae y Troglotayosicidae. En total de las cinco familias reúnen representativas se reúnen 70 especies (tabla 1) (13, 30, 31).

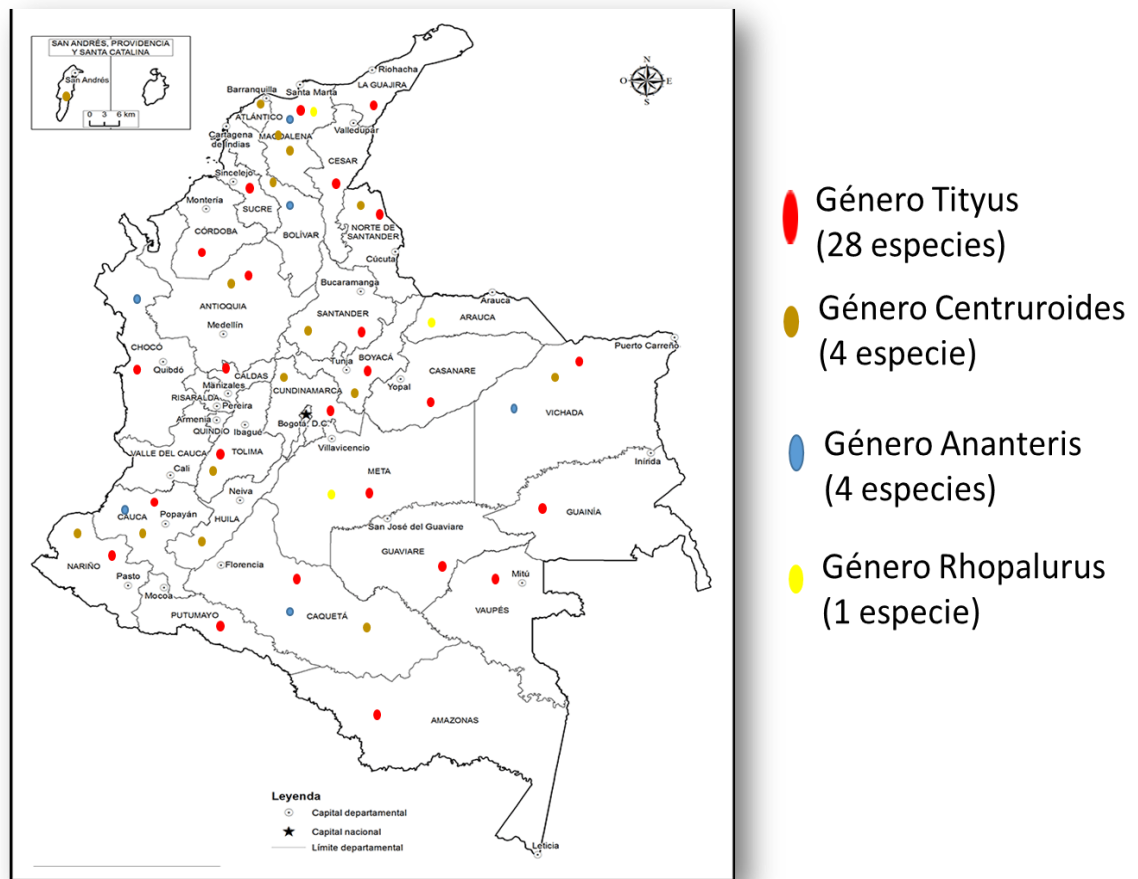


Figura 2. Distribución geográfica de los géneros representativos de la familia Buthidae en Colombia.

Se indica cada uno de los géneros clasificados en la familia Buthidae, que se encuentran en Colombia. (4-7, 13, 32).

Tabla 1. Escorpiofauna colombiana.

Resumen de la clasificación de las familias representativas en Colombia y las especies de cada una de éstas. (13).

FAMILIA	GENERO	ESPECIE
DIPLOCENTRIDAE	Tarsoporosus	<i>T. anchicaya</i> , <i>T. klugeri</i>
BUTHIDAE	Ananteris	<i>A. columbianus</i> , <i>A. ehrlichi</i> , <i>A. gorgonae</i>
	Centruroide	<i>C. gracilis</i> , <i>C. margaritatus</i>
	Rhopalurus	<i>R. laticauda</i>
	Microtityus	<i>M. bivictorum</i>
	Tityus	<i>T. antioquiensis</i> , <i>T. satenes</i> , <i>T. bastosi</i> , <i>T. atschii</i> , <i>T. blanci</i> , <i>T. colombianus</i> , <i>T. cuellari</i> , <i>T. fuhrmanni</i> , <i>T. sabineae</i> , <i>T. macrochirus</i> , <i>T. pachyurus</i> , <i>T. obscurus</i> , entre otros.
CHACTIDAE	Brotheas	<i>B. camposi</i>
	Chactas	<i>C. aequicnotiales</i> , <i>C. barravierai</i> , <i>C. brevicaudatus</i> , <i>C. brownelli</i> , <i>C. chrysopus</i> , <i>C. hauseri</i> , <i>C. Karschi</i> .

1.3. Veneno de escorpión

El veneno de los escorpiones es una secreción apocrina, de aspecto lechoso producida por un par de glándulas exocrinas, que se encuentran dentro del telson, el cual hace parte del metasoma del escorpión (Figura 1) (25, 33).

De acuerdo al nivel de toxicidad que logra desarrollar en mamíferos, crustáceos e insectos, el veneno se divide en dos grupos: 1. El que solo reacciona localmente, en el momento del emponzoñamiento y 2. El que puede interferir en el funcionamiento normal del individuo y puede llegar a ser letal. Estos mecanismos están relacionados y dependen de la cantidad de veneno emponzoñado, así

como también son una pauta para la diferenciación de familias, géneros y especies de acuerdo a su letalidad (34).

Bioquímicamente el veneno se caracteriza por tener un rango de pH 7 a 12, compuesto por proteínas, péptidos y otros compuestos como sales, aminoácidos, etc. La primera sustancia que produce el escorpión se denomina preveneno, el cual se trata de una pequeña cantidad de líquido transparente que se compone principalmente de sales de potasio y algunos péptidos capaces de reconocer canales de K^+ (35), si la producción del veneno continua se produce una sustancia lechosa, que en conjunto con el preveneno se denomina el veneno total y sus principales componentes son péptidos, de los cuales se han reportado cerca de 1510 secuencias de toxinas (36). En general su secuencia de aminoácidos, está compuesta desde 20 hasta 75 residuos, con un peso molecular inferior a 14 kDa (Figura 3) (37, 38, 39, 40). Se ha identificado que estos péptidos en su mayoría son capaces de reconocer canales iónicos y modificar la excitabilidad celular en mamíferos, crustáceos, arañas e insectos (41, 42). Igualmente se han encontrado proteínas con pesos moleculares entre 14 y 70 kDa, que principalmente corresponden a enzimas con una composición de entre 120 a 370 residuos de aminoácidos. A pesar de esta característica, en la mayoría de los venenos de escorpión se ha hallado un bajo nivel de actividad enzimática; sin embargo, en el veneno del escorpión *Heterometrus scaber*, se ha determinado actividad de fosfatasa ácida, ribonucleasa, 5'-nucleotidasa, hialuronidasa, acetilcolinesterasa y fosfolipasa (34, 43-47). También posee otros compuestos en menor proporción como, mucopolisacáridos, serotonina, histamina, aminoácidos libres, sales orgánicas, lípidos (9, 38, 48, 49).

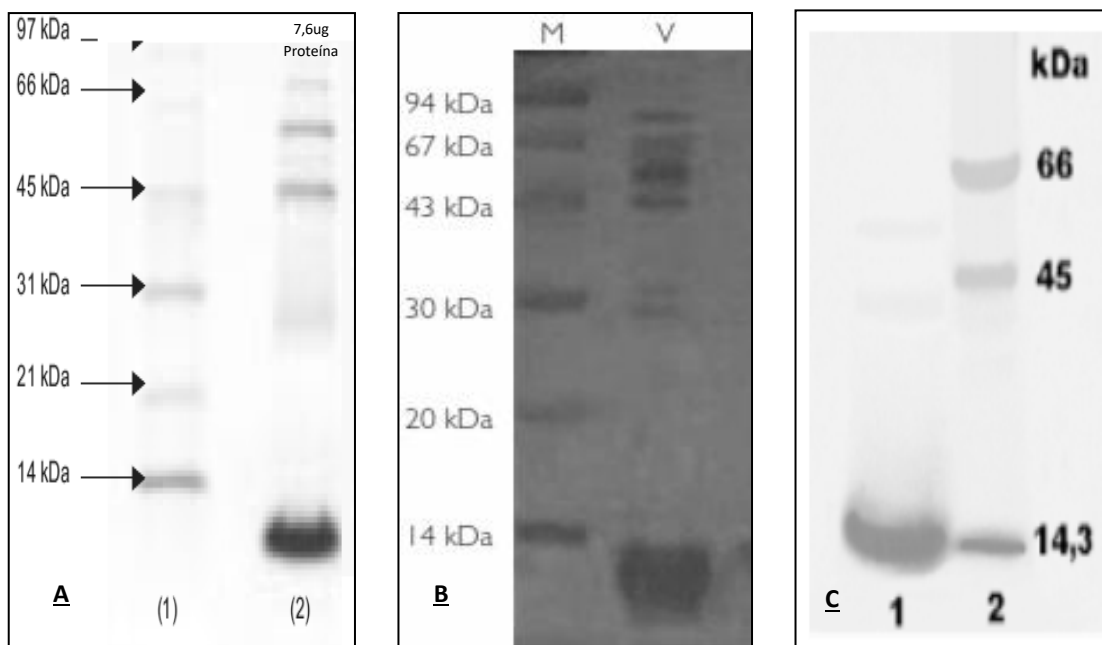


Figura 3. Perfil electroforético del veneno de diferentes especies de escorpión.

A. SDS-PAGE, en condiciones no reductoras. Gel al 15% de veneno total de *T. pachyurus*. **1.** Marcador de peso. **2.** Veneno total. (39). **B.** SDS-PAGE en condiciones denaturantes gel al 16% del veneno de *Rhopalurus junceus*. **M.** Marcador de peso. **V.** Veneno total (37). **C.** SDS-PAGE del veneno de *C. margaritatus*. **1.** veneno total, **2.** Marcador de peso (50).

1.3.1. Péptidos presentes en los venenos de escorpión

En el veneno de diferentes especies de escorpiones, se han reportado aproximadamente 1510 secuencias de aminoácidos, pertenecientes a péptidos aislados y parcialmente caracterizados (38, 51) y en el Programa de Anotaciones de Animales de UniProt (www.uniprot.org/program/Toxins), se han registraron aproximadamente 953 proteínas de venenos de escorpión las cuales 762 son toxinas (UniProt 2017, consultado mayo 20 de 2017). Las primeras teorías de su funcionalidad o efectos biológicos, se evidenciaron en ensayos electrofisiológicos en nodos de Ranvier de rana, concluyendo que los componentes peptídicos de

los venenos de escorpión actúan como neurotoxinas afectando la permeabilidad de los canales de Na^+ o K^+ . (52)

Durante varias décadas se han realizado estudios para lograr caracterizar estructural y funcionalmente los péptidos del veneno de escorpiones. Por ejemplo, en la toxina Noxiustoxina del veneno de escorpión *C. noxius Hoffmann*, caracterizada por ser capaz de bloquear los canales de K^+ , se encontró que se conformaba por 39 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 4.184kDa (23). De este mismo escorpión se ha identificado la toxina Cn2 que ha sido propuesta como un posible modelo para el desarrollo de un nuevo medicamento en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson al estimular el núcleo subtalámico (53). A partir del veneno de *Centruroides margaritatus* se identificaron péptidos capaces de unirse a canales de Na^+ , K^+ o Ca^{+2} , afectando el sistema nervioso de insectos, crustáceos y roedores (50). En cuanto al género *Tityus*, del *Tityus serrulatus* se identificó una mezcla de moléculas con actividad *in vivo*, también se caracterizó su toxina TsY, la cual posee 61 residuos de aminoácidos con cuatro puentes disulfuro (51, 54). En años más recientes se han logrado caracterizar otras toxinas de diferentes venenos de escorpiones del género *Tityus* como la reportada por (55), quienes purificaron parcialmente la toxina Ts19Frag-I del veneno de *T. serrulatus*, la toxina tiene 58 residuos de aminoácidos, un peso molecular de 6,575Da, alta especificidad por canales de potasio e induce la liberación de óxido nítrico (NO) en macrófagos, incrementando la producción de interleuquina-6 (IL-6), por lo anterior se ha postulado como un agente con actividad pro-inflamatoria (55).

En los estudios realizados sobre los péptidos de los venenos de escorpión, se diferencian dos grupos de acuerdo al número de residuos de aminoácidos: -los de cadena corta de 20-43 residuos de aminoácidos, capaces de reconocer canales de K^+ (38); y los péptidos de cadena larga con 58 a 76 residuos de aminoácidos, específicos para canales de Na^+ (38). En general, la clasificación de las toxinas del veneno de escorpión se debe a cuatro criterios (34, 38, 39, 56-60)

- el tipo de canal que reconoce ya sea sodio, potasio, calcio o cloro;
- el tipo de receptor al que la toxina se enlaza;

- la estructura tridimensional del péptido
- el tipo de respuesta que induce (activación o inactivación del receptor)

El tipo de aminoácidos que poseen los péptidos en su gran mayoría son aminoácidos básicos, y varios residuos de cisteína (Cys), los cuales le ayudan a la estabilidad de su estructura ya sea formando tres o cuatro puentes disulfuro, encontrándose comúnmente en un motivo estructural denominado CS $\alpha\beta$ (Cysteine Stabilized $\alpha\beta$), el cual se ubica en el pliegue de una hélice alfa Cys_i--Cys_{i+4}, ó en una hoja plegada beta Cys_j—Cys_{j+2} (38, 61, 62). Esta característica estructural dio paso a una nueva clasificación de los péptidos del veneno de escorpión, identificando péptidos que poseen puentes disulfuro (DBPs) y los que no poseen puentes disulfuro (NDBPs). Respecto a los DBPs se ha identificado que son los más abundantes, caracterizados por ser los responsables de los efectos neurotóxicos desarrollados por el emponzoñamiento del escorpión, ya que afectan la función de los canales iónicos en células excitables y no excitables. Al mismo tiempo, estos se clasifican en; las específicas para canales de Na⁺ (NaScTxS) y las específicas para canales de K⁺ (KTxS) (figura 4) (21, 38, 49, 57, 58). En cuanto a los NDBPs se ha encontrado que poseen diversas funciones biológicas, entre las que se destacan, que son potencializadores de bradiquidina, antimicrobianos, hemolíticos e inmunomoduladores (63).

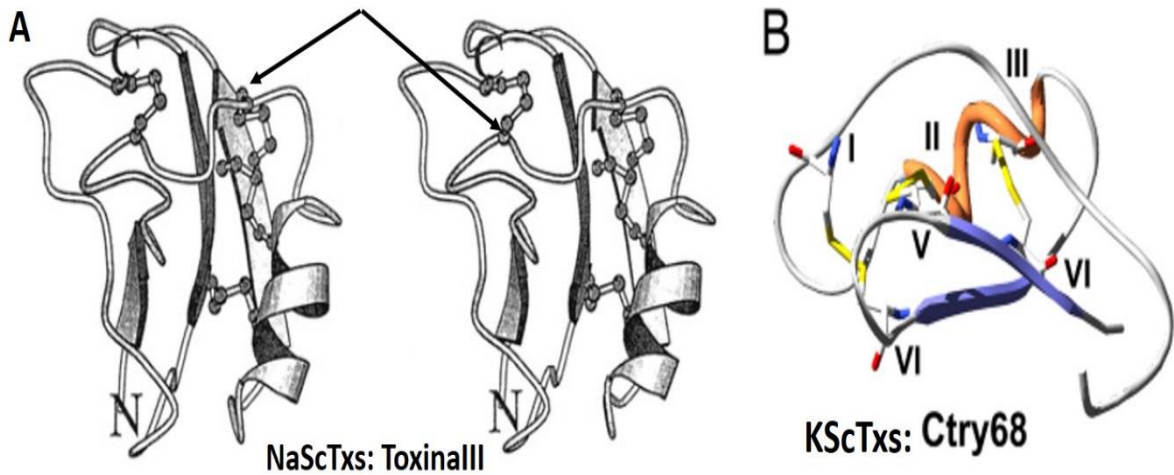


Figura 4. Estructuras tridimensionales de las clases de péptidos presentes en venenos de escorpión.

A. Estructura tridimensional de la Toxina III (NaScTx), del escorpión *Leiurus quinquestriatus quinquesriatus*, las flechas indican uno de los cuatro puentes disulfuro formados por los residuos de cisteína (64). **B.** Estructura tridimensional de la toxina Ctry68 (KScTx), los números I, II, III, V, VI y VI, representan los residuos de aminoácidos de Cisteína y los puentes disulfuro de la toxina Ctry68 del veneno de *Chaerilus tricostatus* (65).

1.3.1.1. Toxinas NaScTx:

Se encuentran conformadas por 55 a 76 residuos de aminoácidos y estabilizadas por tres o cuatro puentes disulfuro. Poseen una región conservada en su estructura tridimensional con topología de $\beta\alpha\beta$ (figuras 4-A y 5) (9, 39, 66, 67) y son clasificadas en dos grupos, las toxinas α -NaScTx y las toxinas β -NaScTx, que básicamente se diferencian por el sitio de unión al canal de Na^+ . Las α -NaScTx disminuyen o inhiben la activación de los canales de Na^+ prolongando el potencial de acción por su unión al sitio 3 del receptor de los canales de Na^+ . (68). Este tipo de toxinas a su vez se subdividen en tres grupos: las “alfa-clásica” produce citotoxicidad en mamíferos; las “anti-insectos α -NaScTx” con gran especificidad a los canales de Na^+ de insectos y las “ α -similares”, que actúan sobre canales de Na^+ , tanto de insectos como de mamíferos (8, 67, 69).

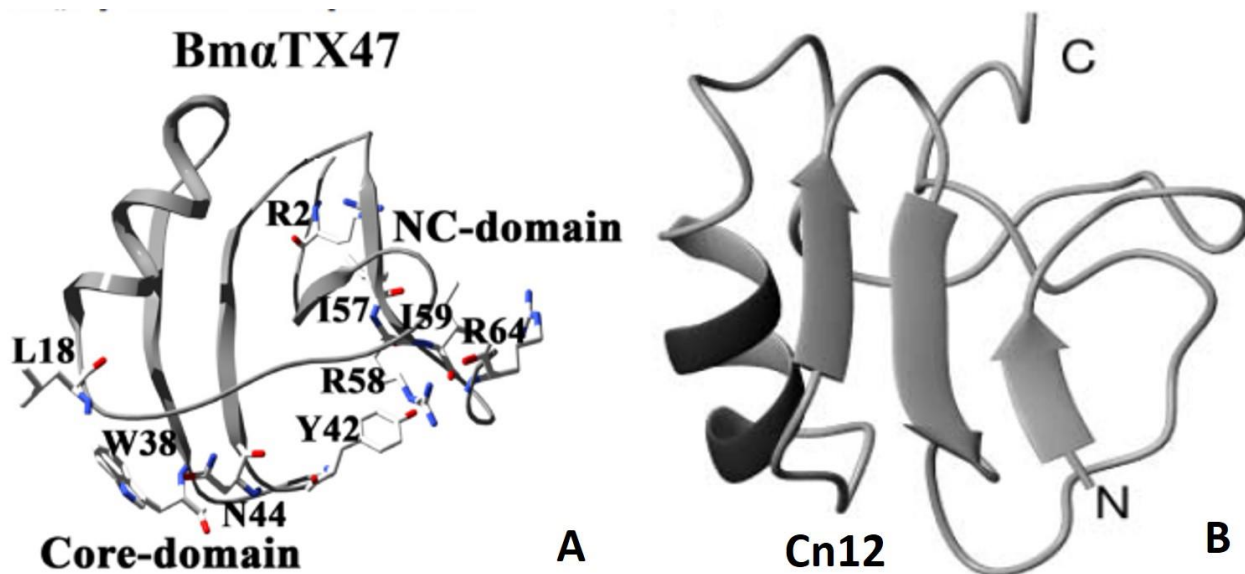


Figura 5. Estructuras representativas de α -Toxinas y β - Toxina de escorpión.

A: α -toxina similar BmTX47 de *B. martensii* (70). **B.** β -toxina Cn12 de *C. noxius*, el espiral indica hélices alfa y las flechas hojas plegadas beta (71).

En cuanto a las β -NaScTxs, estas toxinas se encuentran en los venenos de escorpiones del Norte y Sur América. Estos péptidos cambian la dependencia del voltaje para la activación y reducen la amplitud del pico de corriente al unirse al sitio 4 del receptor de los canales de Na^+ (69). Estas toxinas se subdividen en 4 grupos; las “ β -toxinas anti-mamíferos” con alta toxicidad en mamíferos; “anti-insectos” o toxinas excitatorias; “anti-insectos” o toxinas depresoras, que inducen parálisis flácida tras la inyección y toxinas “ β -similares” que activan los canales de Na^+ tanto en mamíferos como en insecto (figura 5) (21, 71-76).

1.3.1.2. Toxinas KScTxs:

Este tipo de toxinas ha sido una herramienta importante en el estudio de la función y estructura de los canales de K^+ (77). A partir de esta fecha y la publicación realizada por Tytgat (1999) (57), las toxinas KScTxs, se clasifican en tres grupos: α -KTx, β -KTx y γ -KTx. En general, estos tres grupos presentan toxinas conformadas por 23 a 64 residuos de aminoácidos, con tres o cuatro

puentes disulfuro y con la presencia del motivo estructural CS- $\alpha\beta$, (78, 58, 79). El grupo más abundante en los venenos de escorpión es el α -KTx, del cual se han identificado aproximadamente 250 péptidos que, en general, son capaces de bloquear o modificar la permeabilidad del ion K^+ , tanto en células excitables como en no excitables. Estas α -KTx están compuestas aproximadamente de 20 a 40 residuos de aminoácidos, con seis u ocho residuos de cisteína, siendo encontradas principalmente en venenos de escorpiones de la familia Buthidae (80-83). Respecto a las β -KTx, se han identificado 22 péptidos en veneno de escorpiones de la familia Buthidae, caracterizándose por poseer de 45 a 75 residuos de aminoácidos y seis residuos de cisteína en el C-Terminal, que estabilizan la estructura formando tres puentes disulfuro (80, 83, 84). Las γ -KTx, son similares a las α -KTx, están compuestas por 35 a 45 residuos de aminoácidos con tres o cuatro puentes disulfuro, se caracterizan por su actividad solo en canales de potasio tipo "Kv-Kv11", identificándose aproximadamente 29 péptidos hasta el momento, (58, 85-87). Algunos ejemplos, en general de este tipo de toxinas son Tc1 de *Tityus cambridgei* con 23 residuos de aminoácidos, siendo la más corta dentro de los péptidos KScTx's, mientras que la β KTx's, AaTXKb y BmTXKb2, son las más largas, con 64 residuos de aminoácidos (16, 79, 88).

Se han propuesto diferentes mecanismos de reconocimiento por parte de las toxinas a los canales de K^+ . Uno de estos es atribuido a la presencia de residuos de aminoácidos con anillo básico (89), enlazados o realizando la interacción en la superficie del canal de K^+ . Se propuso inicialmente que la presencia de los residuos de aminoácidos Lys28 y Tyr37, en el caso de la Noxiustoxin, eran los directamente responsables del reconocimiento y bloqueo de la actividad del canal de K^+ (90). Pero en estudios posteriores, lograron identificar en diferentes toxinas como la BeKm-1, BmP05 y BmTx3A, que la acción no se debe directamente a la presencia de estos dos residuos de aminoácidos, sino que ésta se encuentra más relacionada a los segmentos o motivos estructurales de α -hélice, presentes en cada toxina analizada (85, 91-93).

A partir de diferentes contribuciones en el estudio de la estructura primaria y terciaria y la identificación de los residuos de aminoácidos en posiciones específicas de las toxinas KScTxS, se han podido determinar las características de la unión y el reconocimiento a los diferentes subtipos de canales de K⁺. (Figura 6)

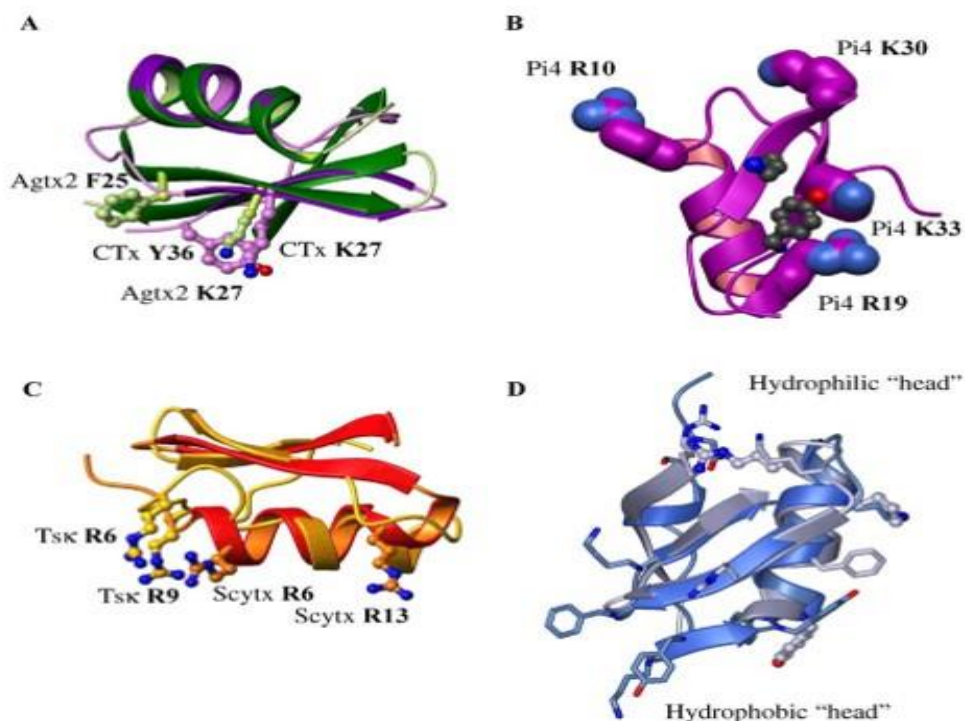


Figura 6. Epitopes funcionales de toxinas clasificadas como KScTxS.

Se muestran cada uno de los mecanismos propuestos para el reconocimiento y unión al canal de K⁺. **A.** En morado se representa la Charydotoxin con los residuos K21 y Y36, la estructura en verde corresponde a Agitoxin con los residuos de reconocimiento K27 y F25. **B.** Representación de los residuos básicos de Pi4, en violeta los residuos R10, R19, K30 y K33, y los residuos K26 y Y35 representados en bastones y esferas (94). **C.** En amarillo Residuos básicos R6 y R9 del motivo apamin-like, de K_{Ca}2.x, específico de la toxina Tsk y en rojo Scyallotoxin los residuos R6 y R13. **D.** Superposición de las toxinas CnERG1y y BeKm-1 (azul y gris respectivamente), en cada una se resaltan el radical de los aminoácidos implicados en la interacción con el canal (85, 95, 71).

1.4. Efectos de los venenos de escorpión y sus péptidos en el cáncer

La falta de selectividad hacia las células tumorales por parte de los tratamientos como la quimioterapia genera efectos secundarios por la selección no específica entre células sanas y tumorales, limitando su eficacia (96). Debido a esto, en diferentes investigaciones el objetivo principal es la búsqueda de compuestos más específicos y selectivos para el tratamiento del cáncer y otras patologías, a partir de compuestos de origen natural. Una fuente potencial de nuevos agentes farmacológicos es el veneno de animales y específicamente, el veneno de escorpión, debido a la diversidad de péptidos que se encuentran en esta sustancia, su afinidad, selectividad a canales iónicos y sus características estructurales. (97).

Respecto a venenos de escorpiones, algunos de ellos han mostrado citotoxicidad frente a líneas celulares provenientes de tumores, pero pocas toxinas aisladas se han estudiado para este fin. Sin embargo, teniendo en cuenta los efectos observados, se han propuesto tres tipos de efectos que realizan sobre estas líneas celulares:

- Bloqueo de un canal iónico específico (98), teniendo en cuenta que en las células tumorales el canal HERG está asociado con el ciclo celular y proliferación de células cancerosas.
- Invasión a la célula tumoral, al reconocer un sitio específico de la membrana plasmática diferente a un canal iónico, por ejemplo, al reconocer un tipo de metaloproteasa de la matriz extracelular de la célula tumoral (99),
- Activación de vías apoptóticas, por la expresión del ligando Fas, a partir de un mecanismo extrínseco de apoptosis (100).

Un ejemplo del efecto citotóxico generado por los venenos de escorpión es el observado por el veneno de *Odontobuthus doriae* sobre líneas tumorales MCF-7, después de 24 horas de exposición al veneno (101) (figura 7).

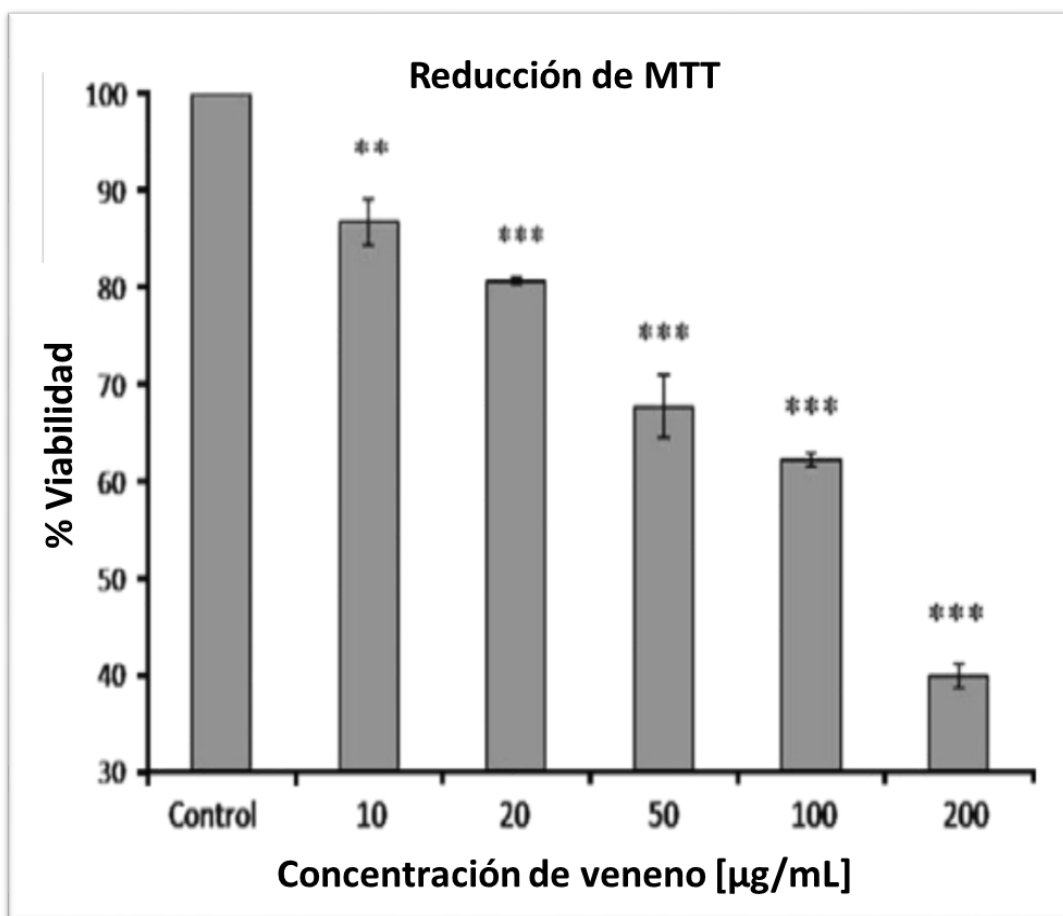


Figura 7. Efecto del veneno de *Odontobuthus doriae*, realiza efecto sobre líneas tumorales MCF-7.

Se muestra la disminución del porcentaje de viabilidad de las células de cáncer de seno, con respecto a la concentraciones de veneno empleadas y comparadas con el control (102).

Un ejemplo más cercano al género *Tityus*, es el efecto que tiene el veneno *C. tecomanus*, sobre las líneas de linfoma de ratón (L5178Y/Tk±3.7.2), con el que se logra disminuir el porcentaje de viabilidad de las mismas hasta un 20% con una concentración del veneno de 100 µg/mL (figura 8), (103).

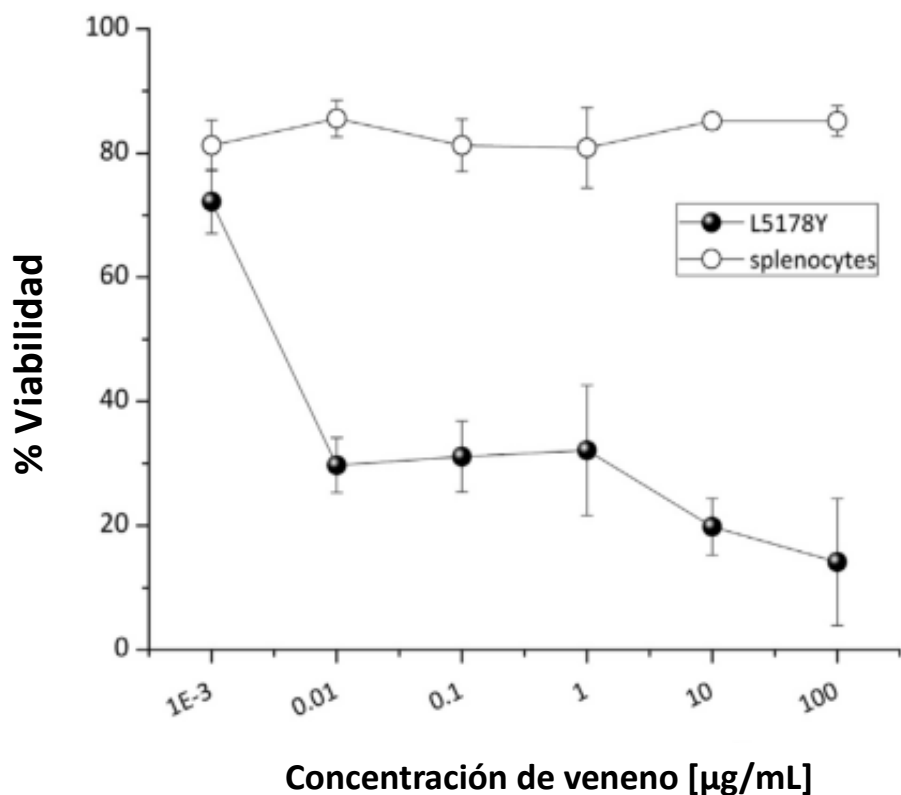


Figura 8. Efecto Citotóxico del veneno de *C. tecomanus*.

Evaluación de la actividad citotóxica del veneno total de *C. tecomanus*, en líneas celulares linfoma de ratón (L5178Y/Tk \pm 3.7.2), usando como control células esplenocitos de ratón (103).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del veneno de *C. tecomanus*, en la línea de linfoma de ratón (L5178Y/Tk \pm 3.7.2), los autores realizaron ensayos de citotoxicidad, pero en este caso empleando fracciones parcialmente purificadas de péptidos del veneno *C. tecomanus* en la línea celular Jurkat E6-1 (linfoma humano), observando que algunas fracciones logran disminuir el porcentaje de viabilidad entre 20% y 80%, dependiendo de la concentración de la fracción evaluada (103) (Figura 9).

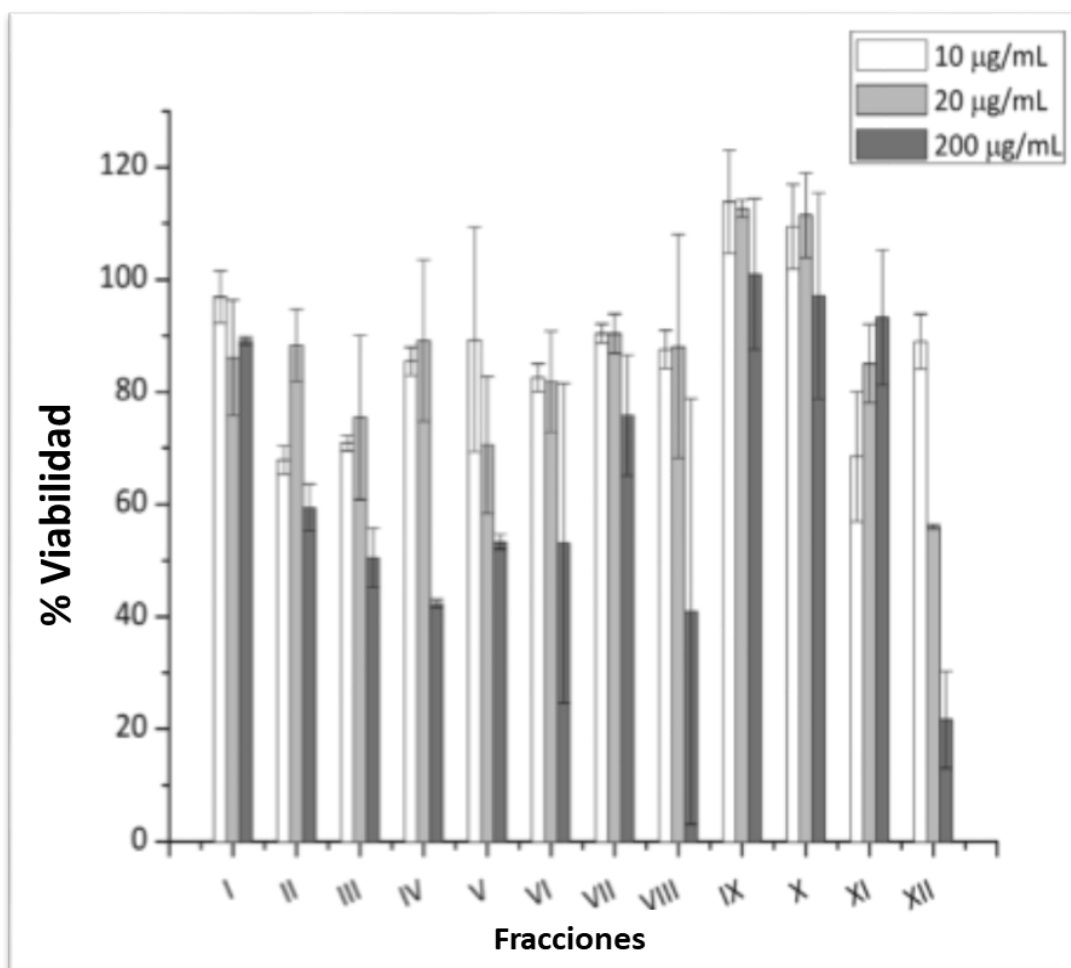


Figura 9. Citotoxicidad de las fracciones parcialmente purificadas de péptidos a partir del veneno de *C. tecomanus*.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron sobre la línea celular Jurkat E6-1 (linfoma humano) (103)

Una de las toxinas más estudiadas para su aplicación en tratamientos de cáncer es la Clorotoxina (ClTx), del veneno de *L. quinquestratus*, dado a que se ha demostrado la inhibición de la proliferación celular por la disminución de la angiogénesis y disminución en la conductancia del canal de cloruro⁻ (104). Esta toxina es capaz de bloquear el desplazamiento de las células de glioma, inhibir la metástasis de las células tumorales de seno así como inhibir la migración e

invasión de células cancerosas de páncreas (PANC-1), al activar la metaloproteasa-2 de la matriz extracelular (105-107)

Otras toxinas capaces de reconocer canales iónicos y de las cuales también se ha identificado su actividad sobre células tumorales, son:

- La toxina Margatoxin (MgTx), del veneno de *C. margaritatus*, que bloquea canales de potasio e inhibe la proliferación celular de adenocarcinoma de pulmón humano, además que disminuye el volumen del tumor inducido en ratones (108).
- La Iberotoxina (IBTx) y Charybtoxin (ChTx) que bloquean los canales BKca e inhiben la proliferación y migración de células de glioma y melanoma respectivamente (109, 110).
- La Bengalin, purificada del veneno de *Heterometrus bengalensis*, disminuye la proliferación celular e induce la apoptosis de líneas celulares de leucemia, dado a que activa caspasas (9 y 3), e induce el clivaje de la poli (ADP-Ribosa) polimerasa (PARP). (111, 100).
- La Iberotoxina (IBTx), un péptido de 37 residuos de aminoácidos, purificado del veneno de *Mesobuthus tamulus*, que reconoce los canales BKca, también logra inhibir el crecimiento de células cancerosas de próstata (PC3) (112).

1.5. Hipótesis

En el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* se hallan péptidos que presentan similitud estructural y con posibles efectos citotóxicos sobre líneas celulares provenientes de tumores, similar a lo reportado previamente en venenos de escorpiones de otras especies del mismo género.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente el o los péptido(s) presente(s) en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) con mayor actividad citotóxica en líneas celulares.

1.7. Objetivos Específicos

- Purificar los péptidos presente en el veneno del escorpión *T. macrochirus* (Buthidae).
- Evaluar la actividad citotóxica de los péptidos del veneno del escorpión *T. macrochirus*, frente a líneas celulares tumorales.
- Determinar la estructura primaria de al menos un péptido con actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales.

Capítulo 2

2. Recolección de individuos del escorpión *Tityus macrochirus*, obtención y caracterización inicial de su veneno

2.1. El Escorpión *Tityus macrochirus*

En Colombia se encuentra gran distribución de géneros de escorpiones, cuyo número de especies descritas, supera las registradas en Brasil, Argentina, Guayana y Ecuador (113, 1, 114, 115). Entre los géneros presentes en nuestro país se encuentra el género *Tityus* Koch, 1836, perteneciente a la familia Buthidae que tiene importancia epidemiológica, debido a la toxicidad que desarrolla en humanos por el efecto de los componentes del veneno al emponzoñarlo.

A partir de estudios realizados sobre la morfométrica de las especies de escorpiones del género *Tityus*, se han identificado de 13 a 16 especies presentes en Colombia (115). Además, de acuerdo con los caracteres morfológicos, este género se divide en dos grupos, “*asthenes*” y “*forcípula*”. En este último grupo se encuentra clasificada la especie *Tityus macrochirus* (Figura 10).



Filo: Arthropoda
Subfilo: Chelicerata
Clase : Arachnida
Orden: Scorpionida
Familia: Buthidae
Genero: *Tityus*
Especie: *Tityus macrochirus*

Figura 10. Individuo macho de *Tityus macrochirus*.

Se señala la clasificación taxonómica (25, 115, 116)(Foto: David A. Hernández-Mora Bogotá D.C. Colombia).

2.2. Características morfológicas de *Tityus macrochirus*.

El escorpión *Tityus macrochirus* se encuentra distribuido entre 1900-2500 m de altitud, principalmente en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, - Colombia. *T. macrochirus*, se diferencia de las demás especies que conforman el grupo "*forcípula*", por poseer mayor cantidad de dientes pectíneos, en el lado izquierdo 15 y el derecho 18, para hembra respectivamente y 18 en izquierdo y en 15 derecho para machos. En el pedipalpo derecho el número de filas de dentículos difiere en cantidad y tamaño, siendo más ancho, especialmente en los machos con un valor de 4,04 mm con respecto a otras especies, además que es el único que presenta en la parte dorsal del metasoma numerosas macrosetas (115) (figura 11).



Figura 11. Principales características morfológicas de *Tityus macrochirus* (macho).
A. Vista ventral, **B.** Vista dorsal. **C.** Caparazón vista dorsal. **D.** Peines, **E.** Metasoma vista dorsal del segmento IV, **F.** Metasoma vista dorsal del segmento V, **G.** Telson vista lateral. (115)

En general para los escorpiones, el metasoma se divide en cinco segmentos, donde se encuentra el telson que posee un par de glándulas apocrinas que producen el veneno y termina en una espina hueca a través de la cual el escorpión expulsa el veneno, la ponzoña. Las características morfológicas de esta estructura son similares a las demás especies de la familia Buthidae (figura 12).

En general para los escorpiones, el metasoma se divide en cinco segmentos, donde se encuentra el telson que posee un par de glándulas apocrinas que producen el veneno y termina en una espina hueca a través de la cual el escorpión expulsa el veneno, la ponzoña. Las características morfológicas de

esta estructura son similares a las demás especies de la familia Buthidae (figura 12).

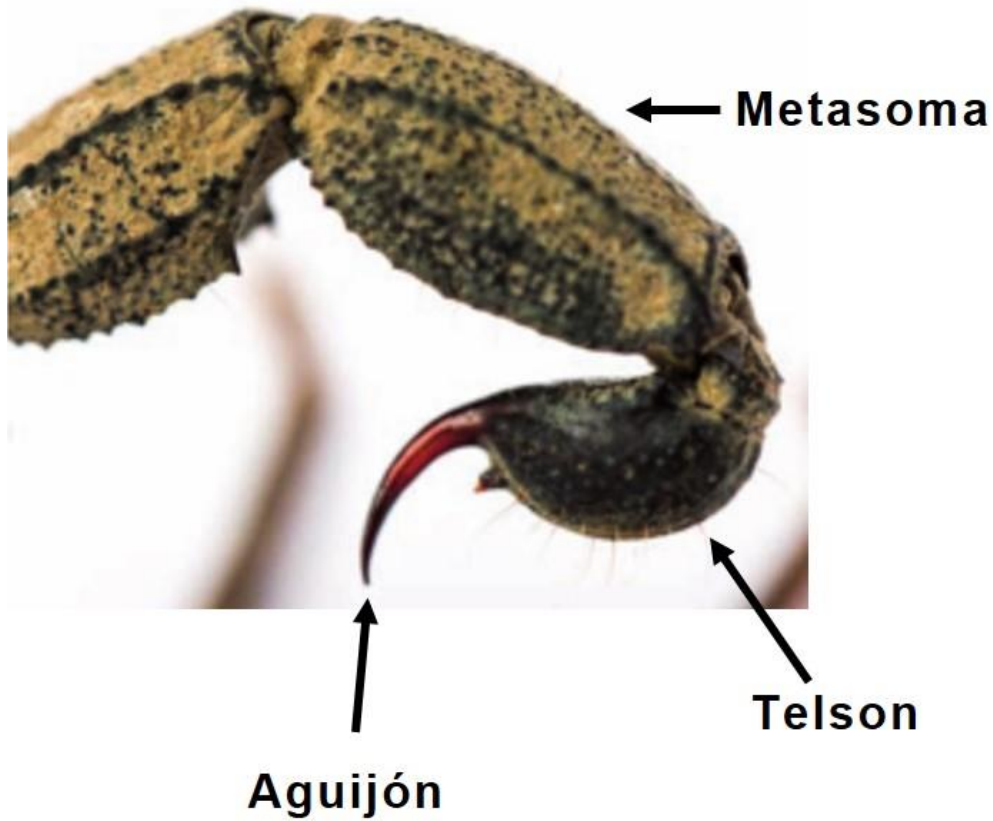


Figura 12. Telson de *Tityus macrochirus*.

Se observa los dos últimos segmentos del metasoma, el telson y el aguijón, morfología característica de la familia Buthidae. (116); (Foto: David A. Hernández-Mora Bogotá D.C. Colombia).

2.3. Desarrollo metodológico

2.3.1. Recolección de individuos *Tityus macrochirus*

Se recolectaron individuos de la especie *Tityus macrochirus*, en los municipios de: Fosca (Vereda placitas) [4°19'04.3"N 73°59'15.2"W], altitud 2080 msnm, provincia de Oriente, a 78.1 Km de distancia de Bogotá, Cundinamarca-Colombia. y Choachí [4°32'00"N 73°56'00"], altitud 1924 msnm, provincia de oriente y a 53.7 Km de distancia de Bogotá, Cundinamarca-Colombia. Los individuos se hallaron dentro y alrededor de las casas de los habitantes de las veredas y pueblos. La búsqueda se realizó tanto en horas del día y de la noche con ayuda de lámparas ultravioleta (Figura 13).



Figura 13. Sitios de recolección de individuos *Tityus macrochirus*.

En cada una de las fotografías se muestran los sitios donde se hallaron los especímenes de *T. macrochirus*. (Foto: Grupo de Investigación en Proteínas)

El transporte de los individuos recolectados se realizó en cajas de plástico, una por cada espécimen. De igual manera se mantuvieron en el laboratorio, garantizando humedad, temperatura, suministro de agua y de alimento, el cual se basó principalmente de arañas, grillos y larvas de tenebrios (117). La recolección de los individuos se realizó bajo el permiso Marco de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica no Comercial, del Decreto 1376 de 2013 por parte de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales –ANLA- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible –Republica de Colombia. El comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, avaló la realización del proyecto mediante el acta 06 del 22 de junio de 2015 en el que autoriza la recolecta de animales, su manejo en el laboratorio y extracción del veneno, así como el manejo de líneas celulares en sistema de Bioseguridad nivel II.

2.3.2. Obtención y preparación del veneno

La obtención del veneno se realizó por estimulación eléctrica, empleando un voltaje entre 10 a 20 voltios, sobre el telson y el quinto segmento del metasoma, en un tiempo no mayor a 10 segundos (Figura 14). Cada extracción de veneno, se repitió cada 15 o 20 días al mismo individuo. (118)

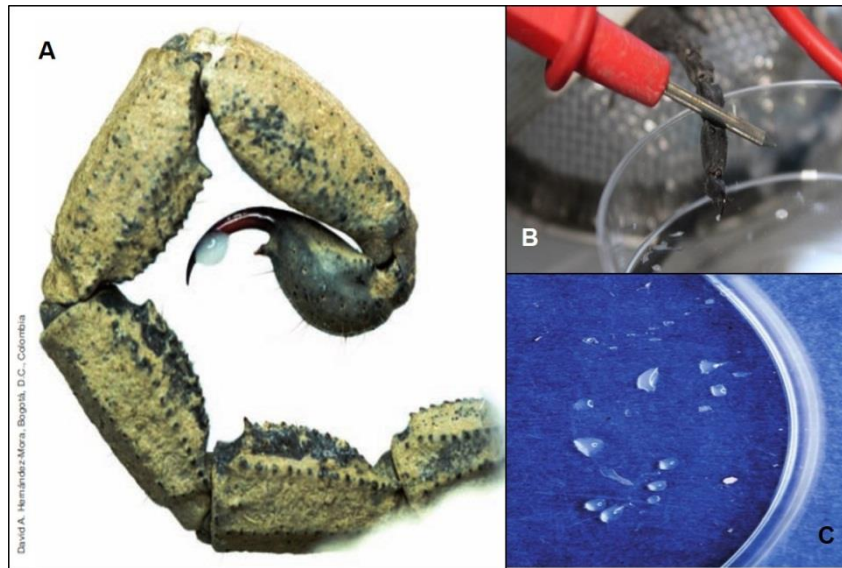


Figura 14. Obtención del veneno del escorpión *T. macrochirus*, por estimulación eléctrica.

A. Gota de veneno producida por el escorpión (116); (Foto: David A. Hernández-Mora Bogotá D.C. Colombia). **B.** Estimulación realizada en el último segmento del metasoma por impulsos eléctricos (Foto: Grupo de investigación en proteínas (GRIP)). **C.** Gotas de veneno obtenidas después del estímulo eléctrico a *T. macrochirus*, recuperadas en caja de Petri estéril (116); (Foto: David A. Hernández-Mora Bogotá D.C. Colombia).

Las muestras de veneno obtenidas en cada extracción fueron diluidas en agua desionizada, en una proporción de 1/5 (veneno-agua) y se centrifugaron a 14000 rpm por 30 minutos, separando el sobrenadante del pellet. El sobrenadante se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su uso. En el momento de analizar el veneno, los sobrenadantes liofilizados se resuspendieron en 200 μL de agua grado HPLC.

2.3.3. Cuantificación de proteína total presente en el veneno de *T. macrochirus*.

La concentración de proteína soluble total del veneno del escorpión *T. macrochirus*, se determinó por tres métodos diferentes:

- **Método de Ácido Bicinonínico (BCA):** Como patrón se empleó albumina sérica bovina, con diluciones en serie, partiendo de una concentración inicial de 1,0 mg/mL, sembradas en microplacas de acuerdo al procedimiento estandarizado por (119) y adaptado por el laboratorio del Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP).
- **Método Absorción Espectrofotometría a 280nm** (54): Se determinó la absorbancia de la muestra de veneno a 280 nm, y la concentración de proteína total se determinó asumiendo que 1 unidad de Absorbancia, es igual a 1mg/mL.
- **Método Absorción Espectrofotometría a 260-280nm** (120): Se determinó la absorbancia de la muestra de veneno a dos longitudes de onda de 260 nm y 280 nm y se determinó la concentración de proteína en mg/mL por el factor: $\text{mg/mL} = (1,55 \cdot \text{Abs}_{280\text{nm}}) - (0,76 \cdot \text{Abs}_{260\text{nm}})$

2.3.4. Análisis e identificación del perfil proteico del veneno total de *T. macrochirus*

- **Electroforesis SDS-PAGE:**

Este método se realizó con el veneno total, en condiciones denaturantes, sobre geles de Tris-Tricina con una concentración de 15%T y 3%C, en condiciones denaturantes (121), Anexo A 1.1.) Las muestras de veneno también se analizaron

por SDS-PAGE-Tris-Glicina con una solución de Acrilamida al 30%, en tres concentraciones diferentes 7,5%, T10%T y 16%T y un gel de concentración al 4%, en condiciones denaturantes (122), Anexo A 1.2). Los geles obtenidos se fijaron con ácido acético 10% durante 30 minutos, se tiñeron con coomassie blue G-250 (123) y por tinción de plata (124). Una vez teñidos los geles se analizaron por medio del programa Quantity One 4.6.7 de Bio-Rad e Image Lab 5.2.1 de Bio-Rad.

- **Electroforesis Bidimensional:**

Esta metodología se realizó con el veneno total, con base a la metodología descrita en el kit 2D de GE-Healthcare® (125), empleando tiras no lineal IpG de 11cm pH: 3-10NL, usándose dos cantidades diferentes de proteína total del veneno de *T. macrochirus*, 120 µg y finalmente una de 150 µg de proteína total. Cada una de las muestras de veneno se secaron en Savant Speed Vac SC210A y se resuspendieron en 200 µL de buffer de rehidratación que contenía 50 mM de DTT más 1 µL de anfolito. Estas soluciones se emplearon para rehidratar cada una de las tiras IpG por 14 horas a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de rehidratación, cada una de las tiras se transfirió al equipo GE-Healthcare®, para realizar la primera dimensión empleando el programa para tiras de pH 3.10NL, por un total de cinco horas aproximadamente. Para la segunda dimensión cada una de las tiras se transfirieron en un gel de SDS-Page-Tris-Glicina al 12% de Acrilamida-Bisacrilamida (Anexo A 1.2.) (122), iniciando con un voltaje de corrida de 50 volt/h hasta 100 volt/h por 5 horas para las tiras que se rehidrataron con 120 µg de proteína total y por 7 horas para la que contenía 150µg de proteína total del veneno de *T. macrochirus*. Una vez terminada la segunda dimensión, a cada uno de los geles se les realizó tinción con azul de coomasie G-250 al 0,1%.

2.4. Resultados

2.4.1. Obtención del veneno y cuantificación de proteína total.

En total se recolectaron 50 individuos de la especie *T. macrochirus*, en los sitios descritos y la especie se confirmó por las características morfológicas de estos individuos, realizadas por el profesor Eduardo Flórez del Grupo de Aracnología del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional, tomando como base lo descrito por Bohórquez-Gómez 2016 (115).

Durante el mantenimiento de cada uno de los individuos de escorpiones se realizaron en promedio 44 extracciones de veneno. Las primeras 18 extracciones se reunieron en tres grupos denominados Muestra de Veneno 1, 2 y 3 (MV1, MV2, MV3). A estas muestras de veneno se les determinó la concentración de proteína soluble, por medio de los tres métodos de cuantificación descritos en la metodología y los datos generales se encuentran en el Anexo B.

De acuerdo con el análisis estadístico, de la medida de precisión con un valor de $P_r (>F)$ de 0.73 y el análisis anava (análisis de varianza por R-Fiddle) con un valor de $p=<0,5$. Datos que comprueban que son métodos relacionados y que la diferencia de los valores de concentración determinados no es significativa, sin embargo si se comparan los datos de concentración, obtenidos en cada una de las muestras se logra observar que el método de absorción por UV (120), es el que presenta mayor relación entre los valores de concentración de proteína soluble total determinados (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación de proteína total presente en tres muestras de veneno de *T. macrochirus*. La concentración de proteína se determinó por medio de métodos colorimétricos y de absorción.

Método de Cuantificación	Concentración de proteína mg/mL		
	MV1	MV2	MV3
BCA*	2,36	1,18	2,43
UV1**	1,89	1,79	1,77
UV2***	1,55	1,00	2,32

*Método colorimétrico (119); **Método de absorción UV (120); ***Método de absorción UV (54).

Teniendo en cuenta la correlación obtenida en la cuantificación de proteína determinada por los tres métodos, se seleccionaron los métodos de absorción por UV para determinar la concentración de proteína de las demás muestras de veneno obtenidas, como también de las fracciones de péptidos parcial y totalmente purificados obtenidas con el desarrollo de posteriores métodos.

De las 44 extracciones de veneno realizadas, en total se obtuvo una concentración de proteína soluble total en promedio de 5,52 mg/mL, que equivale a 55,22 mg de proteína total soluble. Cantidad que se empleó para el desarrollo de cada uno de los métodos planteados en el estudio bioquímico del veneno del escorpión *T. macrochirus*.

2.4.2. Identificación y estimación de pesos moleculares y punto isoeléctrico:

De acuerdo con la electroforesis SDS-PAGE realizada al veneno total de *T. macrochirus*, se identificó la presencia de proteínas con pesos moleculares desde 25 kDa hasta 130 kDa y péptidos con pesos moleculares alrededor entre 8 a 15 kDa. (Figura 15).

Al realizar la separación electroforética de los componentes de veneno de los individuos recolectados en los municipios de Fosca y Choachí, se evidencia similitud en los perfiles independientemente del método utilizado (121, 122) (figura 15). De acuerdo con el análisis realizado por los programas Quantity One 4.6.7 de Bio-Rad e Image Lab 5.2.1 de Bio-Rad, se logran observar pesos moleculares muy aproximados en cada una de las muestras, destacándose la presencia de péptidos con masa moleculares de 14, 13, 12, 11 y 10 kDa, como se señala en la figura 15. Como también las proteínas con pesos moleculares de 130, 100, 87, 67, 45 y 33 kDa (figura 15). Resultados que indican que la composición del veneno presenta los mismos componentes proteicos, a pesar de tener diferente distribución geográfica.

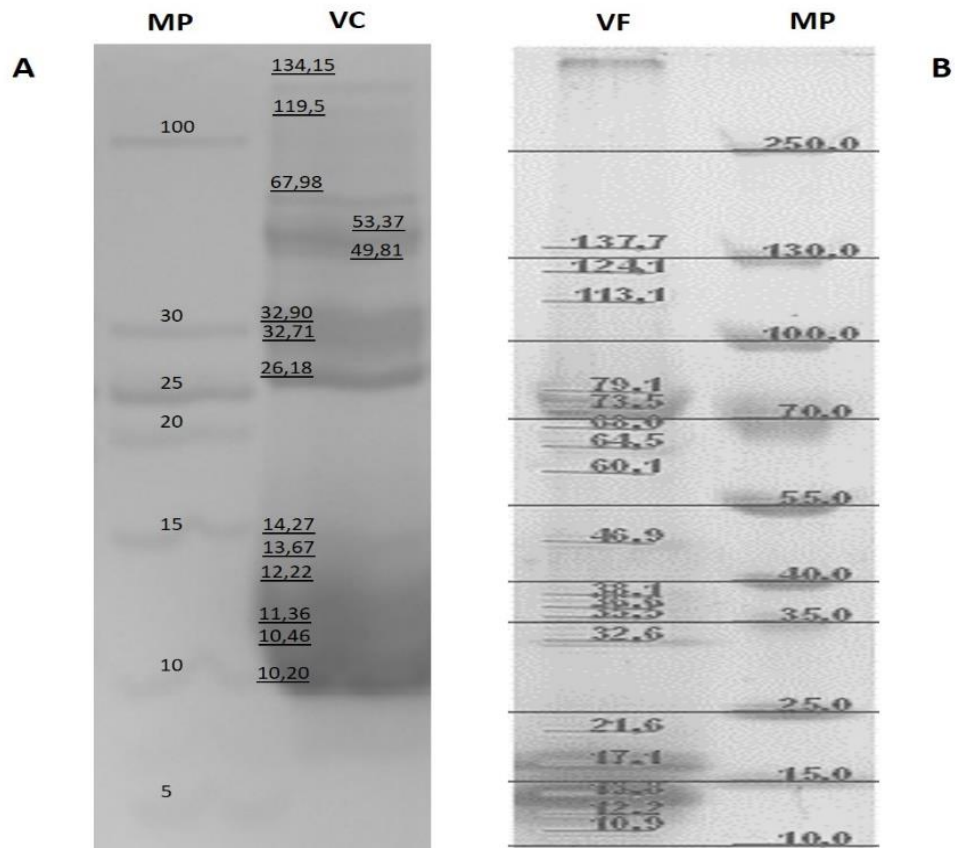


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE del veneno total de *T. macrochirus*.

A. SDS-PAGE-Tris-Tricina de muestras de veneno de las especies recolectadas en el municipio de Choachí. VC: 18,8 µg de proteína total del veneno; MP: 3 µL de marcador de peso molecular (Thermo Fisher®, bajo rango). **B.** SDS-PAGE-Tris-Glicina en gradiente del veneno total de *T. macrochirus*, de las especies recolectadas en el municipio de Fosca. MP: 5 µL de marcador de peso molecular (Thermo Fisher®, bajo rango), VF, 12.7µg de muestra de veneno total.

Respeto al perfil electroforético bidimensional, se evidencia la presencia de péptidos y proteínas con puntos isoeléctricos entre 3 y 10 (figura 16).

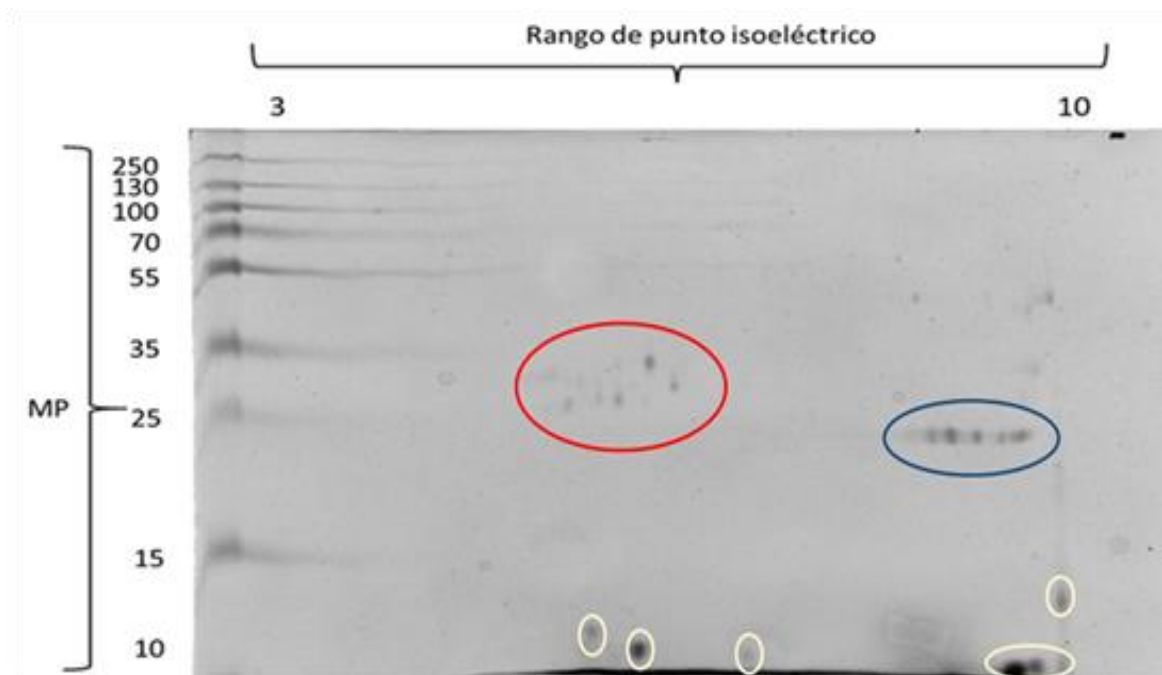


Figura 16. Electroforesis bidimensional del veneno total de *T. macrochirus*.

MP: Marcador de peso (Thermo Fisher®, bajo rango), **pI:** rango de punto isoeléctrico. Se señala cada uno de los spots obtenidos, que corresponden a las proteínas (círculos rojos y azules) y péptidos (círculos blancos) presentes en el veneno de *T. macrochirus*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que las proteínas con peso molecular entre el rango de 25 a 35 kDa se localizan en la mitad de migración, lo que puede indicar que estas proteínas tienen un valor de pI en un rango de 5 a 8 (figura 16, círculo rojo), mientras que las de peso molecular cercanos a 25 kDa presentan un pI cercano a un pH básico, aproximándose a 10 (figura 16, círculo azul). A diferencia de los anteriores, los péptidos con un peso molecular igual e inferior a 10 kDa se localizaron en zonas de pI cercano a pH neutro o hacia el pH básico (cercano a 10) (figura 16, círculos blancos).

2.5. Análisis de Resultados:

La especie *T. macrochirus* es una de las especies endémicas del género de *Tityus* presentes en Colombia. Esta especie pertenece a la familia Buthidae y género *Tityus*, los cuales se han caracterizado por tener mayor distribución a nivel mundial y en Colombia específicamente (13), como también se han caracterizado por el grado de toxicidad que desarrollan sus especies en mamíferos e insectos, al inyectarles su veneno. El *T. macrochirus* se encuentra distribuido en el oriente del departamento de Cundinamarca, y se han hallado individuos de esta especie, en los municipios de Choachí, Cáqueza, Fosca y Fómeque (115). Es justamente en estos municipios donde se realizaron las recolecciones de la especie, logrando obtener individuos en Choachí y Fosca, encontrándose con mayor distribución en la vereda Placitas del municipio de Fosca, ya que es un sitio donde aún se encuentra hábitat propio para la supervivencia de los individuos de escorpión, alrededor de las casas o cercas de piedra que se construyen para la delimitación de terrenos (figura 13). Situación contraria se presenta en Choachí, ya que esta zona ha sido más intervenida por el hombre, reflejándose en que se recolectó el menor número de individuos, con lo que se predice que estos individuos de escorpión migran constantemente buscando el hábitat propicio para su supervivencia. En el laboratorio se lograron mantener vivos los individuos de *T. macrochirus*, gracias al adecuado manejo en la alimentación, temperatura y humedad, siendo éstos los factores claves para garantizar la supervivencia de los individuos (117).

En cuanto al método de obtención del veneno, se eligió desde el principio la estimulación eléctrica. Con este método, se evita lastimar al individuo, se logra obtener en mayor cantidad de veneno, se garantiza la obtención de los péptidos con pesos moleculares menores a 6 kDa, ya que se obtiene tanto el preveneno como el veneno total y se evita la contaminación del veneno obtenido por otras secreciones producidas por el escorpión, comparado con el método manual (35, 118).

La selección del método de cuantificación del veneno fue un aspecto importante para el desarrollo del trabajo pues se pretendía perder la menor cantidad posible de muestra, pero manteniendo una buena precisión en los datos obtenidos. De acuerdo con los datos de concentración de proteína obtenidos del veneno de *T. macrochirus*, por los tres métodos de cuantificación, estos poseen similitud de acuerdo al análisis estadístico realizado, determinando el valor del factor F, determina la precisión de cada uno de los métodos como el análisis de varianza anava (análisis de varianza por R-Fiddle), por el valor de p, siendo igual a 0,55. (Tabla 2). Sin embargo, el método por absorción en UV (120), posee mayor precisión que los demás métodos. Por lo anterior, se eligieron los métodos de espectrofotometría por ultravioleta para calcular la concentración de proteína total contenida en el veneno de *T. macrochirus*, observándose además que tienen la ventaja de utilizar poca muestra de veneno y que ésta puede ser recuperada para ser utilizada en posteriores ensayos. La cantidad de proteína obtenida depende directamente del número de individuos de escorpiones que se emplearon, así como también de las veces que se realice el método de extracción y de la especie de escorpión (117, 120, 103, 55, 126, 20, 39).

Los pesos moleculares determinados en el veneno de *T. macrochirus*, corresponden a proteínas y péptidos característicos de los venenos de escorpión (figura 15). En específico, al comparar los perfiles electroforéticos de una y dos dimensiones del veneno de *T. macrochirus*, con otros perfiles de especies pertenecientes a la misma familia, se encuentra que poseen alta similitud tanto en pesos moleculares como en puntos isoeléctricos de enzimas del *Heterometrus laoticus* (127), péptidos con actividad neurotóxica y péptidos capaces de reconocer canales iónicos del veneno de *T. serrulatus* (128), y otros péptidos reportados con un peso molecular de entre 7 a 14 kDa del veneno de *T. pachyurus* (39) y del veneno de *H. lunatus* (40).

Capítulo 3

3. Purificación y Caracterización Bioquímica de Péptidos

3.1. Métodos bioquímicos empleados para la purificación y caracterización de péptidos presentes en venenos de escorpión.

Al identificar al escorpión como una “amenaza” para los humanos, desde hace varias décadas se inició el estudio a nivel bioquímico para determinar el tipo de compuestos presentes en su veneno, determinando que su mayor contenido son proteínas y péptidos y que éstos eran los directamente responsables del envenenamiento o toxicidad que desarrolla en humanos en el momento de emponzoñarlo. De acuerdo a lo anterior se han planteado diferentes métodos a partir de la bioquímica y la biología celular y molecular, para caracterizar las proteínas y péptidos presentes en los venenos de escorpión, en especial cuyas especies son consideradas como peligrosas para el humano.

Los métodos bioquímicos empleados para la purificación y caracterización de péptidos van desde la cromatografía por filtración en gel o la cromatografía de intercambio iónico, hasta la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), que junto a métodos electroforéticos y espectrofotométricos, han dado la posibilidad de obtener gran información sobre la composición peptídica de los venenos de escorpión, reportando hasta la fecha más de 120 estructuras primaria de péptidos presentes en venenos de escorpión de la familia Buthidae. Uno de los primeros reportes data de 1977, donde (22), dieron a conocer el estudio sobre el veneno de *T. serrulatus*, una de las especies que presenta mayores casos de emponzoñamiento en Brasil. En el trabajo expuesto,

desarrollaron métodos cromatográficos, de electroforesis y ensayos biológicos para la caracterización estructural y funcional de los péptidos presentes en el veneno de *T. serrulatus*, identificando cinco componentes (22). Así, a partir de estos estudios y por más de 4 décadas, se han empleado estos métodos bioquímicos con diferentes variaciones para determinar la estructura y el mecanismo funcional de las proteínas y péptidos presentes en los venenos de escorpión. Gracias a estas metodologías se ha ayudado a identificar diferencias y similitudes entre pesos moleculares, motivos estructurales y funcionales, de cada uno de los péptidos caracterizados de diferentes venenos. En este trabajo se emplearon diferentes métodos cromatográficos para lograr la purificación de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus* y poder realizar así su posterior caracterización estructural.

3.2. Desarrollo metodológico para la purificación y caracterización de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*.

A continuación, se presenta la descripción de los métodos generales usados para el desarrollo de esta tesis doctoral. Al final de esta descripción se encuentran los diagramas que muestran las variantes de procedimiento (procedimientos 1 a 4) que se usaron para separar y purificar la mayor cantidad posible de péptidos.

3.2.1. MÉTODOS GENERALES DE PURIFICACIÓN

Purificación de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*:

3.2.1.1. Cromatografía de filtración en gel:

Se realizó cromatografía de filtración en gel, usando dos soportes diferentes:

3.2.1.1.1. Cromatografía de filtración en gel por BioGel-P30:

Como fase estacionaria se empleó 12,5 mL del BioGel-P30, obtenido a partir de 1,5 g de soporte y activado con 60 mL de buffer de sales de fosfato (PBS) 1X, preparado con 138 mM de cloruro de sodio, 3 mM de cloruro de potasio, 8,1 mM de fosfato monobásico de sodio y 1,5 mM de fosfato di-básico de potasio pH 7,4. La fase estacionaria fue empacada en una columna de 21,3 cm de longitud con 2 cm de diámetro. Como fase móvil se empleó buffer de sales de fosfato (PBS) 1X, a pH 7.4. el flujo se mantuvo a 0,03 mL/min. La detección de cada una de las fracciones se determinó a longitudes de onda de 220 nm y 280 nm.

3.2.1.1.2. Cromatografía de filtración en gel por Sephacryl S-100:

La fase estacionaria se trató de Sephacryl S-100, en una columna pre-(2.6 X 60 cm GE Healthcare Bioscience AB SE7584 Uppsala USA), en un equipo de FPLC-BioRad®. Como fase móvil se empleó Buffer de acetato de amonio 20 mM pH: 4,7 con un flujo de 5 mL/min a 10 psi y las fracciones obtenidas se detectaron a 215, 230 y 280 nm.

3.2.1.2. Cromatografía de intercambio iónico

Esta metodología se realizó usando dos soportes diferentes, de acuerdo al tipo de intercambio a realizar.

3.2.1.2.1. Cromatografía de intercambio aniónico:

Para realizar este tipo de cromatografía se empleó como fase estacionaria 1,8 mL de DEAE-Sepharosa en una columna de 4 cm de longitud y 2 cm de diámetro, la elución se realizó empleando un gradiente discontinuo de Cloruro de sodio desde 150 mM hasta 500 mM en PBS 1X pH 7,4, con un flujo de 0,3 mL/min. La detección se realizó a 220 y 280 nm.

3.2.1.2.2. Cromatografía de intercambio catiónico:

- Una primera cromatografía de este tipo se empleó como soporte, 1,8mL de Carboxi-Metil-Sephadex C25 (CM-Sephadex), en una columna de 4cm de longitud y 2 cm de diámetro, la elución se realizó empleando un gradiente discontinuo de NaCl desde 150 mM hasta 500 mM en PBS 1X, pH 7,4, con un flujo de 0,3 mL/min y la detección a 220 y 280 nm. La muestra de veneno fue diluida 1/10 con buffer PBS 10 X pH 7,4. (54); (129); (130).

- Una segunda cromatografía se realizó usando 5 mL de CarboxiMetil-celulosa (CM-celulosa), en una columna de 10 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro, y equilibrada con acetato de amonio al 20 mM pH 4,7. La elución se realizó en un FPLC, con un gradiente continuo iniciando con una solución de acetato de amonio 20 mM hasta llegar a una concentración 0,5 M del mismo buffer, con un flujo de 2 mL/min y una presión de 10 psi. La detección se realizó a 215, 255 y 280 nm. Las fracciones obtenidas se liofilizaron y almacenaron a -20°C hasta su uso. (54, 131, 130)

3.2.1.3. Ultrafiltración:

Para el desarrollo de este método se empleó el sistema de Amicon® Ultra-0.5, por medio de membranas con diferente tamaño de exclusión: 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa y 3 kDa (Diagrama 1). El retentato y difusato obtenido de Amicon® Ultra-0.5 de 10 kDa y 3 kDa se liofilizaron y se guardaron a -20°C .

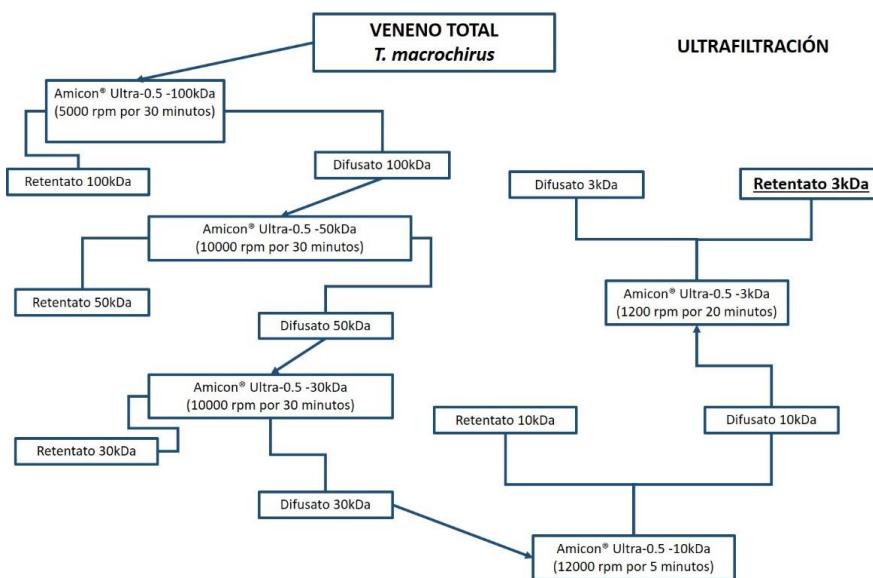


Diagrama 1. Procedimiento de la Ultrafiltración del veneno total de *T. macrochirus*, por el sistema de Amicon® Ultra0.5.

3.2.1.4. Cromatografía Líquida De Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC):

Se emplearon diferentes métodos, de acuerdo al gradiente de acetonitrilo y al tiempo de elución para la detección de péptidos y la purificación de los mismos a partir del veneno total y de las fracciones obtenidas de las cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico.

3.2.1.4.1. Método A:

En el primer método se empleó un equipo HPLC Hitachi, con una columna analítica de fase reversa C18, con dimensiones de 4,6x150 mm y tamaño de partícula de 5 µm. Se desarrolló un método en gradiente lineal desde 95% de solvente A (0,05% de Ácido trifluoroacético (TFA) en agua) hasta 60% de solvente B (0,05% de TFA en Acetonitrilo), por 45 minutos o 70 minutos, con un flujo de 1 mL/min y detección a 210 nm (método de Vergel Galeano (132), y adaptado por el Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP)).

3.2.1.4.2. Método B:

El equipo empleado en este método fue un Waters 625LC System en una columna analítica de fase reversa C18 con dimensiones de 4.6x250mm y tamaño de partícula de 5 µm. Desarrollando un método en gradiente lineal desde 0% hasta 60% de solvente A, (0.12% ácido trifluoroacético (TFA) en acetonitrilo) con un solvente B (0.10% TFA en agua), por 60 min, con un flujo de 1 mL/min y detección a 230 nm, recolectando manualmente las fracciones separadas. Las fracciones de péptidos obtenidas por este método se secaron por medio de Savant SC210A Speed Vac Concentrator (Thermo Electron Corporation). (39, 133), (126), (33), (129).

3.3. PROCEDIMIENTOS

3.3.1. PROCEDIMIENTO 1

En este procedimiento se realizaron cromatografías en columnas abiertas (filtración en gel, intercambio iónico) y las fracciones obtenidas se analizaron por RP-HPLC, método A (diagrama 2).

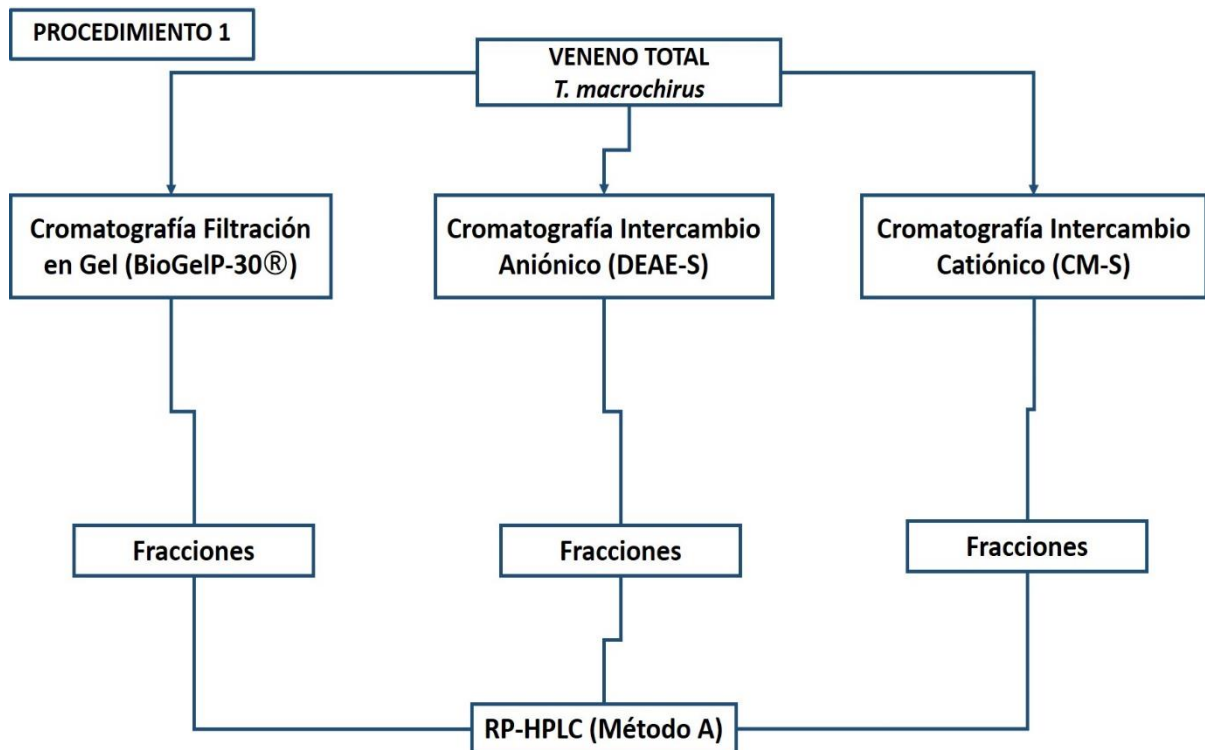


Diagrama 2. Procedimiento 1 para la purificación de péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*

Para cada uno de los métodos se detalla el tipo de soporte empleado para la purificación de los péptidos.

3.3.2. PROCEDIMIENTO 2

El procedimiento 2, consistió en la ultrafiltración del veneno total, empleando Amicon® Ultra-0.5 de 10 kDa y 3 kDa. Los difusato y retentato obtenidos se evaluaron por RP-HPLC, método A (diagrama 3).

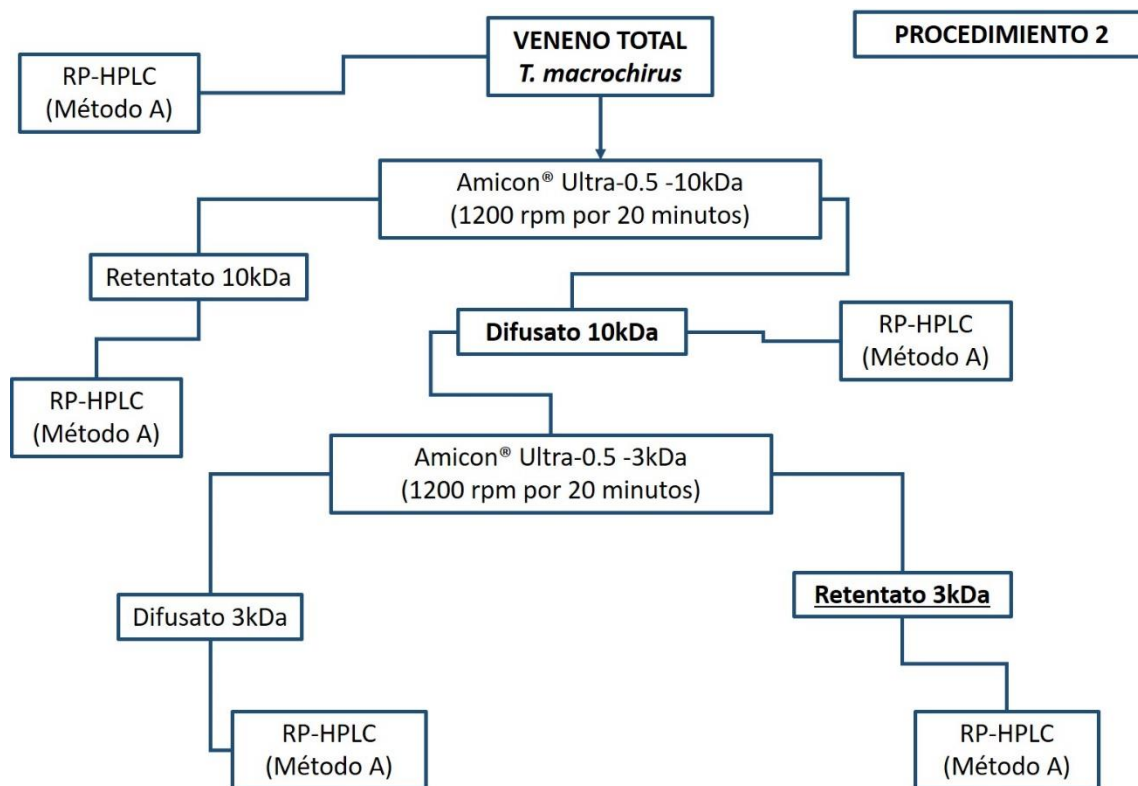


Diagrama 3. . Ultrafiltración del veneno total de *T. macrochirus*

La ultrafiltración se inicia con el veneno total desde el AmiconUltra-0.5-10 kDa al 3 kDa.

3.3.3. PROCEDIMIENTO 3

Este procedimiento se desarrolló por medio de RP-HPLC, por el método B, las fracciones de péptidos obtenidas se analizaron por espectrometría de masa, y las fracciones de péptidos parcialmente purificadas se repurificaron por RP-HPLC y se evaluaron nuevamente por espectrometría de masas. (diagrama 4).

(Parte de este procedimiento se realizó con la colaboración del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México).

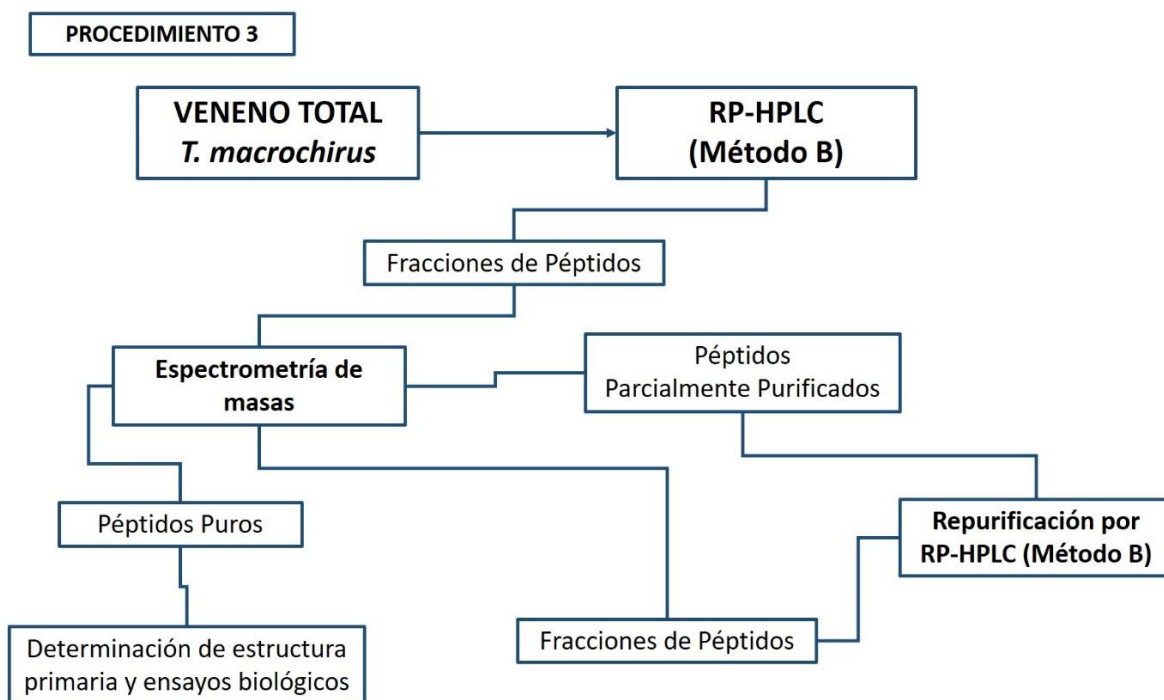


Diagrama 4. Purificación de péptidos presentes en el veneno total de *T. macrochirus*.

Purificación realizada por RP-HPLC, a partir del veneno total y la evaluación se realizó por espectrometría de masas.

3.3.4. PROCEDIMIENTO 4

En el procedimiento 4, se realizó por medio de cromatografías de filtración en gel, seguida de cromatografía de intercambio iónico, cada una de las fracciones se purificaron por RP-HPLC y los péptidos obtenidos se evaluaron por espectrometría de masas. (diagrama 5). (Este procedimiento se realizó con la colaboración del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México).

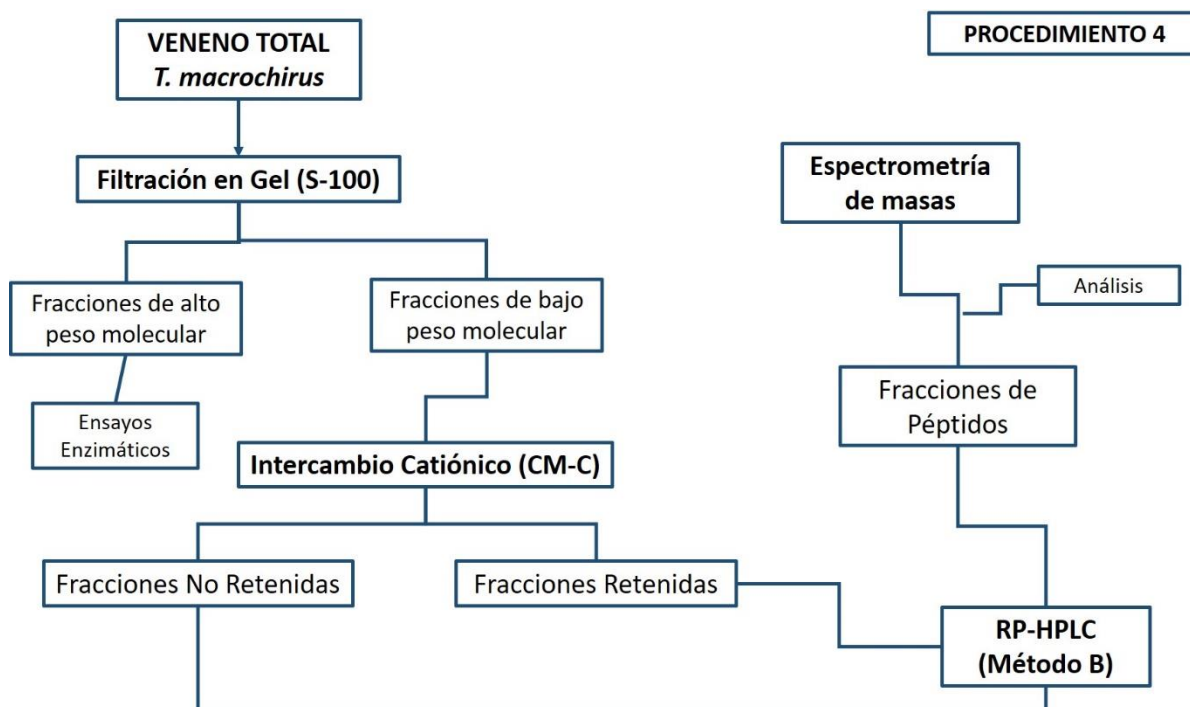


Diagrama 5. Purificación de péptidos presentes en el veneno total de *T. macrochirus*. Purificación realizada por diferentes tipos de cromatografía, a partir del veneno total de *T. macrochirus*.

3.4. Caracterización Bioquímica de los péptidos purificados del veneno de *T. macrochirus*

3.4.1. Análisis de espectrometría de masas

El análisis de espectrometría de masas de los componentes obtenidos en la purificación por RP-HPLC que se recolectaron manualmente se realizó por medio de un espectrómetro de masas LCQFleet Thermo Fisher Scientific Inc. (San Jose, CA, USA) (134). Este equipo también se empleó para el análisis de masas de las fracciones que fueron reducidas y alquiladas (apartado 3.4.2.), lo cual permitió tener información sobre la cantidad de residuos de cisteína presentes en cada péptido (Ecuación 1) (Este procedimiento se realizó con la colaboración del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México).

$$\# \text{ Cys} = \frac{\text{Peso Molecular Reducido y Alquilado} - \text{Peso Molecular Nativo}}{\text{Peso Molecular de Iodoacetamida (57Da)}}$$

Ecuación 1. Relación para obtener la cantidad de residuos de cisteína en la secuencia de aminoácidos

El análisis de espectrometría también se realizó a partir de los “spots” obtenidos en el procedimiento de electroforesis bidimensional (apartado 2.4.2, figura16). Los spots seleccionados se cortaron y el gel fue digerido de acuerdo al procedimiento planteado por Shevchenko (135). El gel de cada uno de los spots fue reducido con 10 mM de DTT en bicarbonato de amonio 100 mM por 30 minutos, y alquilados con 55mM de Iodoacetamida por 30 minutos en la oscuridad. Una vez

terminado el procedimiento cada una de las muestras se saturaron con $13 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de tripsina en bicarbonato de amonio 10 mM e incubado toda la noche a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Una vez se obtuvieron los fragmentos trípticos, se extrajeron del gel y se incubaron con $100 \mu\text{L}$ de solución de 5% ácido fórmico/acetonitrilo ($1:2 \text{ v/v}$) por 15 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, con agitación. Los péptidos fueron desalinizados usando Zip Tip C18 (Millipore, Billerica, Ma, USA) y se secaron en un Speed Vac Savant (136). El análisis de los péptidos trípticos se realizó por medio del sistema LC-MS/MS, compuesto por una bomba de nanoflujo EASY n-LCII (Thermo Fisher Scientific), acoplado a espectrómetro de masas Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). El sistema LC, posee un flujo de 400 nL/min y una columna C18 micro capilar ($75 \mu\text{m ID} \times 50\text{mm}$). Como solvente A se empleó $0,1\%$ de ácido acético en agua y solvente B $0,1\%$ de ácido acético en acetonitrilo. Los péptidos fueron eluidos por un gradiente lineal de 5 a 70% del solvente B por 60 minutos. Cada uno de los péptidos en solución se inyectaron por electrospray con 2.0 kV y los iones generados fueron detectados en scan con $60,000$ de resolución y sometidos a fragmentación por los métodos de disociación por CID (disociación por colisión inducida) y HCD (Disociación por colisión con alta energía). El analizador FT-Orbitrap, fue operado en modo de ion positivo y solo las cargas iónicas dobles y triples fueron seleccionadas por eventos de MS/MS. La exclusión dinámica fue habilitada a los 60 minutos y la pre exclusión a 30 s . La energía de colisión normalizada a 35 unidades arbitrariamente, la activación de Q $0,250$ y un tiempo de activación de 30ms aplicados en CID y HCD. (136)

Los datos de LC-MS/MS obtenidos, fueron analizados con Proteoma Discoveres v1.4 (Thermo- Fisher C, San Jose, CA, USA). Las secuencias de proteínas fueron sometidas en la base de datos de UniProt, para la identificación de cada uno de los péptidos. Los espectros MS/MS se analizaron por Sequest HT en la base de datos teniendo en cuenta los parámetros: - tripsina como enzima de digestión, - dinámica fija –modificaciones del tamaño de la cadena (oxidación (M), desaminación (N, Q) y carbamidometil (C)), -20 ppm de tolerancia de masa de péptidos, $-0,6 \text{ Da}$ de tolerancia de masa de fragmentos. Las proteínas fueron

identificadas con menos de dos péptidos distintos, considerando como correcta la identificación, con un $p < 0.05$ como significancia (136). (Este procedimiento se realizó con la colaboración del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México).

3.4.2. Reducción y alquilación de fracciones puras

El procedimiento para la reducción y alquilación de las fracciones de péptidos consistió en disolver mínimo 20 μg de la fracción de péptido pura, en 100 μL de buffer Tris-HCl 200 mM pH 8,6 con 6 M Cloruro de Guanidinio y 1 mg/mL EDTA; posteriormente se agregaron 2 mg de ditrioteitol (DTT), se burbujeó N_2 por 5 minutos y se incubó a 55 °C por 45 minutos. Transcurrido el tiempo se dejó incubando la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 2,5 mg de Iodoacetamida y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. El producto de este procedimiento fue analizado por RP-HPLC, con el método B, para la eliminación de los reactivos y la obtención de la fracción reducida y alquilada (130).

3.4.3. Digestión enzimática de péptidos purificados

A los péptidos purificados, reducidos y alquilados, se les realizó digestión enzimática, por medio de tres tipos de enzimas:

A. Endopeptidasa Aspartico-N (Asp-N): (Roche®) Los péptidos seleccionados para esta enzima, se disolvieron en 100 μL de buffer fosfato 50 mM pH 8,0, con 5 μL de la enzima. Esta mezcla se incubó a 37 °C por 18 horas y se analizó por el método B de RP-HPLC.

- B. Endoproteasa Lys-C: (Roche®) La fracción de péptido se re suspendió en 50 µL de buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,5 más 1 mM EDTA y 4 µL de la enzima, dejando en incubación por 18 horas a 37 °C y se analizó el resultado de la digestión por RP-HPLC con el método B.
- C. Proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*: (Mannheim, Germany®) Los péptidos fueron re-suspendidos en 100 µL de buffer de carbonato de amonio al 25 mM con pH 8,2, más 4 µL de la enzima V8, la muestra se incubó a 37 °C por 10 horas. Una vez terminado el tiempo de incubación se analizó la muestra por el método B de RP-HPLC.

3.4.4. Determinación de amino terminal y secuencia completa de los péptidos purificados.

Los amino terminales y las secuencias de aminoácidos de los péptidos purificados, se determinaron por medio de secuenciación automática de Edman, en un equipo de ProSequencer (MiliGen/Biosearch, Division of Millipore, Milford, Mass., USA®). Para este método se emplearon los péptidos no reducidos y alquilados, los péptidos reducidos y alquilados, y las fracciones obtenidas después de la digestión enzimática. De cada una de las muestras se emplearon 100 µL, y fueron sembradas en una membrana de fibra de vidrio e incubados a 37°C por 18 horas; posterior a este tiempo, la muestra fue analizada en el equipo ProSequencer (134). (Este procedimiento se realizó con la colaboración del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México).

3.5. Resultados

3.5.1. PROCEDIMIENTO 1, Cromatografía de columna abierta:

Los resultados obtenidos por la metodología planteada para la purificación de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, por filtración en gel con el soporte de BioGelP-30 y las cromatografías de intercambio aniónico y catiónico (DEAE y CM) (Diagrama 2), generaron diferentes fracciones que fueron cuantificadas y purificadas posteriormente por RP-HPLC. Sin embargo, la cantidad de proteína recuperada fue muy baja (116) y se prefirió utilizar otras estrategias (ultrafiltración, FPLC y RP-HPLC) con el fin de obtener mayor cantidad de las fracciones parcialmente purificadas (Anexos C).

3.5.2. PROCEDIMIENTO 2, Ultrafiltración:

La ultrafiltración, se propuso como una alternativa por la baja eficiencia obtenida por los métodos cromatográficos propuestos inicialmente. Para el desarrollo de este método se tuvo en cuenta los pesos moleculares estimados de los péptidos identificados por SDS-PAGE del veneno total de *T. macrochirus* (Figura 15). Este método se inició desde el Amicon Ultra-0,5® 100 kDa (diagrama 1, Anexo D), pero la concentración de proteína obtenida en el retentato del Amicon Ultra-0,5® 3 kDa era baja, con una pérdida de proteína mayor a 50%. Por lo cual se planteó iniciar desde el Amicon Ultra-0,5® 10 kDa (116), (Anexo D). Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó la metodología (diagrama 3), a partir de 195,81 µg de proteína total soluble del veneno, obteniendo un retentato del Amicon Ultra-0,5® 3 kDa con 57,94 µg de proteína soluble total, lo que indica que la cantidad de péptidos entre 3 kDa y 10 kDa presentes en el veneno de esta especie de escorpión corresponden a un porcentaje del 29,57 % respecto a la proteína soluble total (tabla 3).

Tabla 3. Ultrafiltración del veneno total de *T. macrochirus*. La ultrafiltración se realizó desde el Amicon Ultra-0,5® con un tamaño de exclusión de 10 kDa, hasta 3 kDa, con veneno total.

Muestra	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Volumen (mL)	Concentración proteína soluble total [mg/mL]	Proteína soluble Total mg	Proteína soluble Total µg
Veneno	2,151	2,318	0,100	1,958	0,196	195,814
Retentato 10 kDa	0,365	0,373	0,100	0,301	0,030	30,080
Difusato 10 kDa	0,619	0,616	0,200	0,484	0,097	96,870
Retentato 3 kDa	0,982	0,954	0,061	0,732	0,045	57,940
Difusato 3 kDa	0,336	0,290	0,180	0,194	0,035	8,560

Para comparar la purificación realizada por el método de ultrafiltración, se analizaron los difusatos y retentatos obtenidos de los Amicon Ultra-0,5® 10 kDa y Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, por medio de RP-HPLC (método A, ajustando el tiempo de elución a 45 minutos) junto al del veneno total (figura 17).

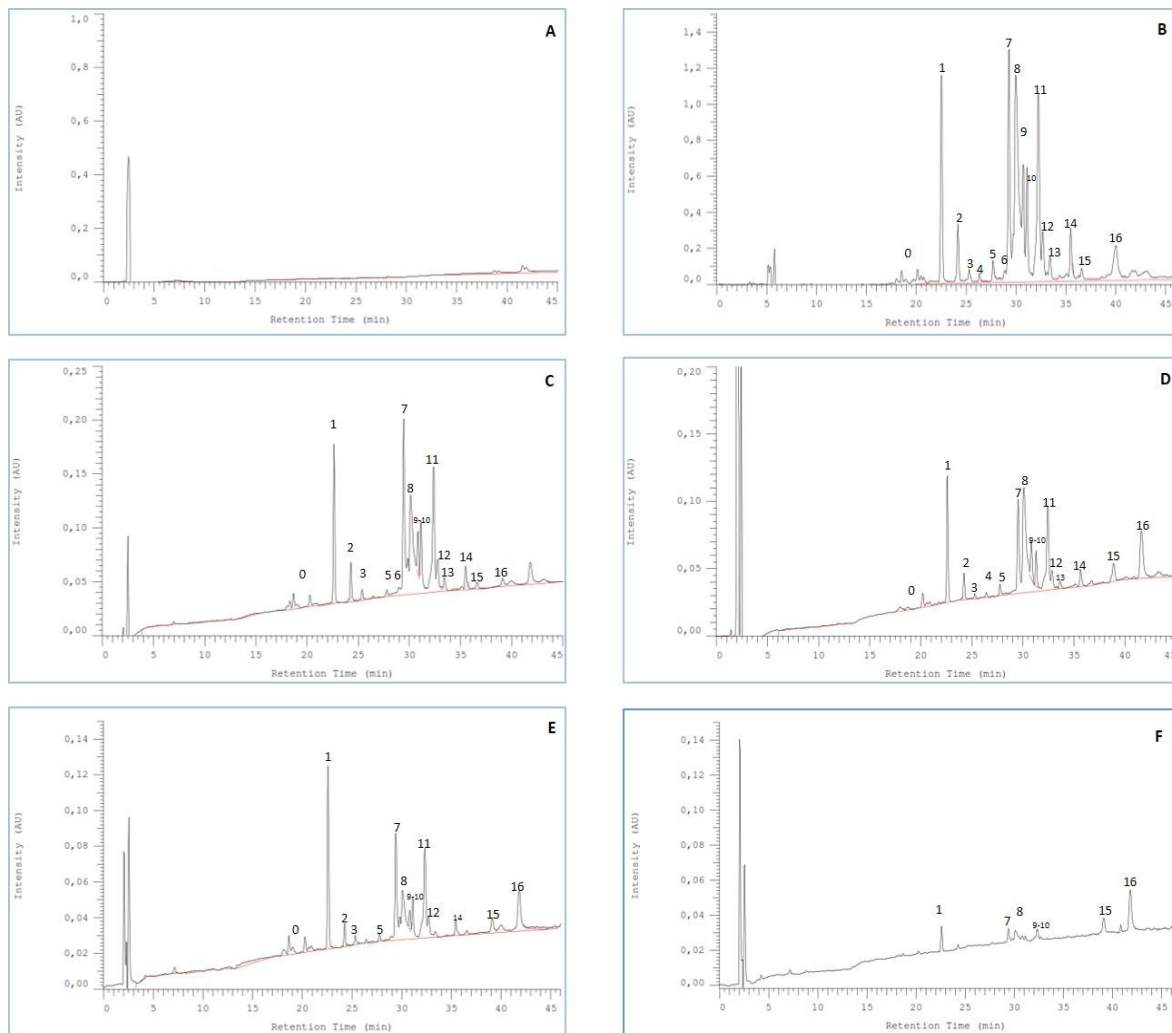


Figura 17. Perfil cromatográfico de RP-HPLC (método A, 45 minutos) del veneno total de *T. macrochirus*, y las fracciones obtenidas de la ultrafiltración.

A. Cromatograma del blanco de RP-HPLC; **B.** Cromatograma del veneno total de *T. macrochirus*; **C.** Cromatograma retentato Amicon Ultra-0,5® 10 kDa; **D.** Cromatograma difusado Amicon Ultra-0,5® 10 kDa; **E.** Cromatograma retentato Amicon Ultra-0,5® 3 kDa; **F.** Cromatograma difusado Amicon Ultra-0,5® 3 kDa.

Al comparar cada uno de los cromatogramas, se observa que en el retentato de Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, se obtienen menor cantidad de señales, con respecto a las observadas en el cromatograma del veneno total. Específicamente, aunque se mantienen las señales 7 a 12, dadas en el tiempo de retención de 30 minutos, y no se observan las señales 4, 6 y 13 (figura 17 B y E).

Por otro lado, el cromatograma del difusato de Amicon Ultra-0,5® 10 kDa con el del retentato de Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, las señales se mantienen, lo que indica que son las correspondientes a pesos moleculares menores de 10 kDa. (Figura 17 D-E). La señal número 16 se mantiene en cada uno de los procedimientos se predice que se trata de un péptido con un tamaño mayor o igual a 10 kDa a, que logró pasar el poro de la membrana de Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, posiblemente por su forma, registrando absorbancias menores a 0,1 UA (figura 17 E y F).

3.5.3. PROCEDIMIENTO 3, Cromatografía Líquida De Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC):

El método B de RP-HPLC, fue empleado para la purificación de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, de acuerdo al procedimiento 3 (Diagrama 4), para el cual, se emplearon 19,92 mg de proteína soluble total, del veneno de *T. macrochirus*. Estos mg se dividieron en 8 alícuotas de 2,5 mg y cada una de estas alícuotas fueron analizadas por el método B de RP-HPLC. A partir de la primera alícuota fraccionada por esta cromatografía se obtuvieron 72 fracciones, de las cuales se muestran algunas representativas en la figura 18.

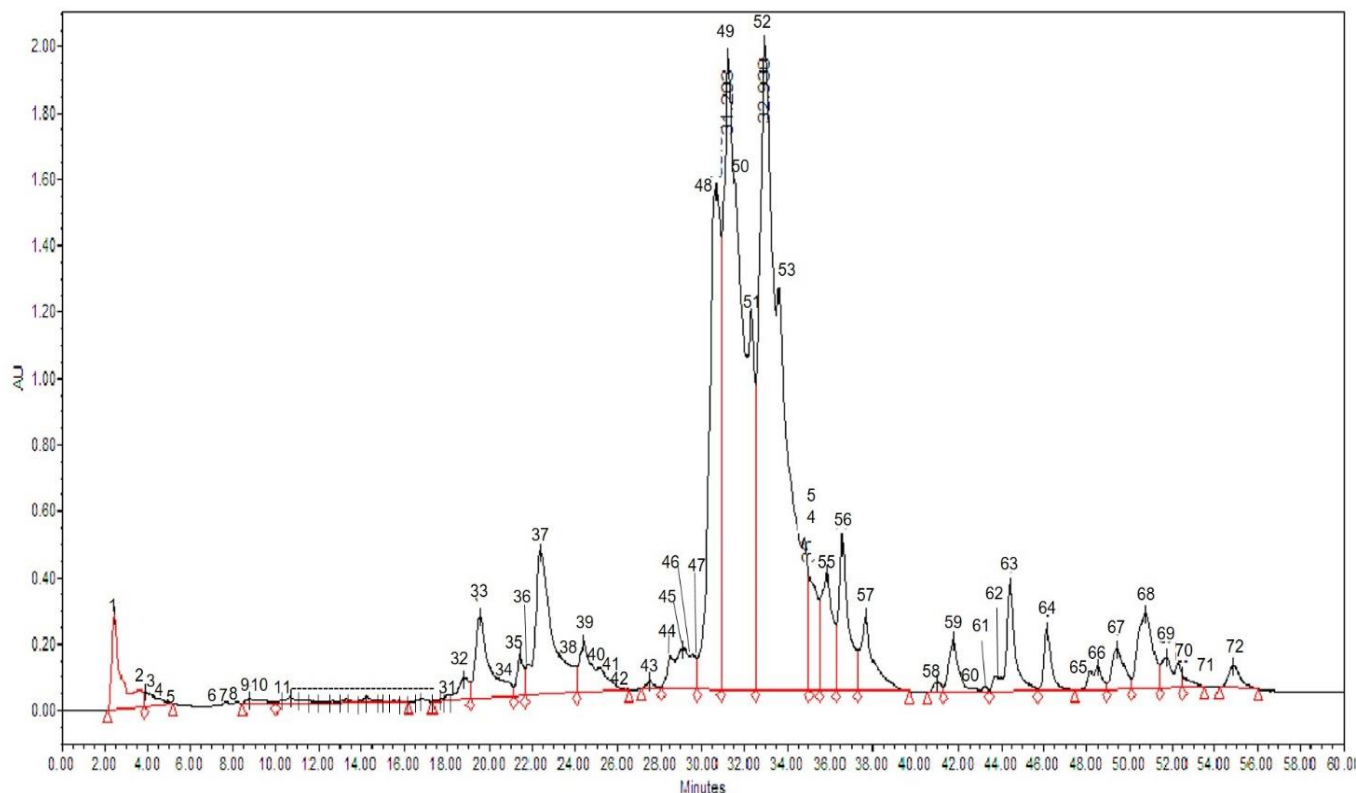


Figura 18. . Cromatograma del análisis del veneno total de *T. macrochirus*, por RP-HPLC.

Se emplearon 2,5 mg de proteína total contenida en el veneno de *T. macrochirus*. Analizado por el método B de RP-HPLC.

De las fracciones obtenidas, se seleccionaron las que registraron absorbancia mayor a 0,1 UA (18 en total) y las que registraron una absorbancia menor a 0,1 UA, pero con una cantidad de proteína mayor a 5 μ g (5 en total) (Tabla 4). Estas 24 fracciones fueron evaluadas por espectrometría de masas, obteniendo resultados de pesos moleculares desde 3000 Da (posibles péptidos con afinidad a canales iónicos) hasta 8000 Da y mayores que pueden corresponder a proteínas con actividad enzimática (Tabla 4). De acuerdo con estos resultados se resalta las fracciones 37, 38, 42, 48, 59 y 68, ya que reportan solo un dato de masa molecular, con lo que se puede predecir que se encuentran puras. Sin embargo, de estas seis fracciones, debido a la cantidad de muestra que se

obtuvo y la masa estimada, las siguientes fases de caracterización se realizaron solamente a la fracción 48.

Tabla 4. Fracciones obtenidas de la purificación por el método C de HPLC-RP C18 del Veneno total de *T. macrochirus*. A cada una de las fracciones se determinó su concentración, cantidad de proteína y masa molecular. Se resalta la fracción 48 por su pureza, cantidad de proteína obtenida y masa molecular estimada.

FRACCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN	[mg/mL]	mg	µg	Masa (Da)		
32	18,75	0,51	0,102	102	4156,58	3582,7	
33	19,58	0,25	0,175	17,5	4108,71	3959,39	
34	20,41	0,53	0,106	106	4108,8	3873,81	
35	21,41	0,16	0,0112	11,2	3872,39	3984,21	4108,7
36	21,8	0,22	0,0154	15,4	3566,8	3872,61	3742,7
37	22,36	0,34	0,0238	23,8	3566,86		
38	23,6	0,1	0,007	7	3666,56		
39	24,41	0,18	0,0126	12,6	2728,38	3566	
42	27,07	0,08	0,0056	5,6	3566		
44	28,47	0,15	0,0105	10,5	3329,2	3682,2	
45	29,03	0,07	0,0049	4,9	5224,29	5481,49	3328,5
46	29,15	0,18	0,0126	12,6	5224,2	5481	
48	30,63	2,38	0,238	238	7147,19		
49	31,20	0,7	0,7	70	7147,29	7083,32	
50	31,53	0,85	0,85	85	7147,29	7083,32	
51	32,57	0,84	0,084	84	7147,29	7083,32	7389,11
52	32,92	2,5	0,175	175	7389,40	7083,3	
53	33,58	1,58	0,11	110,6	7147,29	7083,32	7944
54	35,04	1,2	0,084	84	7389,42	7147,78	
55	35,8	0,22	0,022	22	7389	7147	7084
57	36,5	0,87	0,0609	60,9	10642,03	7389	7147
59	37,68	0,65	0,0455	45,5	10863,73		
61	41,01	0,12	0,024	24	6616,19	7651,60	
68	44,42	0,24	0,24	240	14725		

Posterior a estos resultados, se separaron las demás alícuotas por el mismo método B de RP- HPLC, obteniendo perfiles de cada una muy similares, por lo

cual las fracciones se reunieron con base en el tiempo de retención observado (tabla 4 y 5).

Partiendo de las fracciones anteriores, se realizó re purificación por medio de RP-HPLC de las fracciones 49 y 50 (Estas dos fracciones en una sola denominada 49), 51, 52, 53, 54, 55, 57 y 61, modificando el gradiente usado en el método para lograr una mayor separación en la zona específica de elución de cada fracción. A partir de las fracciones 49 (3 péptidos), 51 (1 péptido), 54 (2 péptidos), 55 (2 péptidos), 57 (1 péptido) y 61 (1 péptido), se obtuvieron péptidos puros, los cuales se secaron y se les determinó su concentración, para ser analizadas en espectrometría de masas posteriormente. Sin embargo, también se observa que hay aún mezclas de péptidos parcialmente purificados en todas las fracciones (Tabla 5).

Tabla 5. Fracciones de péptidos obtenidas por re-purificación en RP-HPLC. Se muestra la masa molecular de los péptidos presentes en las fracciones obtenidas de la re purificación de cada fracción.

Fracción	Fracción Re purificada	Tiempo de retención (min)	[Proteína] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Proteína Total en 100 μL (μg)	Masa Posterior a la Re-purificación		
49	9	27,81	0,64	64	7147,92		
	10	28,45	0,6	60	7148,06		
	11	28,83	0,36	36	7146,94		
	12	29,7	0,49	49	7146,82	10847,8	
51	1	38,12	3,1	310	7147,95	10847,58	
	2	39,02	0,95	95	7147		
	3	39,33	1,43	143	7147,95	7258,48	
	4	40,47	1,09	109	7147	7082,8	
	5	41,27	0,6	60	7147,6	7084,17	
52	14	31,29	0,84	84	7388,53	7083,77	
53	13	31,15	0,06	6	7415,8	7083,27	7389,5
	15	31,97	0,16	16	7418,8	7083,27	
54	11	35,11	0,1	10	7389,4	7085,3	

	12	35,74	0,14	14	7386,4		
	15	37,87	0,03	3	10571,32		
55	9	23,98	0,04	4	7389,57		
	10	24,65	0,07	7	7389,38		
57	16	28,74	0,03	3	7316,8	10642,48	
	17	29,71	0,08	8	10642,3		
61	4	41,28	0,05	5	10642		
	5	41,9	0	0	-		
	6	42,51	0,03	3	-		
	7	42,95	0,02	2	-		
	8	44,03	0,02	2	-		

3.5.4. PROCEDIMIENTO 4, Purificación de péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, por medio de tres métodos cromatográficos.

El procedimiento 4 fue desarrollado por tres tipos de cromatografía, filtración en gel, intercambio catiónico y RP-HPLC (diagrama 5).

3.5.4.1. Cromatografía de filtración en gel por Sephacryl S-100:

Se analizaron por este método 12 mg de proteína soluble total del veneno de escorpión *T. macrochirus*, obteniendo 6 fracciones (figura 19, tabla 6). De acuerdo a límite de exclusión del soporte Sephacryl S-100, se seleccionaron las Fracciones V y VI para ser analizadas. De la fracción V (FV), se obtuvo 55 mL, con 2 mg de proteína total del veneno de *T. macrochirus*, correspondiente a un 16.6% de la cantidad total de proteína soluble en el veneno. De la fracción VI (FVI), se obtuvo un volumen total de 105 mL, con 5,1 mg de proteína total y que corresponde a un 42.5% de la cantidad total de proteína.

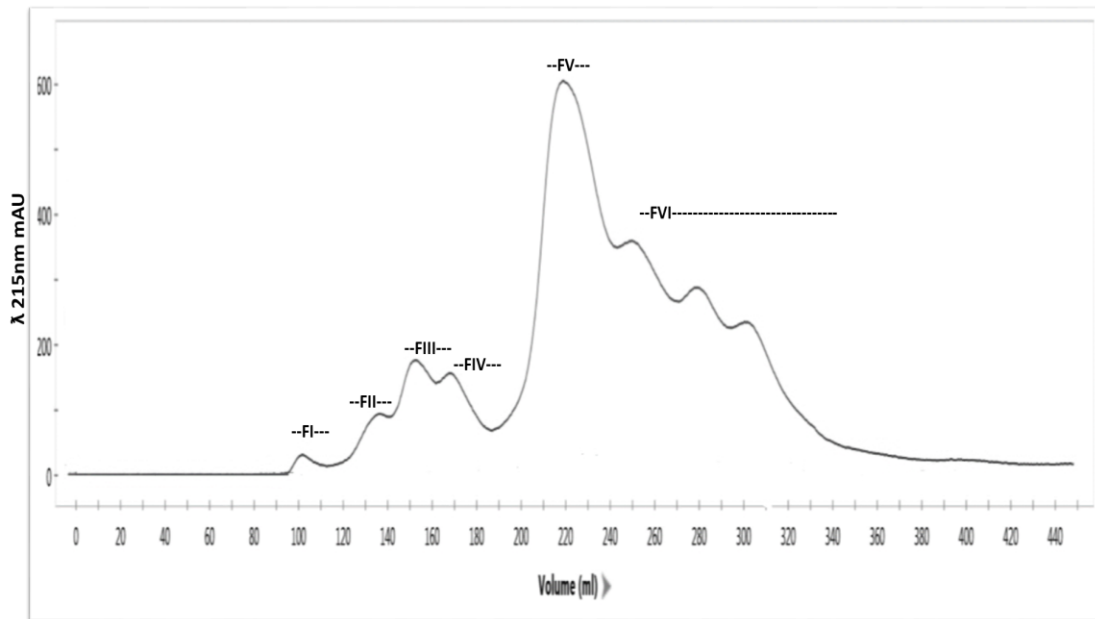


Figura 19. Perfil cromatográfico de la purificación de los componentes proteicos del veneno de *T. macrochirus* por cromatografía de filtración en gel de Sephacryl S-100HR

12 mg de proteína total del veneno de *T. macrochirus*, fueron fraccionados en una columna de Sephacryl S-100HR equilibrada y eluida a un flujo de 1 mL/min de acetato de amonio 20 mM pH 4.7, obteniendo 6 fracciones.

Las fracciones FI a la FIV, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C, para emplearlas en ensayos de actividad enzimática y las fracciones FV y FVI se almacenaron a 4°C para ser analizadas por cromatografía de intercambio catiónico.

Tabla 6. Fracciones obtenidas por filtración en gel, empleando un soporte de Sephacryl S-100HR.

Proteína Total de veneno	Fracciones Obtenidas	Proteína Total	% de Recuperación de la purificación
12mg	FI	66µg	0,55
	FII	280,5 µg	2,33
	FIII	474,4 µg	3,95
	FIV	595,5 µg	4,96
	FV	2,6mg	21,6
	FVI	4,6mg	38,3

3.5.4.2. Cromatografía de intercambio catiónico por CarboxiMetil-Celulosa:

Este tipo de cromatografía se realizó a las fracciones FV y FVI de filtración en gel. La fracción FV generó ocho fracciones denominadas FV-1 a FV-8, de las cuales la FV-1 corresponde a la fracción no retenida (figura 20, tabla 7)

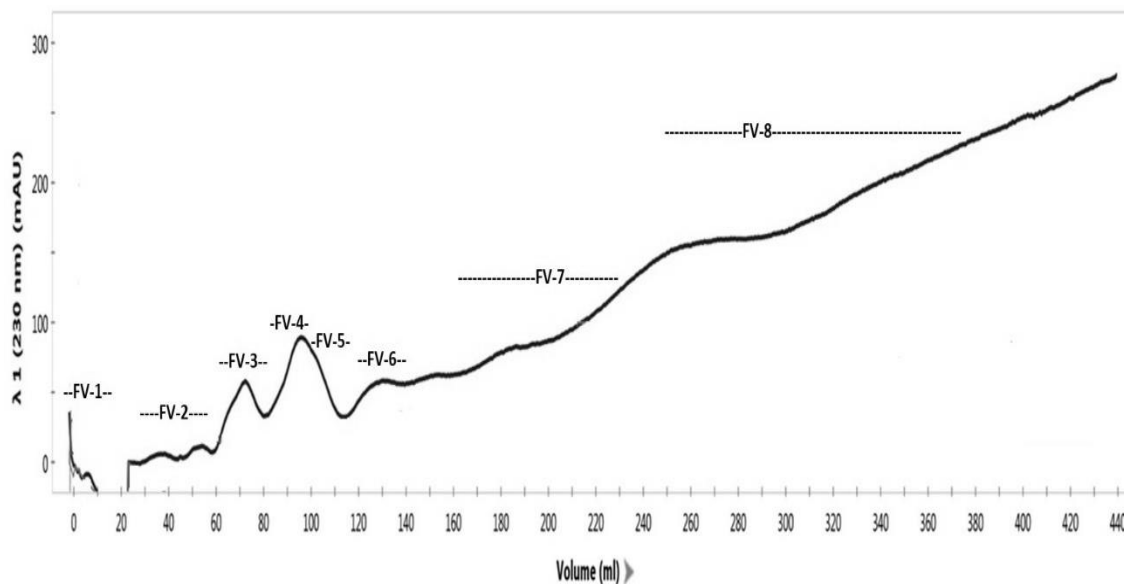


Figura 20. Perfil cromatográfico de la separación realizada por intercambio catiónico de la Fracción V, obtenida en filtración en gel.

2,6 mg de la fracción V, obtenida en la filtración en gel S-100, se separó por intercambio catiónico, obteniendo ocho fracciones denominadas FV-1 a FV-8.

Respecto al perfil de intercambio iónico obtenido a partir de la fracción FVI de filtración en gel, se encontraron 8 fracciones denominadas FVI-1 a FVI-8, donde la primera fracción corresponde a la fracción no retenida (figura 21, tabla 7). Cada una de las fracciones se liofilizaron y se almacenaron para su análisis por RP-HPLC.

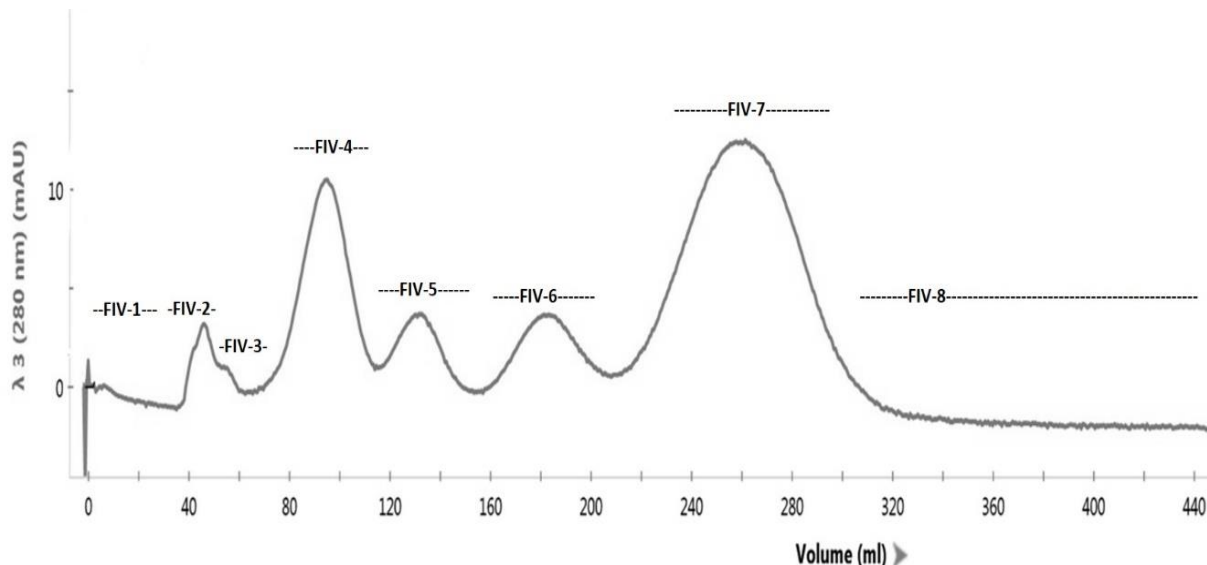


Figura 21. Perfil cromatográfico de la separación realizada por intercambio catiónico de la Fracción VI, obtenida en filtración en gel.

24,6 mg de la fracción VI, obtenida en la filtración en gel S-100, se separó por intercambio catiónico, obteniendo ocho fracciones denominadas FVI-1 a FVI-8

Tabla 7. Fracciones obtenidas al realizar cromatografía de intercambio catiónico (CIC).

Fracción (Filtración en Gel)	Proteína Total	Fracciones (CIC)	Proteína Total µg	<u>%Recuperación de purificación</u>
FV	2,6 mg	FV1 -No Retenida	350	17,5
		FV-2	276	13,8
		FV-3	560	28
		FV-4	226	11,3
		FV-5	114,1	5,7
		FV-6	296	14,8
		FV-7	732	36,6
		FV-8	257	12,85

Tabla 8. Fracciones obtenidas al realizar cromatografía de intercambio catiónico (CIC) (continuación).

Fracción (Filtración en Gel)	Proteína Total	Fracciones (CIC)	Proteína Total µg	<u>%Recuperación de purificación</u>
FVI	4,6 mg	FVI-1No retenida	100	2,17
		FVI-2	118	2,56
		FVI-3	66,5	1,44
		FVI-4	600	13,04
		FVI-5	300	6,52
		FVI-6	430	9,34
		FVI-7	1560	33,9
		FVI-8	111	2,41

3.5.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa:

Con las fracciones obtenidas en la purificación del veneno total a partir de filtración en gel (Sephadex S-100) y cromatografía de intercambio catiónico (CM-Celulosa) (tabla 7) se realizó la purificación de péptidos por medio del método B de RP-HPLC. Las fracciones de péptidos purificados por este último método, se secaron y se almacenaron para sus posteriores ensayos (Tabla 8).

Tabla 9. Purificación de las fracciones obtenidas por Filtración en Gel de Sephadex-(S-100) e intercambio catiónico (CIC-CM-Celulosa). Se muestra cada una de las fracciones con la cantidad de proteína analizada y las fracciones obtenidas en la purificación por RP-HPLC.

Fracciones de CIC	Proteína Total µg	Fracciones obtenidas por RP-HPLC	Proteína Total µg
FV-2	276	FV-2-16	97,5
		FV-2-34	39,5
FV-3	560	FV-3-13	40,5
		FV-3-15	36
		FV-2-21	46
FV-4	226	FV-4-8	45,2
FV-5	114,1	FV-5-3	14,4
FV-6	296	FV-6-5	25
		FV-6-8	1,8
		FV-6-14	23,28
		FV-6-10	30
FV-7	732	FV-7-22	85,5
FV-8	257	FV-8-2	9,2
		FV-8-3	40
FV-1 -No Retenida	350	FV-1-NR-8	6,6

Tabla 10. Purificación de las fracciones obtenidas por Filtración en Gel de Sephadex-(S-100) e intercambio catiónico (CIC-CM-Celulosa) Se muestra cada una de las fracciones con la cantidad de proteína analizada y las fracciones obtenidas en la purificación por RP-HPLC.

Fraciones de CIC	Proteína Total µg	Fraciones obtenidas por RP-HPLC	Proteína Total µg
FVI-2	118	F-VI-2-5	30,6
FVI-3	66,5	FVI-3-3	5,4
FVI-4	600	FVI-3-11	89,4
		FVI-4-12	84
		FVI-4-13	20
FVI-5	300	FVI-5-3	5,4
		FVI-5-5	20,4
		FVI-5-10	33,6
		FVI-5-6	16,8
FVI-6	430	FVI-6-15	21,84
		FVI-6-16	21
		FVI-6-17	53,9
		FVI-6-18	25
FVI-7	1560	FVI-7-9	25
		FVI-7-11	27
		FVI-7-12	83,6
FVI-8	111	FVI-8-3	26
FVI-1 No Retenida	100	FVI-1-NR-4	X

Las primera purificación realizada por RP-HPLC, se inició con la fracción FV-2, de la cual se inyectaron 276 μg de proteína total, y durante el desarrollo del método se obtuvieron dos fracciones con una absorbancia mayor a 1.0 UA, denominándolas FV2-16 y FV2-34, en los tiempo de retención de 20,1 min y 33,5min respectivamente (Figura 22). Las fracciones se secaron y se almacenaron para posteriores estudios (tablas 9 y 10). Los 15 resultados adicionales de RP-HPLC obtenidos a partir de las demás fracciones, se encuentran en el anexo E.

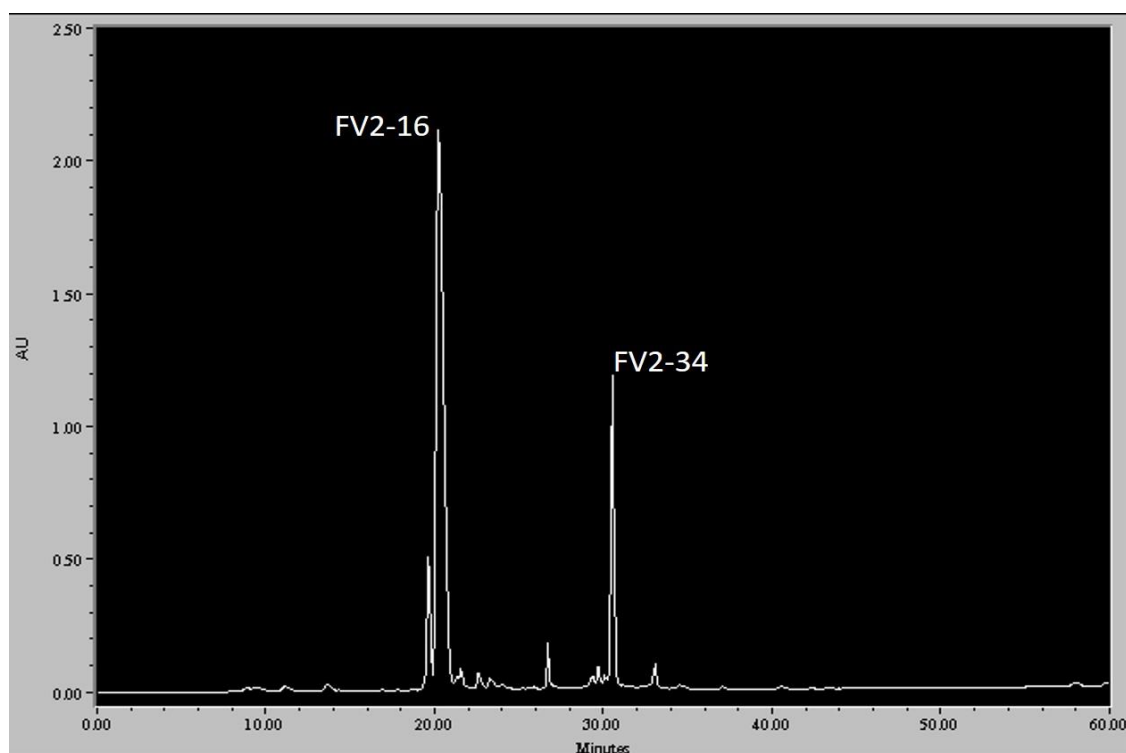


Figura 22. Perfil cromatográfico de la purificación de las fracciones obtenidas en cromatografía de intercambio catiónico por RP-HPLC.

Fracción V-2, donde se logró obtener dos fracciones con una absorbancia mayor a 1,0UA, denominadas FV2-16 y FV2-34.

3.5.5. Análisis de masas de las fracciones de péptidos purificadas, obtenidas por los procedimientos 4.

A cada una de las fracciones de péptidos obtenidas a partir de la repurificación por RP-HPLC en los procedimientos 4 (tablas 9, 10), se realizó análisis de masas, diferenciando que 11 péptidos poseen pesos moleculares desde 3,5 a 4,8 kDa, 26 péptidos con pesos moleculares de 7,0 a 7,4 kDa y un péptido de 11 kDa. (Tabla 11).

Tabla 11. Fracciones de péptidos obtenidas por el procedimiento 4. Se detalla cada una de las fracciones purificadas y parcialmente purificadas con el valor de masa.

Fracciones obtenidas por RP-HPLC	Proteína Total (µg)	Masa (Da)
FV-2-16	97,5	3959,03
FV-2-34	39,5	7429,54
FV-3-13	40,5	7822,66
FV-3-15	36	4834,54
FV-3-21	46	7448,78
FV-4-8	45,2	7462,45
FV-5-3	14,4	7848,95
FV-6-5	25	3967,88
		3730,46
FV-6-8	1,8	3681,71
FV-6-14	23,28	7190,95
FV-6-10	30	7155,06
FV-7-22	85,5	7389,32
FV-8-2	9,2	4045,28
FV-8-3	40	3873,28
		3984
FV-1-NR-8	6,6	3566,35
F-VI-2-5	30,6	7008,7
FVI-3-3		11527,83

FVI-3-11	89,4	7154,16
FVI-4-12	84	7156,16
FVI-4-13	20	74449,15
		7170,67
FVI-5-3	5,4	3942,84
FVI-5-5	20,4	7464,13
FVI-5-10	33,6	7944,5
FVI-5-6	16,8	3926,89
FVI-6-15	21,84	7191,3
FVI-6-16	21	7374,29
		719136
FVI-6-17	53,9	7374,43
FVI-6-18	25	7373,41
		7044,39
FVI-7-9	25	7147,84
		7184,62
FVI-7-11	27	7389,67
FVI-7-12	83,6	7389,5
FVI-8-3	26	7147,86
FVI-1-NR-4	X	--

Los péptidos puros que fueron obtenidos por los 4 procedimientos se resumen en la tabla 12, se resalta la fracción 52-14, que, a pesar de no encontrarse pura, se logró determinar el amino terminal (tabla 12). La secuencia parcial o completa de algunos de estos péptidos fue identificada, de acuerdo a lo presentado en la metodología.

Tabla 12. Fracciones de péptidos puros obtenidas por los procedimientos de purificación. Se detalla cada una de las fracciones purificadas, el método de obtención y el valor de masa determinado.

FRACCIÓN	PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN	MASA MOLECULAR DETERMINADA (Da)
37	Procedimiento 3	3566,86
38	Procedimiento 3	3666,56
42	Procedimiento 3	3566
48	Procedimiento 3	7147,19
49-9	Procedimiento 3	7147,92
49-10	Procedimiento 3	7148,06
49-11	Procedimiento 3	7146,94
51-2	Procedimiento 3	7147,82
52-14	Procedimiento 3	7388,53; 7083,77
54-12	Procedimiento 3	7386,4
55-9	Procedimiento 3	7389,57
55-10	Procedimiento 3	7389,38
FV-2-16	Procedimiento 4	3959,03
FV-2-34	Procedimiento 4	7429,54
FV-3-13	Procedimiento 4	7822,66
FV-3-15	Procedimiento 4	4834,54
FV-3-21	Procedimiento 4	7448,78
FV-4-8	Procedimiento 4	7462,45
FV-5-3	Procedimiento 4	7848,95
FV-6-8	Procedimiento 4	3681,71
FV-6-14	Procedimiento 4	7190,95
FV-6-10	Procedimiento 4	7155,06
FV-7-22	Procedimiento 4	7389,32
FV-8-2	Procedimiento 4	4045,28
FV-1-NR-8	Procedimiento 4	3566,35
F-VI-2-5	Procedimiento 4	7008,7
FVI-3-11	Procedimiento 4	7154,16
FVI-5-3	Procedimiento 4	3942,84
FVI-5-5	Procedimiento 4	7464,13
FVI-5-10	Procedimiento 4	7944,5

FVI-5-6	Procedimiento 4	3926,89
FVI-6-15	Procedimiento 4	7191,3
FVI-4-12	Procedimiento 4	7156,16
FVI-6-17	Procedimiento 4	7374,43
FVI-7-11	Procedimiento 4	7389,67
FVI-7-12	Procedimiento 4	7389,5
FVI-8-3	Procedimiento 4	7147,86

3.5.6. Determinación de secuencia primaria

A partir de las fracciones detalladas en la tabla 12, se determinó su secuencia de aminoácidos, obteniendo en algunos casos la secuencia parcial y en otros la secuencia completa. A continuación, se muestra detalladamente el resultado obtenido en cada una de las etapas para la fracción denominada como 48 (proveniente del procedimiento 3) y a la cual de ahora en adelante denominaremos Tmac48. Los resultados obtenidos para las demás fracciones serán tabulados posteriormente para indicar los resultados finales obtenidos y las variantes en metodología que se realizaron para obtener los mismos.

La fracción Tmac48 reportó una masa de 7147,19 Da (tabla 12), lo que sugiere una composición de aproximadamente entre 70 y 75 aminoácidos. A partir de esta información, a la fracción Tmac48 se le determinó su amino terminal, sin reducción y alquilación, por medio de degradación automática de Edman, encontrándose un amino terminal de 35 residuos de aminoácidos (figura 23). Sin embargo, como se evidencia en la figura, esta secuencia posee un segmento sin resolver entre la posición 25-31.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35						
G	G	K	E	G	Y	P	L	N	T	S	N	G	X	F	F	G	T	N	S	W	X	K	T														K	X	K	A

Figura 23. Amino terminal de la fracción Tmac48.

Esta secuencia se obtuvo por degradación automática de Edman de forma directa. Las X representan posibles residuos de cisteína y los espacios en blanco residuos de aminoácidos que no se lograron resolver durante el desarrollo del método.

Para determinar la cantidad de cisteínas presentes en la secuencia, 40 µg de la fracción Tmac48 fueron reducidos y alquilados, encontrándose un producto de reacción que al analizarse por RP-HPLC (método B), se obtuvo una fracción en un tiempo de retención de 30,97 minutos (figura 24).

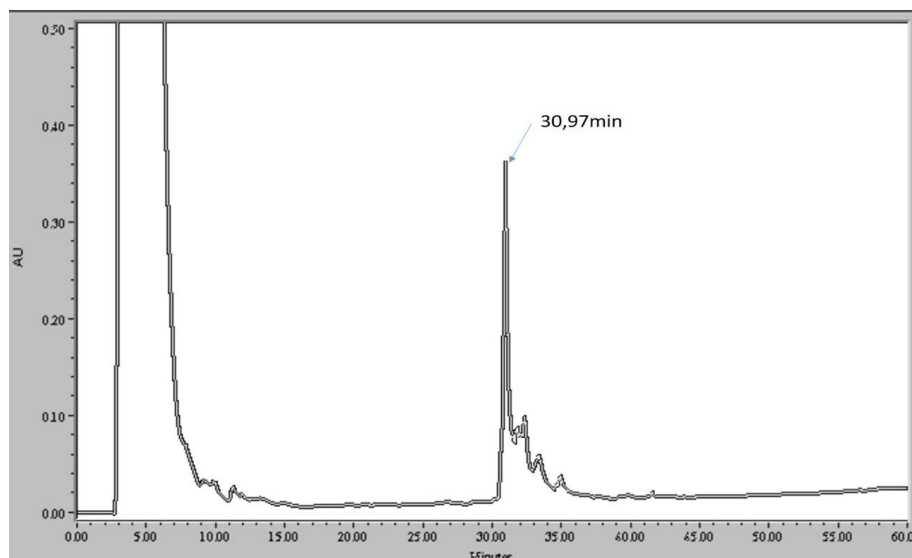


Figura 24. Perfil cromatográfico del péptido T.mac48, reducido y alquilado analizado por RP-HPLC.

Se resalta la fracción obtenida al tiempo de retención de 30,97 minutos, resultado de la reducción y alquilación del péptido Tmac48. Se empleó el método en gradiente lineal de 0-60% de acetonitrilo 0,12%-TFA, por 60 minutos.

Esta fracción o péptido se analizó por espectrometría de masas reportando un peso de 7612,55 Da, el cual corresponde al péptido Tmac48 reducido y alquilado (Tmac48RA). Al usar este dato, junto con el obtenido previamente sin reducir ni alquilar, por medio de la Ecuación 1 se determinó, que la cantidad de residuos de cisteína corresponde a 8.

Posteriormente para lograr obtener mayor información de la secuencia de aminoácidos del péptido Tmac48, se realizó, digestión enzimática con Endopeptidasa Asp-N. Esta enzima fue seleccionada por el número de residuos de asparagina que reportó el amino terminal. El producto de la digestión se analizó por RP-HPLC (método B), obteniéndose 9 fragmentos de la digestión (figura 25).

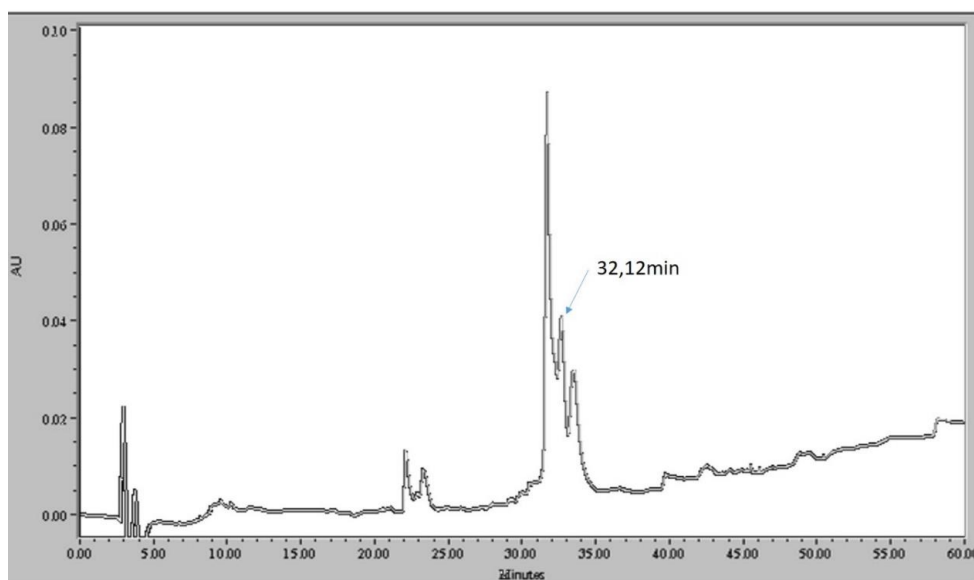


Figura 25. Perfil cromatográfico del análisis del péptido T.mac48RA, después de la digestión enzimática por RP-HPLC.

Se resalta la fracción obtenida al tiempo de retención de 32,12 minutos, obtenida por la digestión enzimática con la Endoproteasa Asp-N, del péptido Tmac48. Para el análisis de RP-HPLC, se empleó el método en gradiente lineal de 0-60% de acetonitrilo 0,12%-TFA.

Teniendo en cuenta que el pico de mayor absorbancia, puede corresponder al péptido Tmac48 sin ninguna alteración durante la digestión con la enzima Asp-N (tiempo de retención 30,7 aproximadamente), por lo cual, se seleccionó la fracción que eluyó a un tiempo de retención de 32,12 minutos para el análisis de masas, cuyo resultado reportó dos pesos moleculares: 4863 Da y 5965,42 Da. Al de menor tamaño (4863 Da) se le realizó secuenciación automática de Edman en 41 ciclos. Sin embargo, el resultado obtenido fue similar al anterior, por lo que no se logró resolver mayor información de lo anteriormente reportado de la secuencia del amino terminal de este péptido.

Al no obtener otros resultados sobre la secuencia del péptido Tmac48, se realizó una nueva digestión enzimática con Endoproteasa Lys-C obteniendo 7 fragmentos, de los cuales se seleccionaron los fragmentos obtenidos en los tiempos de retención de 27,27 y 28,89 minutos (figura 26) que reportaron una masa molecular de 1955 Da para la fracción del tiempo de retención 27,27min y 2251Da para la fracción en 28,89min.

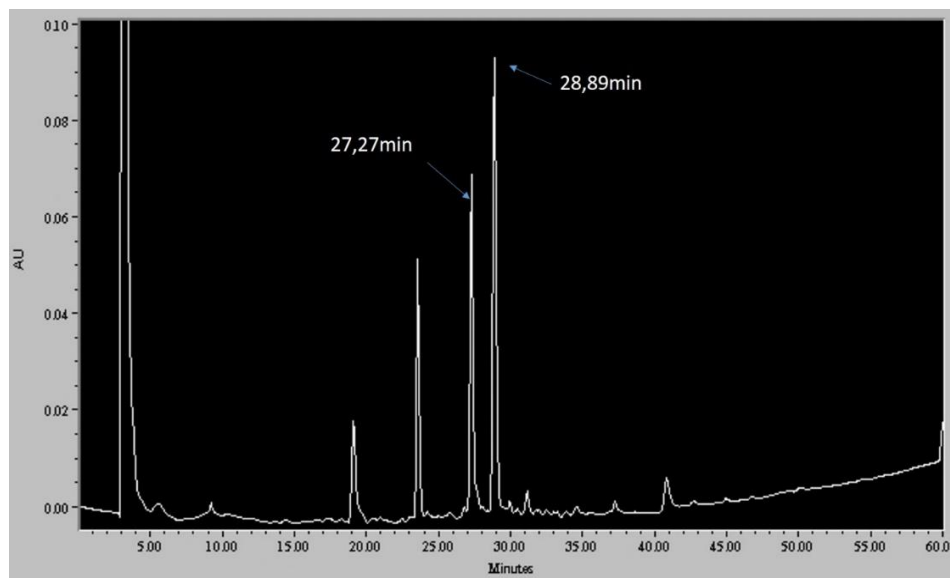


Figura 26. Perfil cromatográfico del análisis del péptido Tmac48, después de la digestión enzimática con Lys-C, por RP-HPLC

Se resaltan los fragmentos obtenidos al tiempo de retención de 27,27 y 28,89 minutos, obtenidos por la digestión enzimática con la Endoproteasa Lys-C del péptido Tmac48.

Estos fragmentos se analizaron en secuenciación automática de Edman, obteniendo información adicional de secuencia con el fragmento obtenido a los 27,27min de retención (figura 27).

Muestra /# Residuo de aminoácido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
Secuencia Amino terminal T.mac48	G	G	K	E	G	Y	P	L	N	T	S	N	G	X	F	F	G	T	N	S	W	X	K	T	-	-	-	-	-	-	-	-	K	X	K	A
Secuencia fracción 4 digestión con Lys-C											S	-	G	C	F	F	G	T	N	S	W	C	N	T	E	C	K									

Figura 27. Secuencia de aminoácidos del péptido Tmac48.

Se muestra la secuencia obtenida del amino terminal de Tmac48 y la secuencia de aminoácidos, obtenida del fragmento resultante de la digestión por Lys-C.

De acuerdo a estos resultados, la fracción Tmac48 presenta un único péptido, con una masa molecular de 7147,19 Da, con 8 cisteínas en su estructura primaria y un amino terminal que corresponde a la secuencia GGKEGYPLNTSNGCFFGTNSWCNTECK----KXKA. Sin embargo, falta determinar aproximadamente el 50% de su secuencia.

Así como se analizó el péptido Tmac48, se realizó el análisis de los demás péptidos que se purificaron completamente, identificándose el amino-terminal de algunos de ellos. Y la secuencia completa del péptido que se encuentra en la fracción FV2-16 (Tabla 13).

Tabla 13. Fracciones de péptidos con la secuencia de amino terminal determinada.
Se detalla cada una de las fracciones purificadas con la información de su secuencia de aminoácidos.

Procedimiento de purificación	Péptido	Masa (kDa)	Reducido y Alquilado	No Cys	DIGESTIÓN ENZIMÁTICA	SECUENCIA	#A.A. Faltantes
3	48	7147,19	X	8	Asp-N y Lys-C	GGKEGYPLNTSWGCKSGCFFGTNSW CNTECK---KXKA	33
3	49-9	7147,92	-	-	-	GGKEGYPLNTSNGCKSGCFF GTNSX	46
3	51-11	7147,82	X	8	--	GGKEGYPLNTSNGCKSGCFFGTNS	47
3	49-11	7146,94	-	-	-	GGKEGYPLNTSNGDKNGYFFGVX	46
3	52-14	7388,5	X	8	-	KKEGYLVGND GCFYGCFTRAAQXYE	45
3	55-9	7389,57	-	-	-	GKEGYWGNDDGCDYGCFTRDAQY	48
4	FV2-16	3959,03	X	6	V8	GCNKLGRKCDSDCCRYGERCLSLGSG YFCKVDPGA	0
4	FV2-34	7429,54	X	8		LDGYPLSKHNYCKIYCPDDEVCKESCXI RAG	38
4	FVI4-13	7822,66	X	8		YKDDYPVDTAKRNCKFPCNVIDXEGYC SNN	43
4	FVI3-15	4834,54	X	8		KKDDYPVDTAERNCKFECNIVVDKGYC XNL	13
4	FV2-21	7448,78	X	8		LDGYPLSKHNYCKIYCEDDAMCKNSCK I	36
4	FVI4-8	7462,45	X	8		LDGYPLSKHNYCKIYCEDDAMCKNSCK IRAGAXNK	34
4	FVI6-10	7155,06	X	8		LDGYPLSKVNNCKIYCPDDE	48
4	FV7-22	7389,32	X	8	V8-2	GXLVXNDGCXYQCFIWQAXY	50
					Asp-N	DGCKYGCFTRPAQYC	
4	FVI2-5	7008,7	X	8		KEGYLVGSKGCKLECV	52
4	FVI3-11	7154,16	X	8	V8-2	LDGYPLSKVNNCKIYCPDDDTCTC----- EGYLVGNDECK	34
4	FVI4-12	7156,16	X	8	Asp-N	LDGYPLSKVNNCKIYCPDXTX----- DVPNTKMYPG	36
4	FVI5-10	7944,5	X	8	-	No determinada	51
4	FVI6-17	7374,43	X	8		KKEGYLVGNDGCKYGCFTRPAQYCES ECSLRXGT	35
4	FVI7-12	7389,5	X	8	Lys_C	YGCFTRPAQYCESECSLRK	51

3.5.7. Análisis LC-MS/MS:

Teniendo en cuenta los resultados de las electroforesis bidimensionales realizadas, se analizaron 23 spots obtenidos a partir de proteína soluble total del veneno de *T. macrochirus* (figura 28).

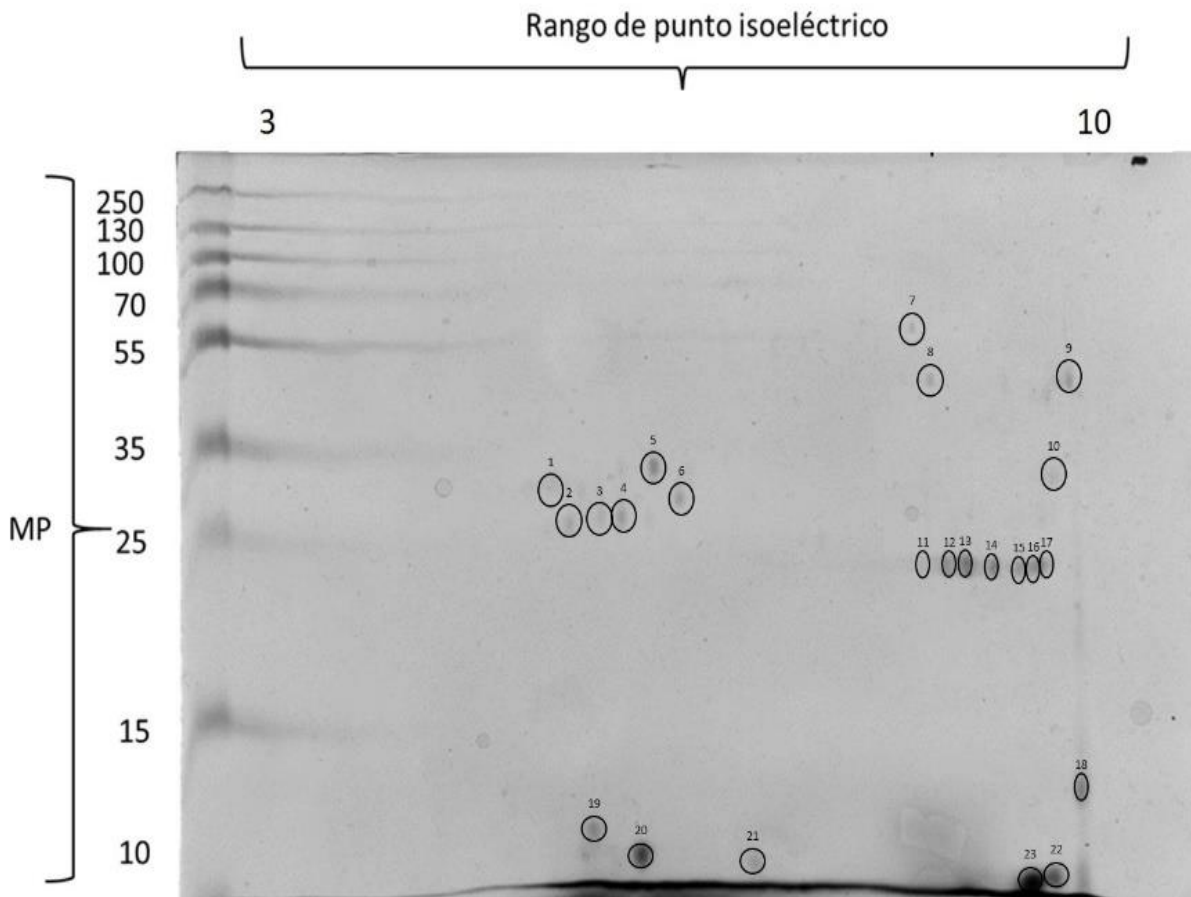


Figura 28. Electroforesis bidimensional del veneno total de *T. macrochirus*.

Se muestra el perfil electroforético obtenido a partir de la proteína soluble total presente en el veneno de *Tityus macrochirus*, de los cual se indican 23 spots que se usaron para el análisis de LC-MS/MS. Los spots se encuentran marcados desde 1 a 23.

De los 23 spot analizados, 11 mostraron resultados de secuencias y masas moleculares de sus péptidos trípticos (tabla 14). Del mismo modo, estas secuencias permitieron identificar proteínas descritas como metaloproteasas, fenoloxidasas, nexina, dominio de helicasa y una proteína hipotética. También se identificaron péptidos caracterizados como toxinas específicas para canales de sodio y proteína ricas en residuos de cisteína. Sin embargo, los péptidos identificados como 12, 13, 17 y 22 (tabla 14) no obtuvieron un score mayor a 40 en el alineamiento contra la base de datos, por lo que no arrojaron resultados de proteína o péptido relacionado. En los spots 1, 3, 5, 7 9-11, 16, 18-22, no se logró identificar la presencia de péptidos, con el método de búsqueda empleado.

Tabla 14. Secuencias de proteínas y péptidos obtenidas por medio de electroforesis bidimensional del veneno total de *T. macrochirus* y sus proteínas semejantes.

SPOT	# PÉPTIDO	SECUENCIA	PROTEÍNA SEMEJANTE/ORGANISMO/ID*			PRECURSOR	(Z+)	MW
2	10	ININLIGIDAR	Metaloproteinasa- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91184.1	606,36	2	1.210,72
4	15	VKYLQSQPR	Antareasa-Similar a Zn-metaloproteasa, partial	<i>Tityus sp.</i> [EO- 2013]	AHE40595.1	631,34	2	1260,68
6	1	ADEPSFIDDSAIPSHPLVLD	Metaloproteinasa- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91175.1	950,48	2	1.898,96
8	4	GSPAQYLDISYIR	Proteína rica- cisteínas- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91145.1	741,89	2	1.481,78
12	16	PDGPPGALSCKYK	Neurotoxina Hm-3 (RecName)	<i>Heriæus melloteei</i>	COHJK5.1	646,82	2	1291,64
	17	DCMAYFLSLPR	Score <40			695,82	2	1389,64
	18	LGLQAFTK	Nexin corta- Transcriptoma	<i>Ixodes scapularis</i>	XP_002433754.1	630,39	2	1258,78
	19	EDEPAFLKSTLNK	Proteína 3- cromodominio enlace helicasa ADN	<i>Drosophila ficuspshila</i>	XP_017051832.1	746,39	2	1490,78
13	11	IRLIGIQAFTK	Metaloproteinasa- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91132.1	630,39	2	1258,78
	12	DCMAYFLSLPR	Score <40			695,32	2	1388,64
	13	GHEEYCK	Score <40			543,72	2	1085,44
	14	GLPDGPQISCK	Fenoloxidasa sub- unidad 2	Insectos		686,35	2	1370,7

14	2	IRLIGIQAFTK	Metaloproteinasa- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91132.1	630,39	2	1.258,78
	3	QAFTKEDEPAFIK	Metaloproteinasa- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91128.1	960,03	2	1.918,06
15	20	IRLIGIQAFTK	Metaloproteinasa- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91132.1	630,39	2	1258,78
17	21	KADLLFLFTK	Proteína hipotética- parcial ALC56_09001	<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>	KYN37210.1	598,94	2	1195,88
	22	DCMAYFLSLPR	Score <40			694,81	2	1387,62
23	5	DCNVLDDEGYCDNLCK	Toxina canal de sodio- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91185.1	1068,92	2	2.135,84
	6	KKDDYPVDLAK	Toxina canal de sodio- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91185.1	576,28	2	1.150,56
	7	ASCYCYGLPDDSPK	Toxina canal de sodio- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91185.1	867,36	2	1.732,72
	8	KKDDYPVDLAK	Toxina canal de sodio- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91185.1	640,33	2	1.278,66
	9	WLACYCYNMP	Toxina canal de sodio- Transcriptoma	<i>T. obscurus</i>	JAT91098.1	1277,5	2	2.553,00

*ID: Código en base de datos

3.6. Análisis de Resultados.

En la purificación de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, se plantearon cuatro procedimientos, para lograr su posterior caracterización estructural y funcional.

En el procedimiento 1, el primer método se basó en la resolución que posee el soporte de BioGelP30, específico para la purificación de péptidos, pero el porcentaje de recuperación del método, de acuerdo a la cantidad de proteína total analizada y la cantidad de proteína total obtenida en cada fracción, fue menor a 1%, situación que se puede atribuir que durante la purificación por medio de BioGelP-30, las proteínas y péptidos del veneno realizan interacciones no específicas con el soporte, o que durante la liofilización de las muestras se perdió gran porcentaje de las mismas, en el proceso de congelación, reflejado en la baja concentración obtenida de cada fracción. Concentración inferior al límite de detección de HPLC, la cual debe ser mayor de 1 µg, por lo cual no se logró

observar ningún tipo de señal correspondiente a péptidos purificados (116); (Anexo C Tabla C1, Figura C1).

Teniendo en cuenta los diferentes métodos planteados para la purificación de péptidos de venenos de escorpión, además de las cromatografías de filtración en gel y HPLC, también se han desarrollado cromatografías de intercambio iónico (Procedimiento 1 Anexo C Figura C3 y C4). Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, atribuido principalmente a que los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, no realizaron interacción con el soporte de DEAE, asumiendo que el pH del buffer PBS (con pH 7,4), no es lo suficientemente mayor a su punto isoeléctrico para que todos los péptidos se logren cargar negativamente y realicen la interacción con el soporte DEAE. En el procedimiento 1 también, se realizó cromatografía de intercambio catiónico eluida con PBS pH 7,4. Los resultados obtenidos fueron similares a lo obtenido por la cromatografía de intercambio aniónico, debido a que los péptidos en el pH del buffer en el cual se realizó el intercambio, no logran cargarse positivamente para realizar la interacción con el soporte de Carboxi-Metil. Por lo cual la purificación de los péptidos por los métodos del procedimiento 1 no es eficiente, reflejado en los porcentajes de rendimiento y las concentraciones de proteína obtenidas (Anexo C -Tabla C2, Figura C5).

La mayoría de los métodos propuestos para la purificación de péptidos presentes en venenos de escorpión, se basan en métodos cromatográficos. En el presente trabajo se planteó la ultrafiltración (procedimiento 2) como método de purificación parcial de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, al tener en cuenta los pesos moleculares de las proteínas y péptidos presentes en este veneno (116, 137, 138, 39, 128, 50)

De acuerdo con la metodología planteada (Diagrama 1 y 3), se logró purificar parcialmente los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, además que las concentraciones de proteína total obtenidas en cada una de las ultrafiltraciones y en especial del retentato final obtenido en Amicon Ultra-0,5®-3

kDa, que corresponde a los péptidos de 3 a 10 kDa, fueron superiores, en comparación a lo obtenido con los métodos cromatográficos propuestos en el procedimiento 1 (Anexo D Figura D1). Por el método de ultrafiltración, se logra retirar cierta proporción del solvente en el que se encuentra la muestra, mientras que, en los métodos de cromatografía, por la cantidad de solvente eluido, para su separación, puede diluir las muestras de veneno y por ende la concentración de las fracciones obtenidas son muy bajas.

La purificación se evaluó por RP-HPLC, y al comparar los cromatogramas de RP-HPLC del retentato de Amicon Ultra-0,5®-3 kDa, con el del veneno total, se logra diferenciar señales que se mantienen y otras que son excluidas durante el desarrollo del método, (Figura 17), por lo que se propone que las señales corresponden a péptidos con pesos moleculares entre el límite de exclusión de Amicon Ultra-0,5®-3 kDa. Las señales que se conservan corresponden a los tiempos de retención de 22, 29, 31, 32 y 34 minutos (Figura 17), que podrían corresponder a péptidos con pesos moleculares de 3 a 7 kDa, ya que por análisis de RP-HPLC de diferentes venenos de escorpión se ha determinado que en estos tiempos de retención se logra obtener péptidos con pesos moleculares de este rango. Como también una señal en el tiempo de retención de 57 minutos, que podría corresponder a un péptido con un peso molecular de 10 a 11 kDa. Siendo el rango límite de exclusión del Amicon Ultra-0,5®-10 kDa (48, 44, 56, 137). Lo que indica que el método de ultrafiltración es favorable para la purificación parcial de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, y se podría aplicar para la purificación de otro tipo de péptidos.

Otro de los métodos clásicos para la purificación de péptidos presentes en venenos de escorpión es por medio de RP-HPLC, en columnas de C18 ya sea a partir de veneno total o de fracciones obtenidas por cromatografías de columna abierta (44, 48, 55, 56, 126, 137). Por lo cual se planteó el procedimiento 3 en donde a partir del veneno total de *T. macrochirus*, se logró obtener 72 fracciones de péptidos (figura 18), de las cuales, 23 fracciones, se les realizó análisis de masas, reportando pesos moleculares de 3 a 10 kDa (Tabla 4). Teniendo en

cuenta la masa molecular determinada, se predice que en el veneno de *T. macrochirus*, se encuentran péptidos específicos para canales de K^+ y canales de Na^+ (23, 39, 54, 55, 33, 126). Al tener en cuenta el tiempo de retención de cada una de las fracciones de péptidos obtenidas, se relacionó con el característico de los péptidos que se han purificado en venenos de escorpiones de la familia Buthidae. Así, los péptidos obtenidos entre los tiempos de retención de 20 a 31 con % de elución del acetonitrilo entre 20-31%, corresponden a péptidos con pesos moleculares entre 3 a 5 kDa, característica observada en las fracciones 27 a 41 (%Acetonitrilo de 27-41) (Tabla 4). y se pueden clasificar como toxinas específicas para canales de K^+ , mientras los componentes con tiempos de retención de 30 a 40 minutos (%Acetonitrilo de 30 a 40), corresponden a péptidos con una masa de 6 a 7 kDa, dato correspondiente para las fracciones de péptidos denominados 45-46, 48 -57 que podrían corresponder a péptidos específicos para canales de Na^+ . (44, 48, 56, 137, 55, 126). Aunque Batista y colaboradores (48), también propone que en los tiempos de retención de 40 a 60 minutos se logran obtener péptidos de masa molecular 10 a 11 kDa, estos péptidos en la purificación realizada del veneno *T. macrochirus*, se obtuvieron entre un tiempo de retención de 36 a 45 minutos, donde algunas fracciones de estas aun presentan péptidos con masa molecular de 6,5 a 7,3 kDa, de las fracciones 57 y 61 respectivamente. También se resalta la fracción 63 obtenida en un tiempo de retención de 44,4 minutos con un peso molecular de 14,7 kDa (tabla 4). Ya que este tipo de polipéptidos se logra obtener un rango de tiempo de retención de 50 a 60 minutos (Figura 18, Tabla 4) (44, 48, 56, 137, 126, 55). En la re-purificación de las fracciones que reportaron pesos moleculares de 7 kDa, se logró obtener siete péptidos puros y 10 fracciones parcialmente purificados (tabla 5). Estos nuevos péptidos pueden corresponder al grupo de péptidos específicos a canales de Na^+ , teniendo en cuenta su peso molecular y el porcentaje de acetonitrilo en el cual eluyen durante la purificación (21, 38, 57, 61, 62).

Por último, en la purificación de péptidos realizada por el procedimiento 4, se logró purificar mayor cantidad de péptidos (Figura 19-22). Además, que, en la

cromatografía de filtración en gel, el porcentaje de recuperación de proteína fue del 71%. Lo que indica que la recuperación de proteína es satisfactoria, específicamente para la obtención de las fracciones V y VI, donde teóricamente se encuentran los péptidos de interés, dado al límite de exclusión del soporte, que corresponde de 1.000-100.000 Da. En este caso las fracciones no fueron liofilizadas y además fueron eluidas con buffer de acetato de amonio pH 4,7 de acuerdo a la metodología planteada por Possani L.D y colaboradores (139). Factores que podrían influir en la conservación de la estructura de las proteínas y péptidos del veneno.

Por otro lado, partiendo de las fracciones FV y FVI, obtenidas en la cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-100, al realizar la cromatografía de intercambio catiónico, con acetato de amonio pH 4,7, se logró resolver mayor cantidad de fracciones (Figura 22, Anexo E), lo que represento que el porcentaje de purificación permite realizar posteriores purificaciones para obtener mayor cantidad de péptidos (tablas 6-11). Comprobando que el pH del buffer empleado, es importante para la interacción de los péptidos con el soporte y así mismo se realice una primera purificación satisfactoria. Siendo resultados similares a lo reportado por Possani L.D y colaboradores (139), a partir del veneno de *T. serrulatus*. En donde se describe este tipo de cromatografía para la purificación de la mayoría de los péptidos que se encuentran en el veneno de esta especie de escorpión.

El método de intercambio catiónico, ha sido empleado por diferentes autores para llegar a la purificación de péptidos presentes en venenos de diferentes especies de escorpión, como también cada una de las fracciones obtenidas por estos métodos han sido empleadas para otro tipo de análisis como pruebas de citotoxicidad y antimicrobianas (131, 140). Las fracciones FV y FVI, se analizaron por RP-HPLC (método B), (tablas 9-11, figuras 20-22), obteniendo 27 péptidos puros y 5 péptidos parcialmente purificados, al compararlo con los péptidos obtenidos por el procedimiento 3, se lograron obtener mayor cantidad de péptidos puros. Con base al análisis de masas (Tablas 9-11). Se lograron obtener 11 péptidos con masa

molecular de 3 a 4 kDa, 27 con masa molecular de 7 a 7,5 kDa y uno de 11 kDa. Con esta última fracción, y al comparar los métodos de purificación de péptidos del veneno de *T. macrochirus*, comprueba que el método de purificación desde filtración en gel, fue eficiente para separar los componentes proteicos con un peso molecular superior a 15 kDa, ya que en proporción en la purificación realizada directamente del veneno por RP-HPLC, se nota la presencia e interfiere en la purificación de los péptidos de interés (tablas 9 y 11).

De acuerdo con los procedimientos realizados para lograr la purificación de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, se logra obtener mayor cantidad por medio de los procedimientos 3 y 4 (tabla 12), aunque no se debe descartar el procedimiento 2 (ultrafiltración), ya que se logra obtener péptidos parcialmente purificados y realiza selección por peso molecular, siendo una de las principales características de los péptidos de venenos de escorpión.

De acuerdo a la caracterización de la estructura primaria de los péptidos purificados, se identificó la presencia de residuos de cisteína, lo que permitió clasificarlos como péptidos con puentes disulfuro (DBPs) de los cuales la mayoría de los analizados poseen 8 residuos de cisteína, y se destaca al péptido FV2-16, posee 6 residuos de cisteína, el cual fue obtenido por el procedimiento 4 (tabla 13). Y al relacionar esta característica con la masa molecular determinada de cada uno de ellos se puede predecir que los que poseen masa de 4 a 7kDa con 8 residuos de cisteína podrían actuar sobre canales de Na⁺, mientras que el péptido FV2-16 por reportar una masa molecular de 3959.02 Da y 6 residuos de cisteína podría actuar sobre canales de K⁺ características que permiten, clasificarlos en uno de los dos grupos generales de toxinas o péptidos de venenos de escorpión NaScTxS o KTxS, respectivamente (21, 38, 57, 61, 62, 141).

Los péptidos trípticos, obtenidos a partir de la separación del veneno total de *T. macrochirus*, por electroforesis bidimensional (tabla 14), comprobaron la presencia de proteínas y péptidos característicos de los venenos de escorpión. De acuerdo al análisis realizado, estos péptidos poseen mayor identidad con los péptidos y proteínas reportados en el veneno de *T. osbcurus*. Este tipo de

escorpión pertenece tanto a la misma familia como a al mismo género, con lo que se puede concluir que existe relación filogenética entre las dos especies de escorpiones, reflejada en el porcentaje de identidad entre las secuencias de proteínas y péptidos analizados. Una de las proteínas que se reportó con una alta identidad es la metaloproteasa, que ha sido catalogada como la responsable de desarrollo de pancreatitis como consecuencia de la picadura de escorpión. Esta proteína también se encuentra en el veneno de *T. serrulatus*, denominada antareasa, similar a la identificada en el veneno de *T. osbcurus* (142).

La neurotoxina Hm-3, corresponde a un péptido inhibidor de la activación del canal de sodio, identificada en el veneno de araña cangrejo, lo cual se puede relacionar filogenéticamente por pertenecer a la misma clase taxonómica (143). Otro de los péptidos que se relaciona con la clase arácnida, se trata de la nexina, la cual ayuda al mantenimiento y funcionalidad de la superficie celular, para el reconocimiento de canales iónicos (144). Por último se identifican proteínas comunes a los invertebrados, como es la Fenoloxidasa, la cual es importante en el sistema inmune de los insectos (145).

En cuanto la proteína rica en cisteínas, pertenece al grupo de toxinas características de los venenos de escorpión y de estas mismas se originan la toxinas con actividad en canales iónicos, las cuales se encontraron en gran cantidad en este trabajo a partir del veneno de *T. macrochirus*, y que han sido identificadas previamente por su actividad sobre canales de sodio (21). Teniendo en cuenta que la mayoría de los péptido fueron semejantes a los identificados en el escorpión *T. osbcurus*, se predice que estos dos escorpiones poseen gran cercanía a nivel filogenético, a pesar de hallarse distantes en su distribución geográfica (33)

Capítulo 4

4. Evaluación de la Actividad del Veneno y de las Fracciones de Péptidos Purificados.

4.1. Veneno de escorpión y sus efectos en las células.

Los escorpiones, a lo largo del tiempo han sido considerados como una amenaza para el hombre, principalmente por las manifestaciones clínicas que desarrolla el veneno en el momento que entrar en contacto con el organismo. Sin embargo, algunos venenos han sido empleados en medicina tradicional, por ejemplo se ha descrito en la cultura China, desde la Dinastía Song (A.D. 960-179), se han empleado los cuerpos secos y enteros del escorpión, para calmar el dolor desarrollados por enfermedades como meningitis, parálisis cerebral, reumatismo, entre otras, como también tanto los cuerpos de escorpiones como su veneno han sido empleados en el tratamiento de enfermedades neurales, tales como apoplejía, epilepsia, parálisis facial y hemiplejia (78, 146-151). A partir de estas y otras propiedades terapéuticas observadas, se han realizado diferentes estudios sobre los componentes del veneno de escorpión, siendo a los que les atribuyen los efectos terapéuticos que posee el veneno.

En los venenos de escorpión se encuentra varios componentes, de los cuales, los principales se tratan de péptidos neurotóxicos, capaces de modificar la funcionalidad de canales iónicos (68). Entre estos péptidos se han diferenciado, los péptidos o toxinas capaces de reconocer canales de sodio y clasificadas de acuerdo al sitio de unión al canal y por ende su actividad en el canal iónico (21, 152). También se encuentra en gran cantidad péptidos específicos para canales

de potasio, los cuales han sido empleados en la caracterización estructural y funcional de los canales de potasio (68, 153). Otros de los péptidos purificados y caracterizados en los venenos de escorpión, se encuentran las toxinas capaces de reconocer o actuar como ligando en los receptores de Ryanodina de los canales de calcio, toxinas empleadas para el estudio de este tipo de canales de calcio (21, 56, 58, 68). En este mismo grupo se encuentra la kurtoxin y la KLI, del veneno de *Parabuthus granulatus*, que inhiben la apertura del canal de calcio dependiente de voltaje (T-Tipo Ca^{2+}), en células germinales masculinas de ratón, proponiendo que logran alterar el funcionamiento del tejido cardíaco y neural (154). Como también las toxinas que reconocen canales de cloro, una de las identificadas en venenos de escorpión, por ejemplo en el veneno del escorpión *L. quinquestriatus*, se han identificado y caracterizado péptidos capaces de reconocer y modificar la actividad la función de los canales de cloro, uno de estos se denomina el péptido GaTx2, el cual inhibe la función del canal de cloro CIC-2 (155) y el péptido con un masa molecular de 3,7 kDa, denominado GaTx1, además de reconocer canales de cloro, es capaz de inhibir el regulador de fibrosis quística a nivel en conductancias transmembranales (156).

Otros de los efectos investigados del veneno y sus péptidos y específicamente en especies de escorpiones clasificadas en la familia Buthidae, es la antimicrobiana, por ejemplo, a partir del veneno de *Lychas mucronatus* se ha establecido que el péptido Mucroporin-M1 inhibe la replicación del virus de Hepatitis-B (157), y el péptido BmKn2, así como su derivado Kn2-7 tienen actividad sobre el virus VIH-1 (158), también se ha caracterizado la actividad del veneno y sus componentes, sobre células cancerosas. En lo cual, diversos estudios han demostrado que esta sustancia logra inhibir la proliferación del cáncer, disminuye el ciclo celular e inhibe la metástasis (149, 159, 160), en el caso de células de glioma induce la apoptosis e inhibe su crecimiento (161). Uno de los ejemplos específicos es el veneno del escorpión *Buthus martensii* Karsch, del cual, se ha observado efectos sobre líneas celulares provenientes de cáncer de mama, pulmón y próstata,

gliomas, neuroblastoma, leucemia y linfoma, (149). Otro de los ejemplos es el péptido TsAPs del veneno de *T. serrulatus* que actúa como anti-proliferante en células derivadas de tumor de pulmón, seno próstata y glioblastoma. (24). Estos efectos observados dan la posibilidad de desarrollar otras alternativas como tratamiento para el cáncer, el cual es una de las enfermedades con mayor porcentaje de mortalidad a nivel mundial. En 2015 con base a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2017 (162), las muertes reportadas a causa del cáncer fueron de 8,8 millones; en esta cifra se encuentran las muertes asociadas a los cinco tipos de cáncer más comunes a nivel mundial, como son: - Pulmonar (1,69 millones defunciones); -Hepático (788.000 defunciones); - Colorrectal (774000 defunciones); -Gástrico (754000 defunciones) y -Mamario (571000). Así, teniendo en cuenta estas cifras y los efectos reportados que desarrollan los venenos de escorpiones y sus componentes proteicos sobre las células de diferentes tipos de cáncer, en el presente trabajo se determinó que tanto el veneno como algunos de los péptidos purificados del escorpión *T. macrochirus* logran disminuir la viabilidad celular de líneas celulares provenientes de cáncer de próstata, colon, mama y cérvix, de una forma selectiva y dependiente de su concentración.

Otros de los componentes que se encuentran en los venenos de escorpión, tales como; metaloproteasas, fosfolipasas y hialuronidasa, poseen funciones o efectos específicos, que también se pueden relacionar con el efecto de toxicidad que produce el veneno, en el organismo que emponzoña. Entre las metaloproteasas, se encuentra la antareasa, la cual es el primer miembro de una nueva clase de metaloproteasas, presentes en varios géneros de escorpión (163), que fue purificada a partir del veneno de *T. serrulatus*, y se caracteriza por ser capaz de inhibir la exocitosis en el páncreas y al actuar sobre VAMP2, siendo el mecanismo responsable de la pancreatitis que causa la picadura del escorpión (142, 164).

En cuanto a las fosfolipasas, se han caracterizado en los venenos de escorpión, las fosfolipasas de tipo A2 (PLA₂), que cataliza la hidrólisis de glicerolfosfolípidos

en la posición dos, produciendo ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (165). También pueden encontrar las fosfolipasas de secreción (sPLA₂), algunos ejemplos de estas son: -La Imperatoxina y fosfolipina del veneno de *Pandinus imperator* (166, 167); la Phaiodactylipin de *Anuroctonus phaiodactylus* (168) y la Heteromtoxina (HmTx) del *Heterometrus laoticus* (127). Este tipo de enzima es de gran importancia para el escorpión, ya que interviene en el metabolismo de fosfolípidos, la inflamación, la captura y la digestión de la presa (168). Otra de las enzimas característica de los venenos de escorpión, es la hialuronidasa, cuya función principal es catalizar el ácido hialurónico presente en la matriz extracelular de las células del organismo que emponzoña (20, 169), siendo una enzima que interviene en la propagación en los venenos, facilitando la difusión de los demás componentes del veneno en los tejidos de la presa o de la víctima, originando un envenenamiento de tipo sistémico. En el veneno del escorpión *T. serrulatus*, se ha reportado este tipo de enzima (20, 22), caracterizada por tener un peso molecular de 51 kDa y además de hidrolizar el ácido hialurónico y su función puede ser alterada por otro tipo de compuestos como flavonoides (20).

Teniendo en cuenta los múltiples compuestos que poseen los venenos de escorpión y la función que poseen y que dan lugar al nivel tóxico que desarrollan en las presas o en las víctimas, en este trabajo se identificó la actividad biológica de algunos de sus componentes, logrando de esta manera realizar una caracterización funcional de algunos de los componentes del veneno de *T. macrochirus*.

4.2. Desarrollo metodológico:

4.2.1. Evaluación de la actividad citotóxica del veneno de *T. macrochirus* y sus péptidos purificados, en líneas celulares provenientes de tumores

El veneno total y las fracciones purificadas del veneno del escorpión *Tityus macrochirus*, se evaluaron en diferentes concentraciones, para observar la disminución del porcentaje de viabilidad celular de las líneas celulares provenientes de células tumorales de; colon (HT-29, obtenido de tejido de colon humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, con enfermedad adenocarcinoma colorrectal) (170), cérvix (SiHA , obtenidas de tejido de cérvix humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, con enfermedad de grado II, carcinoma de células escamosas) y HeLa, (obtenidas de tejido de cérvix humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, con enfermedad adenocarcinoma) (170); seno (MDA-MB231 o HTB-26, obtenidas de tejido de glándula mamaria/mama, derivado del lugar de la metástasis: derrame pleural, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, con enfermedad adenocarcinoma) (170), próstata (PC3, obtenidas de tejido de próstata, derivado desde el sitio de metástasis: hueso de humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, con enfermedad de grado IV, adenocarcinoma) (170) y pulmón (A549, obtenidas de tejido de pulmón de humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, con enfermedad de carcinoma) (170). Además, se empleó la línea celular MRC-5 que se deriva de tejido normal de pulmón (células adherentes tipo fibroblastos de pulmón) (170) y cultivo primario de neuronas hipocampales, que fue obtenido de embriones de 18 días de rata Wistar realizado en el Grupo de Investigación en Proteínas GRIP 2016 (171), con base a los reportado por Longart (172, 173).

El cultivo celular se realizó en medio de EMEM (para la línea celular PC3) y RPMI (para las líneas celulares PC3, HT-29; SiHa, HeLa, HTB-26, A549 y MRC-5), los dos medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino y 1% de

antibiótico-antimicótico. En el caso del cultivo primario de neuronas se empleó medio PNGM (constituido por: 2% de NSF1, 2mM de L-Glutamina; antibiótico 50 µg/mL de Gentamicina y 37 ng/mL de Amforericina- del KIT de LONZA). El crecimiento de cada una de las líneas se controló a 37 °C y 5% de CO₂. (174).

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron por triplicado de cada una de las muestras (tabla 4), sembrando 10000 células/pozo, sincronizadas por 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Una vez alcanzada la adherencia de las células, éstas se incubaron con veneno total o fracciones de péptidos purificados en un rango de concentración de 0 a 10 µg/mL. Para el control negativo, las células se trataron con medio de cultivo DMEM, RPMI o PNGM, según la línea celular, con el que se determinó el 100% de viabilidad celular y para el control positivo se empleó SDS con una concentración de 78 µg/mL en PBS.

Cada una de las líneas celulares tratadas con los estímulos (veneno ó péptidos) y sin estímulo se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por medio del método de reducción de la sal de tetrazolium (MTT) (174), empleando 20 µL de la solución de MTT con una concentración de 0,5 mg/mL y se adicionaron 100 µL del medio correspondiente a cada línea celular tratada en cada pozo. Las placas de células se incubaron por 3 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró la solución y se agregaron 100 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) a cada pozo, se incubó cada placa a 37°C por 15 minutos para disolver los cristales formados y se realizó la lectura de absorbancia a 540 nm (174). Los datos se analizaron por regresión y análisis de varianza de un factor por ANOVA TUKEY IC50 para cada línea celular, considerando un nivel de significancia de 0,01.

4.2.2. Toxicidad en mamíferos e insectos del veneno de *T. macrochirus*:

La toxicidad del veneno total y de las fracciones obtenidas en la purificación, se realizó sobre mamíferos (ratones de aproximadamente 20 g de peso corporal) e

insectos (grillos). En el caso de los ratones, se inocularon con 1 μg de cada una de las muestras por vía intracraneal, mientras que los grillos fueron inoculados con 5 μg de cada una de las muestras en el abdomen del insecto. Se emplearon un animal por cada muestra y se observaron durante 24 horas máximo y se registraron sus comportamientos durante este tiempo.

4.2.3. Actividad de péptidos purificados sobre canales de potasio

Se seleccionaron dos péptidos purificados del veneno de *T. macrochirus*, denominados FV2-16 y FV8-3, con masa molecular de 3959,03 Da y 4045,28 Da respectivamente, ya que es una de las características de toxinas con actividad en canales de K^+ . La actividad de estos dos péptidos se realizó por la técnica de patch-clamp en modo de voltaje-clamp, en células con expresión de canales de potasio hKv1.3, de acuerdo en la metodología descrita por (130, 175, 176). (Esta metodología fue realizada por Departamento de Biofísica y Biología Celular de la Universidad de Debrecen, Egyetem y el Grupo de Investigación en Biología Celular y Señalización Universidad de Debrecen Egyetem, Hungary).

4.2.4. Actividad enzimática del veneno total de *T. macrochirus*:

4.2.4.1. Actividad Fosfolipasa:

La actividad fosfolipasa se determinó mediante la hidrólisis realizada por el veneno o las fracciones con pesos moleculares mayores a 10 kDa obtenidas en la cromatografía de filtración en gel, sobre los fosfolípidos presentes en la yema de huevo (177). Para el desarrollo de este ensayo, se emplearon 36 mL de solución de NaCl al 0.86% en la cual se disolvieron 12 mL de yema de huevo. Para preparar el gel se emplearon 0,5mL de solución de yema de huevo, más 50 mL de

una solución de agarosa al 0,6% en buffer Tris 50 mM pH 7,95 y 0,5 mL de solución de CaCl_2 10 mM (Solución de fosfolípidos). Una vez obtenida la solución de fosfolípidos, se emplearon 15 mL de ésta, se agregaron 80 μL de colorante de rodamina- G y se realizaron geles de 2 mm de espesor en cajas de Petri. Una vez solidificado el gel de la solución de fosfolípidos se realizaron pozos de 2 mm de diámetro y se aplicaron en cada uno de los pozos 10, 20 y 40 μg de veneno total de *T. macrochirus*. En el caso de las fracciones de filtración en gel, se usaron 20 μg de cada una. Como patrón positivo se sembraron 20 μg de veneno total de *Vaejovis punctatus* y control negativo agua destilada. Se incubaron las cajas de Petri a 37°C por 12 horas y se observó si en cada uno de los pozos que contenían las muestras evaluadas, se dio la formación de un halo alrededor de los mismos (177).

4.2.4.2. Actividad Proteolítica:

Se evaluó la actividad proteolítica del veneno total, empleando como sustrato azocaseína (solución de 5 mg/mL en Tris HCl 50 mM pH7.95). El método se realizó por triplicado por medio de las siguientes muestras:

Muestra 1 (M1): 85 μL de solución de solución de azocaseína, con 10 μg de veneno total, 1,25 μL de solución de MgSO_4 100 mM y 1,25 μL de solución de CaCl_2 0,1 mM.

Muestra 2 (M2): 85 μL de solución de solución de azocaseína, con 10 μg de veneno total, y 1,6 μL de las soluciones de MgSO_4 100 mM; CaCl_2 0,1 mM y ZnCl_2 4 29,35mM.

Muestra 3 (M3): 85 μL azocaseína, con 10 μg de veneno total, y 5 μL de solución de ZnCl_2 29,35mM.

Blanco 1(B1). 10 μg de veneno con 85 μL de agua destilada

Blanco 2(B2). 10 μg de veneno con 85 μL de azocaseína.

Blanco 3(B3). 10 μg de veneno con 85 μL de azocaseína.

Cada una de las muestras y los blancos se incubaron a 37°C por 90 minutos; transcurrido el tiempo se centrifugaron a 1000 rpm por 5min. De la centrifugación se separaron 100 µL de cada sobrenadante, y se les adicionó 100 µL de solución de NaCl 0,5 M. Se determinó su absorbancia a 450 nm. (178, 179).

4.2.4.3. Actividad de Hialuronidasa:

Para la evaluación de esta actividad, se realizó el método turbidimétrico (180), en el cual se emplea como buffer de reacción fosfato de sodio 0,1 M pH 5,8, que contiene 0,15 M de NaCl y como sustrato se empleó una solución de ácido hialurónico 400 µg/mL en buffer fosfato de sodio pH 5,8. El exceso de ácido hialurónico resultante después del tiempo de reacción se precipitó con cetilpiridinio al 10% en agua y se realizó lectura de absorbancia a 540 nm (180). Para determinar la cantidad de ácido hialurónico degradado, se realizó una curva de calibración con diferentes cantidades de ácido hialurónico (tabla 15) y el cálculo del porcentaje de actividad se calculó, por medio de la ecuación de la recta de la curva de calibración, relacionándolo con el porcentaje de la concentración de ácido hialurónico resultante de la reacción (Ecuación 2 parte A y B) (180).

Tabla 15. Curva de calibración de ácido hialurónico. Empleado para el método de actividad de Hialuronidasa. *Corresponde a la muestra de veneno o de la fracción evaluada. El volumen usado depende de la concentración de la muestra evaluada.

MUESTRA	SOLUCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO (µL)	BUFFER pH 5,8 (µL)	ÁCIDO HIALURÓNICO [mg/mL]
1	50	50	0,2
2	40	60	0,16
3	30	70	0,12
4	20	80	0,08
5	10	90	0,04
6	5	95	0,02
7	0	100	0
8*	50	50	0,2

$$\% \text{ Ácido Hialurónico} = \left[\frac{\text{Concentración de ácido Hialurónico}}{0,2^*} \right] \times 100$$

Parte A

$$\% \text{ Actividad Hialuronidasa} = 100 - \% \text{ Ácido Hialurónico}$$

Parte B

Ecuación 2. Determinación del porcentaje de actividad de la Hialuronidasa.

Parte A: Determinación del porcentaje del ácido hialurónico resultante de la reacción.

Parte B: Porcentaje de la actividad de Hialuronidasa. *0,2 normalización de la actividad (180).

4.2.4.4. Actividad Proteolítica y de Hialuronidasa:

Esta actividad se realizó por medio de zimogramas, empleando geles de poliacrilamida de SDS-PAGE al 12%T (Anexo A). En estos geles se sembraron muestras de veneno total (20 µg) y fracciones de purificación con componentes cuyas masas moleculares fueran de más de 10 kDa (5 µg). En el caso de actividad hialuronidasa, el gel se polimerizó con ácido hialurónico a una concentración final de 400 µg/mL, mientras que para la actividad proteolítica los geles poseían una concentración final de 2% de caseína ó 2% de gelatina.

- Actividad hialuronidasa: Una vez terminada la corrida electroforética, cada uno de los geles, se incubó con buffer Tris HCl 50 mM pH 8,0, Triton-X100 al 10%, por 30 minutos. Pasado este tiempo se lavó el exceso de Triton-X100 con buffer Tris HCl 50 mM pH 8,0 dos veces, por 30 minutos y se incubación con Buffer Tris HCl 50 mM pH 8,0 que contenía NaCl 0.15 M y CaCl₂ 5 mM, por 17 horas a 37°C. Posterior a este tiempo, cada gel se lavó con agua tetradestilada dos veces, por 5 minutos.

Los geles se tiñeron con solución de 0,5% strains-all, 5% de Formamida, 20% isopropanol en Buffer Tris HCl 0.015 M pH 7.95 (esta tinción se realizó en la oscuridad, por 18 horas). La decoloración del gel se realizó con solución de 5% Formamida, 20% isopropanol en Buffer Tris HCl 0.015 M pH 7.95, agitando suavemente hasta observar las bandas de hidrólisis, momento en el cual se retiró la solución de decoloración.

- Actividad Proteolítica. Los geles se tiñeron con azul de coomassie al 0.02% en una solución 40% metanol y 10% ácido acético, durante 10 horas. Pasado este tiempo, los geles se decoloraron usando la misma solución, pero sin azul de coomassie, hasta observar las bandas de hidrólisis. (181-189, 190)

4.3. Resultados

4.3.1. Citotoxicidad del veneno total de *T. macrochirus*. en líneas celulares provenientes de cáncer.

En los resultados preliminares obtenidos del efecto citotóxico del veneno sobre diferentes líneas celulares provenientes de tumores, se observó que el veneno logró reducir la viabilidad celular de algunas de éstas, mostrando mayor efecto en la línea celulares PC3, seguido de HT-29 y MDAMB 231 (Anexo F Figura F1), (116); También se observó que la fracción parcialmente purificada del veneno total, que fue obtenida por el método de ultrafiltración, y denominada como VTnP, redujo la viabilidad celular de la línea celular HeLa hasta un 56%, diferente a lo observado por el efecto del veneno total sobre otra línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) (anexo F, Figura F-3) (116). Con base en estos resultados preliminares, se decidió ensayar las fracciones de péptidos que se encontraran en una mayor cantidad, sobre diferentes líneas celulares provenientes de tumores y

sobre un cultivo primario de neuronas, ésta última con el fin de evaluar el posible efecto neurotóxico de cada uno de los péptidos. A continuación, se describen los resultados obtenidos.

Se seleccionaron 15 fracciones de péptidos obtenidas por el diagrama de purificación descrito en el procedimiento 3 (tabla 4) y se realizó el análisis estadístico por medio de ANOVA TUKEY, a partir de los valores de IC50 calculados tanto del veneno total, como de las fracciones de péptidos purificadas, para cada una de las líneas celulares evaluadas (Anexo G, figura 29).

En el caso de la línea celular HT-29, se observó que los valores de IC50 poseen un rango de 7 a 27 ppm, destacando entre éstas, al veneno total y las fracciones 37, 42 y 33 (figura 29A). Los datos normalizados y analizados de acuerdo a los grupos de significancia, muestran que las fracciones 37 y 42 poseen un valor de IC50 menor de 10 ppm y estadísticamente se ubican dentro del mismo grupo de significancia. Otro grupo de significancia estadística similar se presentó con la fracción 33 y el veneno total con un valor de IC50 mayor de 10 ppm y menor de 15 ppm (figura 29A). Las fracciones con IC50 mayor de 15 ppm se ubican en otros grupos de significancia, la fracción 36 que reportó un valor mayor de IC50 con respecto a las demás fracciones, lo que indica que este tipo de péptido realiza un efecto no significativo sobre esta línea celular (figura 29A). En la línea celular HBT-26, los valores de IC50, son mayores de 15 ppm, lo que indica que para observar un efecto sobre esta línea celular es necesario mayor concentración tanto de las fracciones como del veneno total. La fracción 38, presentó el mayor valor de IC50, lo que podría indicar que este péptido no desarrolla un efecto citotóxico significativo, mientras que la fracción 42 presenta menor valor de IC50, siendo esta fracción la candidata para lograr un mayor efecto sobre esta línea celular (figura 29B). En cuanto en la línea celular HeLa, se observó mayor cantidad de fracciones con efecto citotóxico, destacando el veneno total y las fracciones 36, 38, 44, 32, 37, 42 y 35, ya que muestran un valor de IC50 menor de 10 ppm, mientras que las fracciones 34 y 46 presentan menor efecto citotóxico,

de acuerdo al valor de IC50 determinado (figura 29C). En PC3, el veneno total posee un IC50 cercano a 50 ppm, lo que puede indicar que para lograr un mayor efecto en esta línea y con respecto a los resultados observados anteriormente (116), se debe tratar la línea celular con una concentración mayor a 10 µg/mL, comportamiento similar a la fracción 46. Situación diferente se observa en las fracciones 35, 38, 2, 36, 44, 33 y 49 ya que el valor de IC50 se encuentra por debajo de 20 ppm, y pertenecen a grupos donde no poseen diferencia significativa entre ellas (figura 29D).

Por último, en el cultivo primario de neurona, se observó el efecto citotóxico con un IC50 menor de 20 ppm de todas las fracciones evaluadas, destacando a la fracción de péptido 35 con un valor de IC50 menor de 5 ppm, el cual es muy similar al obtenido para el veneno total (figura 29E). De acuerdo a estos resultados se evidencia el efecto neurotóxico del veneno total y de los péptidos obtenidos y este efecto es característico para los venenos de escorpión (figura 29E).

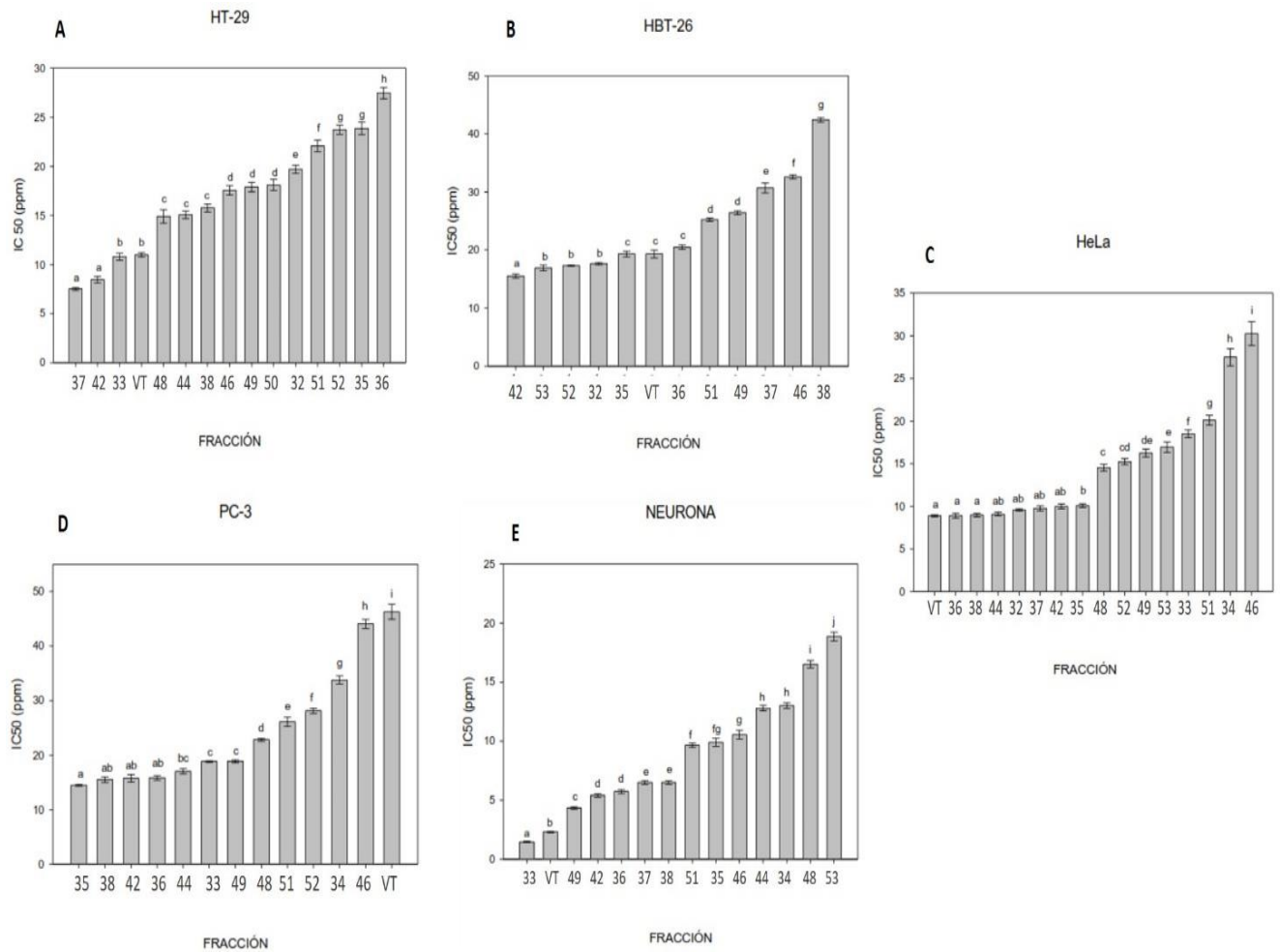


Figura 29. Actividad citotóxica que desarrolla en diferentes líneas celulares, el veneno total de *T. macrochirus*, y sus fracciones purificadas y parcialmente purificadas de péptidos

A. Citotoxicidad desarrollada en la línea celular HT-29, **B.** Citotoxicidad desarrollada en la línea celular HBT-26, **C.** Citotoxicidad desarrollada en la línea celular HeLa, **D.** Citotoxicidad desarrollada en la línea celular PC3, **E.** Citotoxicidad desarrollada en cultivo primario de neurona. Se nota que cada una de las líneas el efecto citotóxico lo realiza un numero diferente de fracciones de péptidos (VT= Veneno Total).

Al comparar el efecto citotóxico del veneno total de *T. macrochirus*, se observa que donde realiza mayor efecto es sobre el cultivo primario de neuronas (figura 29E), seguido y con un valor similar de IC50 en las líneas celulares de HT-29 y, HeLa, (figura 29 A y C), mientras que en las líneas celulares donde presenta menor efecto citotóxico es en HBT-26, con un valor de IC50 cercano a 20ppm, seguido de un valor mayor de 40 ppm del IC50 sobre PC3. En cuanto a las fracciones de péptidos, y con base al valor de IC50, se logra observar que en cada una de las líneas evaluadas se puede presentar selectividad debido a que el efecto citotóxico en cada una de ellas es diferente (figura 29). Aunque se destacan las fracciones 35, 36, 42, 46, 49 y 51, porque realizan un efecto citotóxico en las cinco líneas celulares, se encontró que se diferencian en el valor de IC50 observado ya que, por ejemplo, la fracción 36, desarrolla mayor efecto en neurona, seguido del efecto generado sobre HeLa, PC3, HBT-26 y por último HT-29 donde presenta el mayor IC50 con respecto a las demás fracciones evaluadas (figura 29).

4.3.2. Toxicidad en mamíferos e insectos del veneno de *T. macrochirus*:

Los ensayos de toxicidad del veneno total de *T. macrochirus*, de los péptidos puros y de las fracciones de péptidos parcialmente purificadas obtenidas directamente del veneno sobre mamíferos (ratones) e insectos (grillos) mostró diferencia en la actividad que presentan algunos de éstos, especialmente se logró observar que algunas fracciones de péptidos desarrollaron toxicidad con mayores manifestaciones en mamíferos que en insectos (tabla 16).

Tabla 16. Toxicidad del veneno de *T. macrochirus*, y sus fracciones de péptidos puros y parcialmente purificados, en mamíferos e insectos.

Muestra	Toxicidad en ratones	Tiempo de muerte	Observaciones	Toxicidad en Grillos	Tiempo de muerte	Observaciones
Sin inocular	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna	-	Comportamiento Normal
Agua	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna	-	Comportamiento Normal
Veneno Total	Letal	16 min	-Convulsiones, -Temblor, -Giros repetitivos y rápidos antes de morir	Letal	17h5min	Parálisis, arrastra las patas, Movimientos lentos
48	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
51	Letal	2 min	Convulsiones, Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos, Chillidos	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
55	Letal	35 min	Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos, Temblor.	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
49-9	Letal	2h10min	Movimientos lentos, Giros repetitivos y rápidos antes de morir	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
49-10	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
49-11	Letal	1h5min	Movimientos lentos, Giros repetitivos y rápidos antes de morir	Letal	18h	Parálisis, arrastra las patas, Movimientos lentos
49-12	Letal	1h17min	Movimientos lentos, Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos antes de morir	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
51-1	Letal	1h8min	Movimientos lentos, Temblor Convulsiones	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
51-2	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna	-	Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
51-3	Letal	4min	Convulsiones Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos, Chillidos	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
51-4	Letal	7min	Salivación, Temblor convulsiones	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
51-5	Letal	2min	Temblor, Convulsiones	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
52-14	Letal	5min	Salivación, Temblor, Respiración acelerada Convulsiones	Ninguna	*	Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
53-13	Letal	21min	Movimientos lentos, Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos antes de morir	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
53-15	Ninguna	-	Inicialmente presenta síntomas de toxicidad: Movimientos lentos, Respiración acelerada, Realizó volteretas Saltos repentinos, Chilla, Temblor, Sensibilidad, Quieto y parálisis de las extremidades superiores Se queda mucho tiempo sobre las patas, Después de dos horas vuelve a su comportamiento normal. Y se mantuvo con vida	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
54-11	Letal	6min	Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos, Temblor.	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
54-12	Letal	3min	Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos, Temblor.	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas

54-15	Letal	58min	Movimientos lentos, Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos antes de morir	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
55-9	Letal	18min	Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos, Temblor.	Letal	17h	Parálisis, arrastra las patas, Movimientos lentos
55-10	Letal	46min	Movimientos lentos, Respiración acelerada	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
57-16	Letal	2h17min	Movimientos lentos, Quieto, Giros rápidos y Repetitivos antes de morir	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
57-17	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
61-4	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
61-5	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
61-6	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
61-7	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
61-8	Ninguna	-	Comportamiento Normal	Ninguna		Arrastra la patas, movimientos rápidos y normales. sobrevivió después de 24 horas
FV16-15	Letal	2 min	Convulsiones, Pierde equilibrio			No Evaluado
FV5-3			Comportamiento Normal			No Evaluado
FV15-6			Pierde el equilibrio, vuelve a su comportamiento normal			No Evaluado
FV14-12	Letal	46 min	Temblor, Espasmos, Giros repetitivos y rápidos antes de morir			No Evaluado
FIV1-8			Comportamiento Normal			No Evaluado
FV16-17	Letal	5 min	Movimientos lentos, Giros repetitivos y rápidos antes de morir			No Evaluado
FV13-11	Letal	71 min	Movimientos lentos, Respiración acelerada, Giros repetitivos y rápidos antes de morir			No Evaluado
FV17-11	Letal	10 min	Movimientos lentos, Temblor y convulsiones			No Evaluado
FV4-8			Movimientos lentos, Vuelve a su comportamiento Normal			No Evaluado
FV17-12	Letal	9 min	Pierde el equilibrio, Giros repetitivos y rápidos, Aumenta la Orina			No Evaluado
FV18-3			Comportamiento Normal			No Evaluado
FV3-21			Movimientos lentos, Salivación, Vuelve a su comportamiento normal			No Evaluado
FV7-22	Letal	30 min	Respiración acelerada, Giros rápidos y repetitivos y Convulsiones			No Evaluado
FV2-16	Letal	25 min	Respiración acelerada, Giros rápidos y repetitivos y Convulsiones			No Evaluado
FV2-34	Letal	10 min	Movimientos lentos, Temblor y convulsiones			No Evaluado

4.3.3. Actividad en canales iónicos.

Se emplearon 100 nM de los péptidos FV2-16 y FV8-2 purificados (tabla 11) y se les determinó su actividad sobre canales de potasio dependiente de voltaje tipo hKv1.3. La inhibición de este tipo de canal se observó cuando se usó el péptido FV8-2 ya que mostró un comportamiento similar al control positivo, correspondiente a Tetraetilamonio (TEA) (191), disminuyendo el potencial eléctrico del canal casi en un 50% de su actividad normal. En el caso del péptido FV2-16, no se observó acción sobre el canal y se observó un comportamiento similar al generado por el control negativo, manteniendo el potencial eléctrico del canal (figura 30).

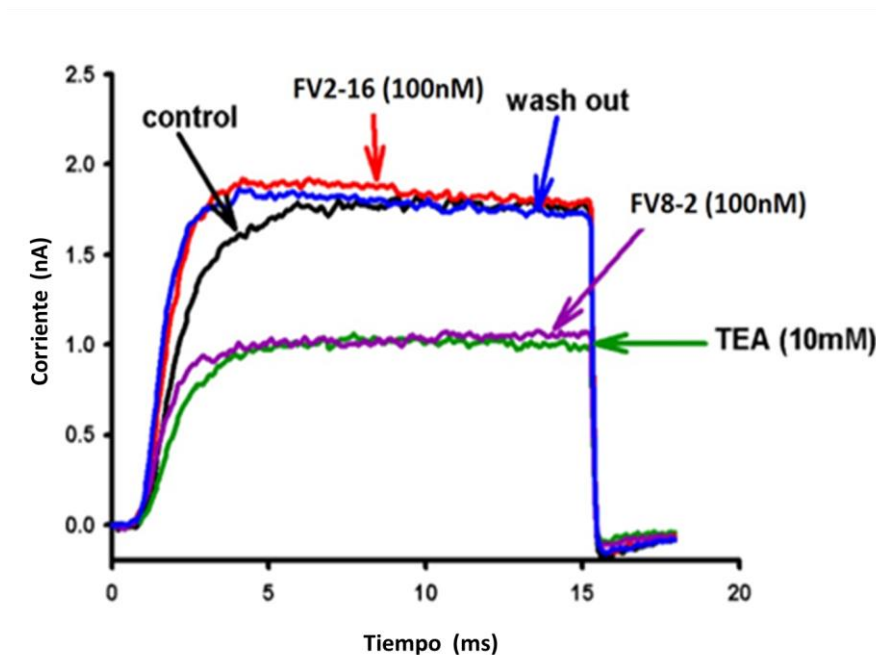


Figura 30. Identificación de la actividad de dos péptidos purificados del veneno de *T. macrochirus*, en el canal hKv1.3.

Línea negra corresponde al control negativo; la línea verde al control positivo (TEA). El péptido que muestra actividad en el canal corresponde a la línea morada (FV8-2) y el que no presenta actividad en línea roja (FV2-16).

4.3.4. Actividad enzimática del veneno total de *T. macrochirus*:

4.3.4.1. Actividad Fosfolipasa:

De acuerdo al método, el resultado fue negativo para la determinación de actividad de fosfolipasas tanto en del veneno de *T. macrochirus*, como en las fracciones de proteína evaluadas, observándose un comportamiento similar al del control negativo (figura 31A), evidenciándose la ausencia de formación del halo alrededor del pozo donde se sembró la muestra.

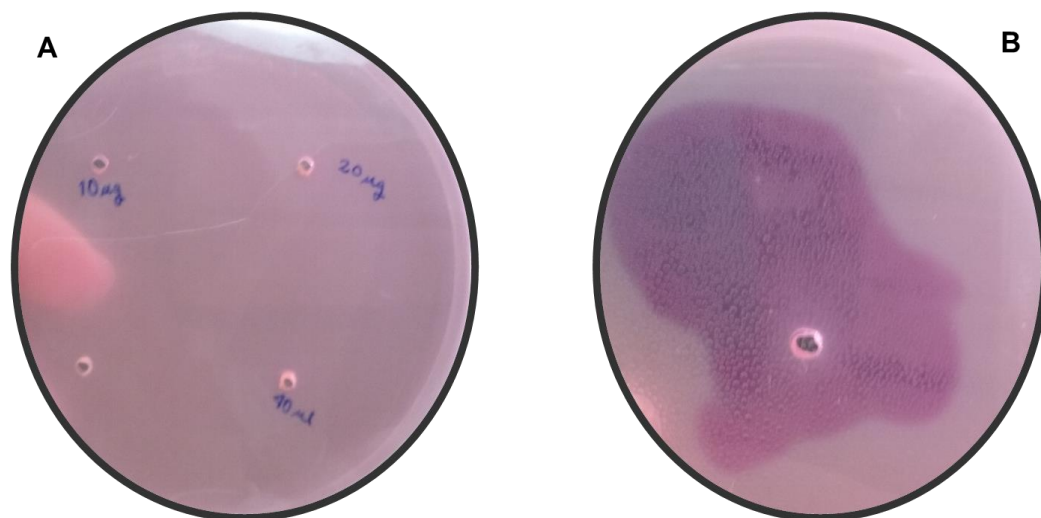


Figura 31. Identificación de fosfolipasas en el veneno de *T. macrochirus*.

A. Placa donde se sembró el veneno total de *T. macrochirus* (10, 20, 40 µg) y el control negativo 20 µL de agua destilada). **B.** Placa donde se sembró el control positivo 20 µg de veneno total de *Vaejovis punctatus*.

4.3.4.2. Actividad Proteolítica:

- Degradación de la azocaseína:

Teniendo en cuenta el primer método para determinar la presencia y actividad de proteasas en el veneno de *T. macrochirus* (empleando como sustrato azocaseína), no se observó una diferencia mayor a 0,2 unidades entre las absorbancias obtenidas por el veneno y los controles correspondientes, por lo que se puede indicar que la actividad de proteasa es baja en este veneno (Tabla 17), aunque es importante corroborar este dato por un segundo método.

Tabla 17. Actividad de proteasa del veneno total de *T. macrochirus*, empleando como sustrato azocaseína.

Muestra	M1	BM1	M2	BM2	M3	BM2
Unidades de Absorbancia	0,162	0,135	0,11	0,078	0,063	0,063
	0,181	0,136	0,109	0,079	0,064	0,074
	0,17	0,132	0,107	0,082	0,061	0,078
Promedio	0,171	0,134	0,109	0,080	0,063	0,072
Diferencia	0,0367		0,0290		-0,0090	

M1, M2, M3: indican el tipo de muestra que se empleó en el ensayo (descrito en la metodología). **BM1, BM2, BM3:** indican los controles negativos para cada muestra.

- Zimogramas de actividad proteolítica del veneno *T. macrochirus*.

Los zimogramas se realizaron, utilizando como sustrato caseína y gelatina al 2% por separado y empleando tripsina y colagenasa (1 mg/mL) como control positivo. En cada uno de los ensayos realizados se corroboró el resultado obtenido con la azocaseína ya que no se logró observar actividad del veneno sobre ninguno de los sustratos. De acuerdo a estos dos resultados se concluye que en el veneno

de *T. macrochirus* no se encuentra actividad proteolítica o sus componentes proteolíticos están en muy baja concentración (Figura 32).

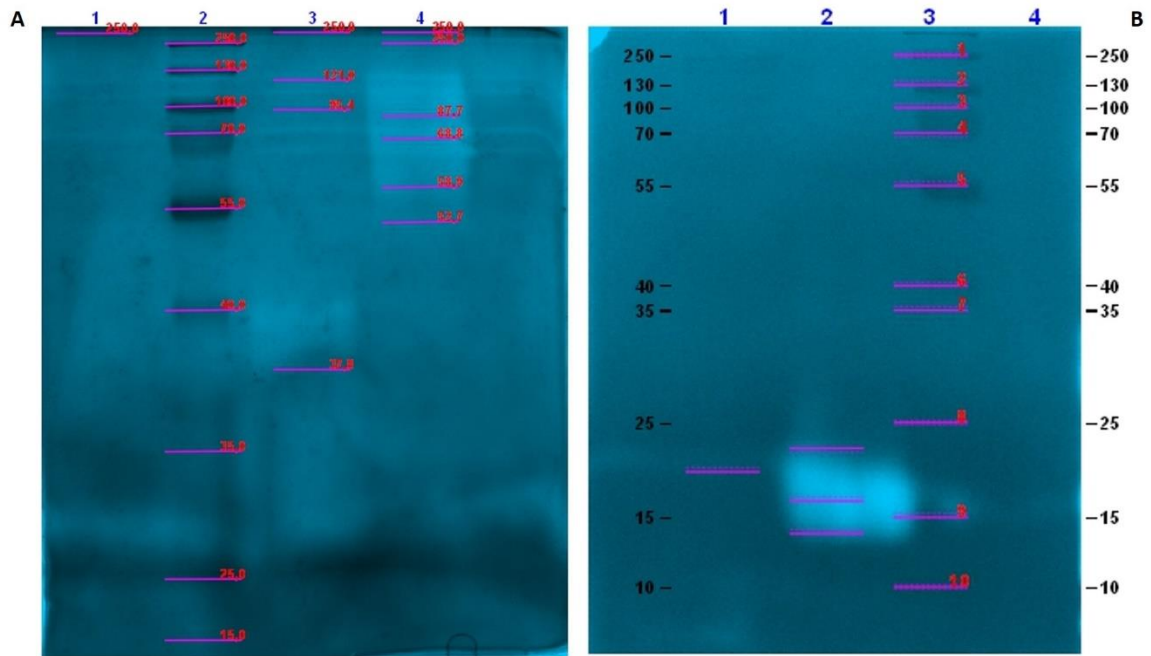


Figura 32. Identificación de la actividad proteolítica del veneno de *T. macrochirus*. Por medio de Zimograma, empleando como sustrato gelatina y caseína.

A. Zimograma con gelatina: 1. 20 µg de veneno total de *T. macrochirus*, 2. Marcador de peso (Thermo Fisher®). 3. 1 mg/mL de tripsina. 4. 1 mg/mL de colagenasa. **B.** Zimograma con caseína. 1. 1 mg/mL de colagenasa, 2. 1 mg/mL de tripsina. 3. Marcador de peso (Thermo Fisher®). 4. 20 µg de veneno total de *T. macrochirus*

4.3.4.3. Actividad de Hialuronidasa:

- **Método turbidimétrico:** Este método permitió determinar el porcentaje de actividad de Hialuronidasa que posee 5 µg tanto del veneno total de *T. macrochirus*, como las fracciones purificadas por filtración en gel (Fracciones FI a FIV).

Los porcentajes de actividad se calcularon a partir de las absorbancias obtenidas en el procedimiento y se relacionaron con la ecuación de la recta (Figura 33) y la ecuación 2 (tabla 18).

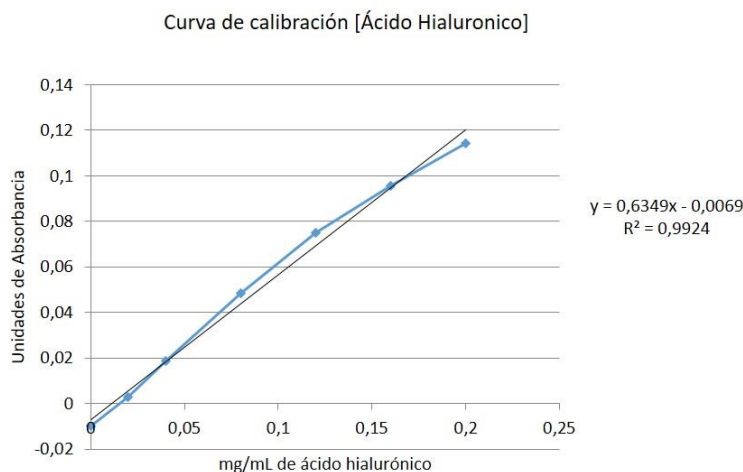


Figura 33. Grafica de la curva de calibración de concentración de ácido hialurónico, para medir la actividad de hialuronidasa en el veneno de *T. macrochirus*.

Curva de calibración de concentración de patrón de actividad de hialuronidasa, empleada para el desarrollo del procedimiento de turbidimetría y el cálculo de la concentración de ácido hialurónico resultante.

Tabla 18. Datos de absorbancia y cálculo de la actividad de Hialuronidasa del veneno de *T. macrochirus* y las fracciones I a IV.

Muestra	Promedio absorbancia	[Ácido Hialurónico mg/mL]	Parte A Ecuación 2		Parte B Ecuación 2
			Normalización	%[Ácido Hialurónico no hidrolizado]	%Actividad Hialuronidasa
Veneno Total	0,03	0,05	0,27	27,32	72,68
FI	0,04	0,08	0,38	38,34	61,66
FII	0,05	0,08	0,41	40,90	59,10
FIII	0,05	0,09	0,46	45,82	54,18
FIV	0,08	0,14	0,68	67,68	32,32

A partir de los datos obtenidos (tabla 18), se determinó que el veneno total de *T. macrochirus* posee un 72% de actividad de hialuronidasa, mientras que las fracciones purificadas por filtración en gel, con peso molecular entre 35 a 44 kDa, poseen un porcentaje de 61% en FI; 59% en FII; 54% en FIII y 32% en FIV (figura 34).

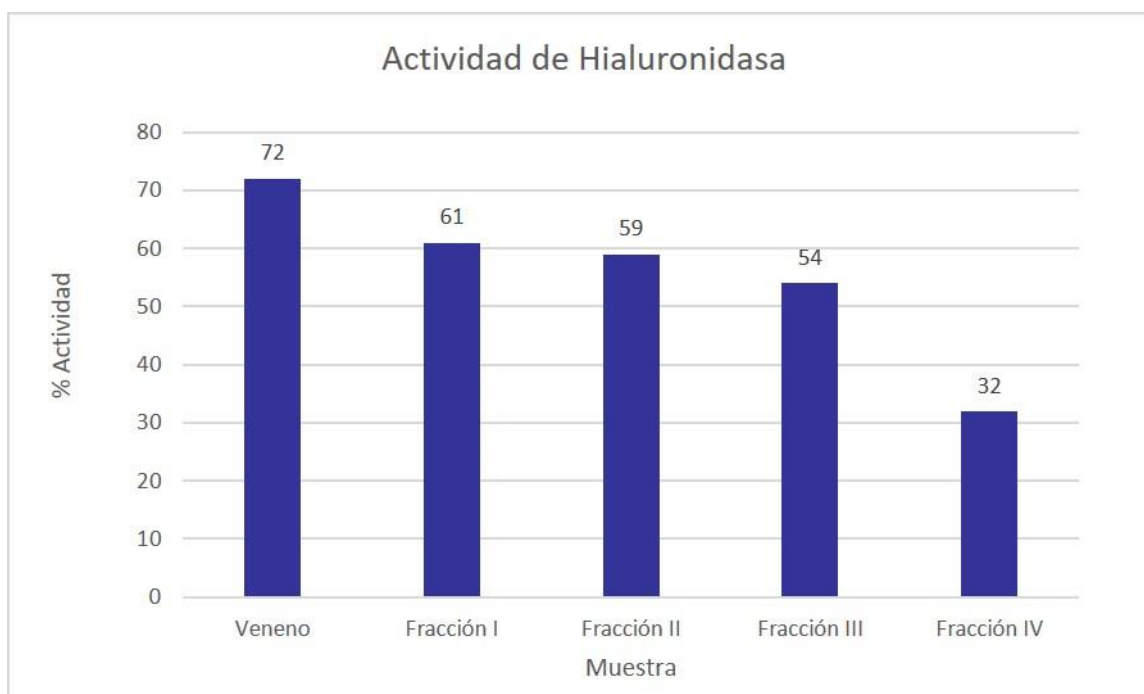


Figura 34. Porcentaje de la actividad de Hialuronidasa.

Se muestra el porcentaje de la actividad enzimática del veneno de *T. macrochirus* y las fracciones FI a FIV, calculado la ecuación 2. De cada una de las muestras se emplearon 5µg.

- **Zimogramas de la actividad del veneno *T. macrochirus*. y las fracciones FI a FIV:** El zimograma se realizó utilizando ácido hialurónico como sustrato, en el gel. Como control positivo se empleó la enzima Hialuronidasa en una concentración de 1 mg/mL. Como se observa en la figura 34, la actividad Hialuronidasa se evidencia tanto en el carril del veneno total, como en el de las fracciones FI y FII, ya que se forma una zona blanca en un peso molecular entre 40 y 55 kDa para las tres muestras evaluadas (figura 35). De acuerdo a

estos resultados se concluye que el veneno de *T. macrochirus* posee actividad de una enzima tipo Hialuronidasa y que ésta se encuentra en las fracciones FI y FII obtenidas de la filtración en gel presentando un peso molecular aproximado de 47 kDa (figura 35).

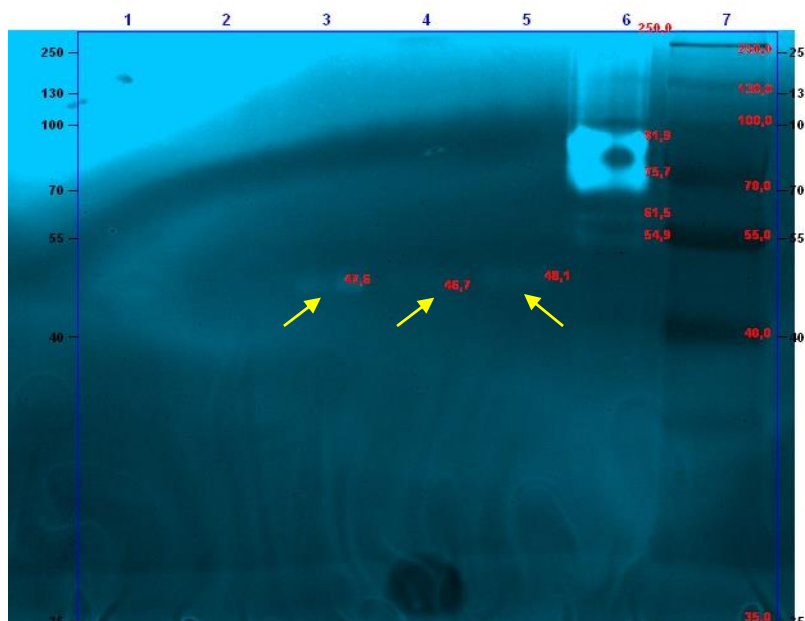


Figura 35. Identificación de la actividad de hialuronidasa, en el veneno de *T. macrochirus*, y de las fracciones FI, FII, FIII y FIV. Por medio de Zimograma, empleando como sustrato ácido hialurónico.

Carril 1. 5 μ g de la Fracción FIV, **Carril 2.** 5 μ g de la Fracción FIII. **Carril 3.** 5 μ g de la Fracción FII. **Carril 4:** 5 μ g de la Fracción FI. **Carril 5.** 20 μ g de veneno total de *T. macrochirus*, **Carril 6.** 1 mg/mL de enzima Hialuronidasa y **Carril 7:** Marcador de peso molecular (Thermo Fisher). Las flechas de color amarillo, indican la banda de digestión del ácido hialurónico, realizada por las fracciones FI, FII y el veneno total.

4.4. Análisis de resultados.

4.4.1. Citotoxicidad en líneas celulares provenientes de tumores

Hasta la fecha, gran parte de los péptidos presentes en diferentes venenos de escorpión se han caracterizado de forma estructural y funcional. Con el transcurso del tiempo, se ha aumentado el interés hacia estas toxinas y se han caracterizado como base para el desarrollo de medicamentos dada su gran especificidad y selectividad hacia canales iónicos u otros componentes de la célula (192, 193). Uno de los grandes retos que ha planteado la venómica en general, es el de hallar las aplicaciones terapéuticas de los componentes de los venenos para llegar a proponer un medicamento con una actividad específica. En el caso del cáncer, se han tenido en cuenta los reportes sobre varios venenos de escorpiones y sus péptidos, que logran inhibir proliferación, inducir apoptosis y ser selectivos y específicos en diferentes tipos de cáncer, convirtiéndose en una fuente potencial de nuevos agentes terapéuticos contra esta patología (17, 149, 193, 194, 108, 109, 195, 110, 111, 100, 109). De acuerdo a lo anterior, uno de los objetivos en este trabajo fue determinar si el veneno total de *T. macrochirus*, y las fracciones de péptidos purificadas desarrollan efectos citotóxicos en células derivadas de tumor, reduciendo su porcentaje de viabilidad, a partir de diferentes concentraciones.

A partir de resultados preliminares, donde se mostró la posible selectividad de este veneno hacia algunas líneas celulares (116), se realizaron otros ensayos con el veneno total y fracciones de péptidos purificados en cuatro líneas celulares (PC3, HT-29, HBT-26, HeLa) y cultivo primario de neuronas.

En la línea PC3, se observó que tanto el veneno total como las fracciones de péptidos realizan un efecto citotóxico, con un valor de IC50 entre 15 a 50 ppm (figura 29D). Resultados similares se han reportado con otros venenos de escorpión en donde se observa este efecto a partir de un rango de concentración

de proteína de 6 a 100 µg/mL del veneno total (116, 149, 196). De las fracciones de péptidos que presentaron efecto citotóxico sobre esta línea celular se destacan la fracciones 38 y 42. Es importante recordar que el péptido presente en la fracción 38 posee una masa molecular de 3666,56 Da, mientras que la fracción 42 posee un péptido de 3566 Da y que en este trabajo no se logró identificar su secuencia de aminoácidos parcial ni totalmente. Sin embargo, al presentar pesos similares al de la Clorotoxina, se predice que podrían estar reconociendo metaloproteasas de las células de cáncer de próstata, como ha sido descrito previamente para esta toxina (197). Del mismo modo, la actividad citotóxica se evidenció en fracciones que presentaban una mezcla de péptidos, como las fracciones 35, 36, 44, 33 y 49, donde las cuatro primeras poseen péptidos con masa molecular en un rango de 3000 a 4500 Da (Tabla 4), y la fracción 49 que está compuesta por dos péptidos con masa molecular superior a 7000 Da, donde uno de estos es el péptido denominado Tmac48 del cual se identificó la secuencia de su segmento amino terminal (Tabla 4, 5 figura 23). Teniendo en cuenta los pesos moleculares de los péptidos donde se observó efecto citotóxico en PC3, así como la caracterización realizada como posibles toxinas específica para canales de sodio o potasio y los reportes previos sobre este efecto por toxinas de escorpión, el resultado observado sobre esta línea celular posiblemente se debe al incremento de los factores apoptóticos como Bax/Bcl2, los cuales inducen la apoptosis mediada por mitocondria (196), o a la inducción del estrés oxidativo en las células (196, 198).

En cuanto a la línea HT-29, se obtuvieron valores de IC50 en un rango de 5 a 30 ppm, destacándose el veneno total de *T. macrochirus* y la fracción 33, por presentar el valor menor de IC50. Respecto a esta fracción 33, se encontró que está compuesta por dos péptidos con pesos moleculares de 4108,71 y 3959,39 Da, de los cuales no se logró identificar sus secuencias. Resultados similares se obtuvieron con las fracciones 37 y 42, que por presentar el mismo peso molecular (3566 Da) puede tratarse del mismo péptido, razón por la que reportaron un valor

de IC50 similar, por lo cual se predice que los péptidos 37 y 42 pueden ser selectivos y específicos, para la línea HT-29, siendo una característica de otros péptidos de venenos de escorpión que realizan mayor efecto en una línea derivada de cáncer en particular (100, 60). El mecanismo propuesto, realizado tanto por el veneno de diferentes escorpiones sobre HT-29 se ha atribuido a su capacidad de afectar la movilidad celular y por ende la formación de colonias, siendo una de las características de este tipo de cáncer, disminuyendo la actividad de la Kinasa de adhesión focal (FAK) (199, 200), por lo que se postula que el veneno de *T. macrochirus* podría tener un mecanismo similar sobre esta línea celular.

En cuanto a la línea celular HBT-26, los valores de IC50 se encuentran en un rango de 10 a 42 ppm, donde la fracción 38 presentó mayor valor de IC50 y la fracción 42, el menor (figura 29B). Si se comparan estos dos péptidos se encuentra que se diferencian inicialmente por su masa molecular (tabla 4), característica estructural que podría estar involucrada en la actividad que realizan sobre esta línea celular, lo cual podría argumentar la especificidad que poseen los péptidos en el reconocimiento y efecto citotóxico que desarrolla en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer (60, 103). El efecto que podría realizar el veneno de *T. macrochirus* y sus péptidos en la línea HBT-26, podría asemejarse al de otros venenos que inducen la apoptosis y generan el bloqueo del ciclo celular desde las fases G₀/G₁ hasta la fase S (201), así como también podrían elevar la producción de NO, por estimulación de la óxido nítrico sintasa, siendo un factor esencial para la necrosis del tumor induciendo la apoptosis en este tipo de línea celular (101). Otro de los mecanismos propuestos es que el veneno y sus componentes sean capaces de elevar la actividad de la Caspasa-3, aumentando así la lisis de la línea celular de cáncer de seno, como lo reportado en otros venenos de escorpión (101).

Con respecto a la línea celular HeLa, varias fracciones de péptidos presentaron efecto citotóxico a concentraciones menores a lo reportado anteriormente (figura

29C, Anexo F) (116). De acuerdo a los resultados se predice que los responsables del efecto citotóxico son algunos de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, ya que las fracciones 37, 38, 42 lograron obtener un valor de IC50 menor de 10 ppm, similar a las fracciones que poseen mezcla de péptidos, como son 36, 44, 32 y 35, donde se encuentran péptidos que poseen masas moleculares similares (Tabla 4, figura 29C). Estos péptidos posiblemente logran inducir apoptosis, por la sobre expresión de *p53* y *Bax*, baja expresión de *bcl-2* y un incremento de la actividad de caspasas 3, 8, 9, como ha sido reportado previamente con toxinas similares sobre esta línea celular (60).

Por último, la citotoxicidad en cultivo primario de neurona, los resultados mostraron un claro efecto neurotóxico, característico de los venenos de escorpión y en particular de sus péptidos, ya que estos últimos tienen como principal acción modular la función de canales iónicos específicos (68).

De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta los pesos moleculares de los péptidos purificados (tabla 12 y 13), se encuentra que estos podrían estar relacionados con otros péptidos que realizan efectos citotóxicos en diferentes líneas celulares provenientes de cáncer (60, 100, 202, 194, 108). En este grupo de péptidos se destaca el péptido Tmac48, que por sus características estructurales, puede tratarse de un péptido con actividad específica sobre canales de sodio, lo que argumenta su actividad sobre el cultivo primario de neurona (150), pero también se relaciona con otras toxinas con esta especificidad que han mostrado actividad citotóxica sobre las líneas celulares PC3 y HeLa, por lo que se ha asociado dicha actividad anti proliferativa al posible reconocimiento de canales de sodio presentes en estas líneas celulares (104, 203).

En general, se pueden proponer diferentes mecanismos sobre los efectos citotóxicos que realiza el veneno de *T. macrochirus* y sus péptidos, sobre líneas celulares derivada de cáncer. En este sentido y relacionando con las

características estructurales de los péptidos identificados en el presente trabajo, se postulan los siguientes mecanismos como los más posibles a generarse por el veneno del veneno de *T. macrochirus* sobre las líneas celulares evaluadas:

- Por el reconocimiento y modificación de la actividad de los canales iónicos de K^+ , Ca^{++} o Cl^- , lo que conlleva a la inducción apoptosis o inhibición del crecimiento de la célula cancerosa (108, 109, 203, 204).
- Selectividad del veneno y sus péptidos, por el reconocimiento hacia un tipo de genes específicos de cada línea celular (205).
- Inhibición en la actividad enzimática de la Metaloproteasa- 2 de Matriz (MMP-2) (206, 99).
- Disminución de la neovascularización de las células cancerosas, por la modulación de los receptores de señalización asociados a la angiogénesis (199, 207, 208);
- Inducción de apoptosis, al activar la actividad de la Caspasa-3, semejante a lo que desarrolla el veneno de *O. doriae* en líneas celulares de HeLa y SH-SY5Y (209, 101, 210).

Es importante mencionar que este trabajo es el primero que se desarrolla con el veneno del escorpión *T. macrochirus*, por lo que los resultados acá obtenidos son la base para desarrollar futuros trabajos en el área que respondan a varios de los interrogantes que quedan planteados sobre el tema y uno de los más importantes es el posible mecanismo que desarrolla cada una de las fracciones para generar una respuesta citotóxica sobre una línea celular específica.

4.4.2. Toxicidad del veneno total de *T. macrochirus*, y péptidos parcial y totalmente purificados.

Los venenos de escorpión del genero *Tityus* se componen de sustancias como sales inorgánicas, aminoácidos libres, enzimas, proteínas y péptidos. Sin

embargo, la composición puede variar de género a género e inclusive de especie a especie. Debido a la ubicación geográfica o alimentación de la especie a estudiar se pueden encontrar diferentes proporciones o incluso tipos de péptidos en su composición y esta característica puede relacionarse directamente con la necesidad de encontrar moléculas específicas que tengan efecto sobre las especies que entren en contacto con el veneno producido por estos escorpiones (211-214, 68).

En el género *Tityus* se han identificado neurotoxinas que actúan sobre canales de sodio y de potasio (215), con una estructura tridimensional bien definida donde se encuentran una α -hélice y tres o cuatro hojas- β antiparalelas, que se estabilizan por dos o cuatro puentes disulfuro (68, 216, 217). Debido a estas características estructurales, se asume que el veneno de escorpión logra desarrollar toxicidad en mamíferos e insectos. (68, 215, 218).

Teniendo en cuenta estas características, los péptidos purificados del veneno del escorpión *T. macrochirus*, podrían ser de tipo α -Toxina o β -Toxinas clásica NaScTx_s, dado a la toxicidad desarrollada en mamíferos, que se encuentra relacionada con sus características estructurales, como el peso molecular, la cantidad de residuos de cisteína que presenta (tabla 13), como también se puede atribuir al sitio del canal de sodio que reconoce, siendo diferente en canales de sodio de insectos y de mamíferos (219-221). De esta manera, los péptidos purificados del veneno de *T. macrochirus*, se pueden relacionar con toxinas identificadas y caracterizadas de venenos del género *Tityus*; por ejemplo, con las toxinas Ts3 y Ts5 del escorpión *T. serrulatus*, TbTx5, Tb3 del escorpión *T. bahiensis* y Tst3 del escorpión *T. stigmurus* (215).

4.4.3. Actividad en canal iónico hKv1.3.

Las fracciones evaluadas para la identificación en el canal hKv1.3, fueron seleccionadas por su masa molecular, siendo una de las características de los péptidos o toxinas de venenos de escorpión que reconocen canales de potasio (222, 223). A pesar que el péptido FV2-16, tanto por su peso molecular como por su estructura primaria era un buen candidato para catalogarlo como una toxina dentro de la familia de KTx (224), en los resultados de electrofisiología no reporto ninguna actividad frente al canal hKv1.3, lo que puede indicar que este péptido posea actividad y especificidad sobre otra clase de canal de potasio o su actividad dependa de una concentración determinada, diferente de la que se utilizó en la prueba (222), como también puede que sea específico a otro tipo de canal iónico como calcio o cloro (17, 225, 226). En el caso del péptido FV8-2 se encontró que éste si modificó el potencial eléctrico del canal hKv1.3 (figura 30), por lo que se puede clasificar como un péptido de la familia KTx, en el que seguramente se podría encontrar el motivo denominado “la pareja esencial”, la cual se trata de un residuo de Lisina junto a otro aminoácido de tipo aromático que realizan la unión al canal de potasio (130, 227).

4.4.4. Actividad enzimática del veneno de *T. macrochirus*:

En los venenos de escorpión se han identificado además de péptidos, una serie de enzimas como fosfolipasas, hialuronidasas y proteasas. En los venenos de *T. serrulatus*, *T. bahiensis* y *T. stigmurus*, se ha identificado la presencia de estos componentes a partir de análisis transcriptómicos, pero su actividad en el veneno puede ser muy baja o nula. Por ejemplo, en los transcritos de *T. serrulatus*, se identificó la presencia de fosfolipasas, pero su actividad en el veneno es nula (228-230). Esta situación se ha presentado en otros venenos con la actividad de

diferentes enzimas, por lo que algunos autores proponen que este tipo de compuestos son “débiles” y pueden dañarse durante el periodo de procesamiento proteico, mientras que la información se conserva en el transcriptoma del animal (215, 230). Esta puede ser la causa por la cual se puede explicar la falta de actividad tanto de fosfolipasa y proteasa en el veneno de *T. macrochirus* (Figuras 31 y 32, tabla 17), pero la presencia de péptidos con alguna similaridad a alguna de estas enzimas en el análisis de masas (tabla 14)

La actividad hialuronidasa se identificó en el veneno total de *T. macrochirus*, y en las fracciones FI y FII obtenidas por filtración en gel, (tabla 6, figura 19). Resultados similares a lo reportado en otros venenos tanto del mismo género (*Tityus*), como de la misma familia (Buthidae) (20, 212, 231). La presencia de esta proteína en el veneno de *T. macrochirus*, es de gran importancia, ya que favorece o ayuda a la absorción y transporte del veneno en los tejidos del organismo en el que el escorpión emponzoña su veneno y contribuye al desarrollo de la sintomatología local o sistemática del envenenamiento (232). Este mecanismo es desarrollado debido a que la hialuronidasa cataliza la degradación de ácido hialurónico, que se encuentra en la matriz extracelular en el tejido conectivo, ayudando a que los demás componentes del veneno se transporten con facilidad en el tejido (169). Pessini, y colaboradores (20), realizaron la identificación y caracterización de la hialuronidasa en el veneno de *T. serrulatus*, caracterizándola como una proteína de 51 kDa, peso molecular muy cercano al determinado en la actividad de hialuronidasa del veneno de *T. macrochirus*, (46 a 48 kDa), (figura 35). Del mismo modo, este peso molecular observado se encuentra en el rango de peso molecular de las hialuronidasas reportadas en venenos de serpientes, abejas y escorpiones (33 a 110 kDa) (20, 212, 231, 233). De esta manera se puede afirmar que en el veneno de *T. macrochirus* se encuentra una enzima con actividad de hialuronidasa, siendo éste el punto de partida para su posterior caracterización, al proponer el método de filtración en gel para lograr su purificación.

Capítulo 5.

5. Modelamiento de estructura tridimensional de péptidos

5.2. Estructura tridimensional de los péptidos presentes en venenos de escorpión

Cada escorpión, independientemente de su clasificación taxonómica, posee en su veneno una serie de componentes que varía de acuerdo a su ubicación geográfica, el clima y la alimentación. A la fecha se han diferenciado venenos que poseen desde 72 componentes como es el caso del veneno de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, hasta 600 componentes en el veneno de *Mesobuthus tumulus* y *T. serrulatus* (118, 234). De esta manera los polipéptidos reportados, cada vez aumentan por las caracterizaciones bioquímicas que se han realizado a diferentes venenos, partiendo de la gran diversidad de especies de escorpiones que se encuentran en el mundo. En 2017 en la base de datos UniProt (www.uniprot.org/program/Toxins), se han registraron aproximadamente 953 secuencias obtenidas de venenos de escorpión, de las cuales 762 son toxinas (UniProt 2017, consultado mayo 20 de 2017).

De todos los componentes de los venenos de escorpión, los más comunes y analizados son los péptidos o toxinas capaces de modificar la permeabilidad de los canales iónicos, tanto en células excitables como en las no excitables. Este tipo de toxinas se agrupan en una única clase estructural con un motivo denominado “ α/β estabilizada por cisteína (CS- α/β)”; sin embargo, existen otros motivos estructurales identificados en otras toxinas de estos venenos (68, 235). En general estos péptidos se pueden clasificar con base en cuatro criterios:

- El tipo de canal iónico que reconoce, entre los que están el canal de sodio, potasio, cloro y calcio;
- El tipo de receptor al que la toxina se enlaza; -
- La estructura tridimensional de la toxina y
- El tipo de respuesta que induce, ya sea por inactivación o activación del receptor.

A partir de este tipo de clasificación, se pueden relacionar dos de las características numeradas, permitiendo relacionar la estructura con la función de cada una de los péptidos. Por ejemplo, en las toxinas que reconocen los canales de Na^+ , se diferencian dos motivos estructurales; la familia $\beta\alpha\beta\beta$ - y la familia $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ - (216, 217). Teniendo en cuenta el número de residuos de cisteína, se diferencian tres motivos estructurales conservados: α -hélice con 3 ó 4 residuos de cisteína, hoja β_3 con 6 de cisteína y hoja β_2 con 2 cisteínas. En cuanto a las toxinas específicas a canales de potasio, éstas son clasificadas en cuatro familias: α , β , γ y κ -KTx (21, 57, 68). Dentro de estas clases de toxinas, existen dos tipos de motivos estructurales:

- El primero hace referencia a una o dos α -hélices conectadas a un conjunto de tres β -hojas antiparalelas y estabilizadas por tres o cuatro puentes disulfuro, denominadas $\text{CS}\alpha\beta$ (21, 89)
- El segundo corresponde a un pliegue α -hélice-loop-hélice ($\text{CS}\alpha\alpha$), formado por dos α -hélice cortas, conectadas por un loop, (Este motivo solo se observa en las κ -KTx) (82, 236-238);.

Por último, entre las toxinas que reconocen canales de Ca^{++} , se diferencian las que reconocen los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, los independientes de voltaje y los activados por ligando. Estructuralmente este tipo de toxinas se generalizan por ser péptidos de cadena corta, aproximadamente hasta 33 o 35 residuos de aminoácidos que son estabilizados por tres puentes disulfuro. A

pesar que no se han identificado motivos estructurales conservados, con base en la estructura de la Imperatoxin A (IpTxa), donde se observa que solo el 9% de sus residuos adoptan una estructura helicoidal y el 18% estructura de lámina beta (61, 239, 240), (PDB: 1IE6)

De acuerdo con estas características y la metodología desarrollada, se predijo la estructura tridimensional del péptido FV2-16, del *T. macrochirus*, clasificándola estructuralmente como una toxina específica para canal de potasio. Además, con los amino terminales de los demás péptidos purificados, se predijo su estructura y posible función de acuerdo al alineamiento de cada uno de estos.

5.3. Desarrollo metodológico

5.3.1. Alineamiento de secuencias de péptidos obtenidos a partir del proceso de purificación del veneno de *T. macrochirus*.

Una vez obtenidas las secuencias parciales ó completas de los péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, (capítulo 3, tablas 13 y 14), se realizó inicialmente una disminución de la redundancia por medio del programa Decrease Redundancy (http://web.expasy.org/decrease_redundancy/), usando un valor de 98% como punto de corte de similaridad para eliminar secuencias. Posteriormente, con las secuencias obtenidas sin redundancia, se realizó un alineamiento múltiple usando el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con los parámetros por defecto para proteínas. Los resultados obtenidos del alineamiento se sometieron a Simple Phylogeny

(http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=simple_phylogeny)

para hacer un análisis de la secuencias en cuanto a su agrupamiento y determinar los grupos de toxinas encontrados en la secuenciación realizada. Se

realizó un árbol de matriz de distancias, sin excluir los gaps y usando un método de agrupamiento tipo UPGMA.

Alineamientos individuales de cada una de las secuencias también se realizaron en el servidor Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast), opción Blastp, usando una matriz BLOSUM62, penalización por gap de existencia:11 y extensión:1, en búsqueda no redundante y umbral de 10.

5.3.2. Predicción de la estructura tridimensional del péptido FV2-16 del veneno de *T. macrochirus*.

Teniendo en cuenta que se tiene la secuencia completa de uno de los péptidos, se realizó el modelamiento estructural del péptido FV2-16, obtenido por secuenciación automática degradación de Edman (capítulo 3 Tabla 13). El modelamiento se realizó por tres servidores principalmente: por HHPred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred>) (241) e I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (242) que permiten hacer un análisis de la secuencia y a partir de una metodología de “threading”, generan un modelo tridimensional de la secuencia ingresada. Sin embargo, teniendo en cuenta que la secuencia corresponde a un péptido y no a una proteína, se realizó también un modelamiento usando la herramienta PepFold3 (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>), la cual usa un algoritmo tipo modelo oculto de Markov para generar la estructura tridimensional de péptidos entre 5 y 50 aminoácidos de extensión (243)

5.4. Resultados

5.4.1. Alineamiento de secuencias de péptidos obtenidos a partir del proceso de purificación del veneno de *T. macrochirus*.

De los procesos de secuenciación automática por EDMAN y huella peptídica por MS/MS, se obtuvo un total de 42 secuencias que corresponden a segmentos de secuencias de péptidos o proteínas en su mayoría y una secuencia completa. Por medio de la herramienta Reduce Redundancy se redujo la cantidad de secuencias a 35, indicando que algunas secuencias se identificaron en más de una fracción como es el caso de la fracción FVI3-8 que comparte una identidad superior al 98% con la fracción FV2-21, al igual que la fracción 51-11 con la fracción 49-9. Igualmente sucede con las fracciones obtenidas por MS/MS, donde los péptidos MS-23-8 y MS-23-6 corresponden prácticamente a la misma secuencia, al igual que los péptidos MS-14-1, MS-15-20 y MS-13-11 que comparten esa alta identidad y los péptidos MS-13-12, MS-17-22 y MS-12-17. El alineamiento obtenido permitió generar un cladograma de las secuencias, identificándose algunos grupos que corresponden a una posible actividad de cada secuencia en el veneno del escorpión *T. macrochirus* (figura 36). El cladograma obtenido inicialmente muestra la división de dos grandes grupos, en los cuales el primer grupo reúne secuencias relacionadas con actividad enzimática, específicamente tipo metaloproteasa, mientras que el segundo grupo muestra secuencias relacionadas con actividad de toxina con especificidad sobre algún tipo de canal iónico. Hay una secuencia que llama especialmente la atención pues se encuentra en el límite de los dos grupos, pareciendo pertenecer más al primero que al segundo, pero que por su similitud con toxinas de canales iónicos se ubica intencionalmente en el cuadro de color azul. Este hecho se justifica también por la distancia reportada entre esta secuencia y las demás que se encuentran en el grupo rojo (figura 36)

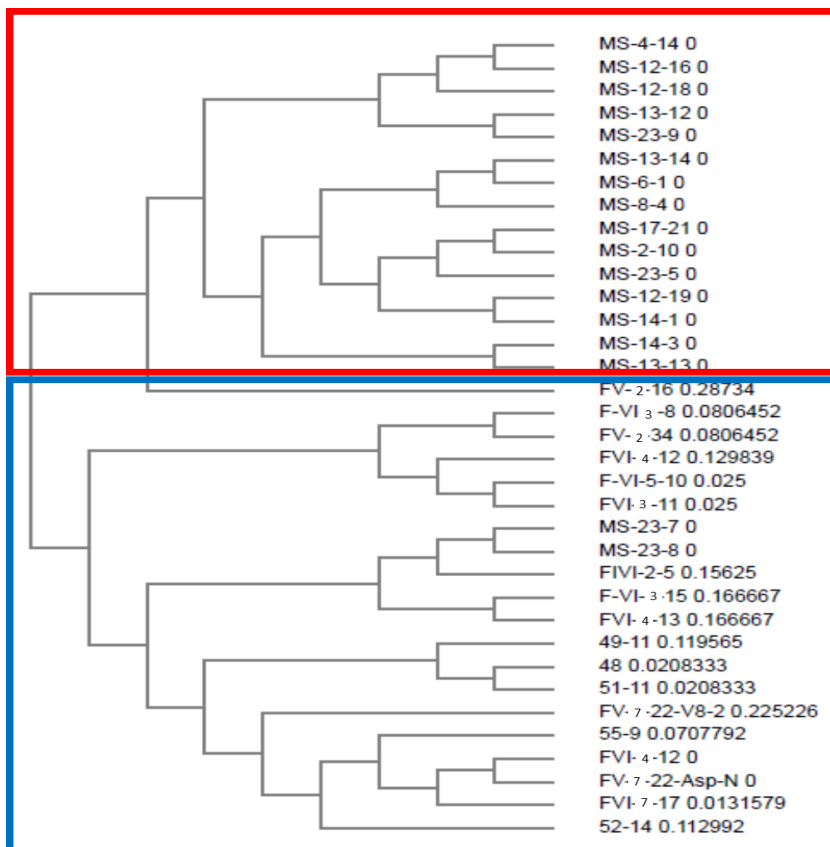


Figura 36. Cladograma que muestra el agrupamiento de las secuencias obtenidas por diferentes métodos.

Se muestra la formación de dos grupos claramente diferenciados, en los que el primer Grupo reúne secuencias relacionadas con actividad enzimática (cuadro rojo), mientras que el segundo grupo reúne secuencias relacionadas con actividad sobre canales iónicos (cuadro azul).

Teniendo en cuenta que el objetivo principal del trabajo se enfoca en los péptidos presentes en el veneno del escorpión y que de acuerdo al cladograma presentado en la figura 36 éstos se encuentran en el segundo grupo, se realizó alineamiento individual de cada una de estas secuencias contra la base de datos para identificar su posible función. En este sentido, el péptido FV2-16, reportó un 64-67% de identidad con toxinas identificadas como inhibidoras de canales de potasio, y de canales de calcio derivadas de veneno de escorpión pertenecientes a la familia Buthidae (tabla 19).

Tabla 19. Pocentaje de identidad del péptido FV2-16.

El porcentaje de identidad se realizo por BlastP. Color amarillo indica los residuos de aminoácidos identicos en las tres secuencias, el color rosa residuos de aminoácidos identicos en dos secuencias y el color azul residuos de aminoácidos similares.

Péptido/Límite de lineamiento	Identidad																										Código	% Identidad	Organismo											
FV2-16/1-37	G	C	N	K	L	G	R	K	C	D	S	D	S	D	C	C	R	Y	G	E	R	C	L	S	L	G	S	G	Y	F	C	K	V	D	P	G	A	—	—	<i>T. macrochirus</i>
pMeK Tx30-3/28-63	C	P	S	L	G	K	P	C	N	S	N	K	D	C	C	P	Y	G	E	R	C	L	S	A	G	E	G	Y	F	C	K	E	D	P	G	P	KF612542.1	67	<i>M. eupeus</i>	
Toxina Canal de Calcio Tx758/28-63	G	C	N	R	L	N	K	K	C	N	S	D	G	D	C	C	R	Y	G	E	R	C	I	S	T	G	V	N	Y	C	K	P	D	F	G	B8XH22.1	67	<i>B. occitanus israelis</i>		

Respecto a la secuencia obtenida para el péptido identificado como Tmac48, se encontró similitud con al menos 15 secuencias con un porcentaje de identidad mayor al 65%, destacándose la toxina denominada Putative beta-neurotoxin del veneno de escorpión *Tityus pachyurus* (39), que posee un 92% de identidad con este péptido (tabla 20).

Tabla 20. Resultados del alineamiento del amino terminal del péptido Tmac48, por medio de Blastp.

Se muestran los péptidos que poseen un porcentaje de identidad mayor al 50%. Los residuos de aminoácidos resaltados indican la diferencia con respecto a la secuencia obtenida para el amino terminal del péptido Tmac48.

Organismo	Código y Nombre	Límite de Lineación	%Identidad	Secuencias
<i>T. macrochirus</i>	Tmac48	1a 28	—	G G K E G Y P L N T S W G X K S G X F F G T N S W X K T - - - K X K A
<i>T. obscurus</i>	H1ZZI4 Toxin To15	19a 45	86%	G G K E G Y P L D S - G C K A G C F F G T N S W C N T
<i>T. pachyurus</i>	H1ZZI8 Toxin Tpa7	21a 44	92%	K E G Y P L D T L N G C K V G C F F G T N S W C
<i>T. zulanus</i>	Q11165 Toxin Tz2 (Fragment)	6a 33	71%	G G K E G Y L L D K S N G C K R S C F F G S T S W C N T
<i>T. pachyurus</i>	PODL25 Putative beta-neurotoxin (Fragment)	1a 24	88%	G G K E G Y P L N S S N G C K S G R F A G T N S
<i>T. discrepans</i>	C9X4K4 Toxin TdNa6	19a 46	71%	G G K E G Y L L D R S N G C K R S C F F G S T S W C N T
<i>T. discrepans</i>	POCF39 Bactridin-1	10a 25	81%	G C K Y S C F F G T N S W C N T
<i>T. discrepans</i>	C9X4K3 Toxin TdNa5	30a 45	81%	G C K Y S C F F G T N S W C N T
<i>T. fasciolatus</i>	P83435 Alpha-toxin Tf4	1a 18	68%	G K E G Y P A D - S K G C K V T C F F
<i>T. bahiensis</i>	P60275 Insect toxin TblT-1	1a 18	68%	G K E G Y P V D - S R G C K V T C F F
<i>C. limpidus limpidus</i>	P45667 Toxin Cll1	1a 17	71%	K E G Y L V N K S T G C K Y G C F
<i>T. costatus</i>	Q5G8A8 Toxin-like TcoNTxP1	19a 36	68%	G G K E G Y P A D - S K G C K V T C F
<i>C. limpidus limpidus</i>	Q7Z1K6 Toxin Cll5c	18a 34	71%	K E G Y L V N K S T G C K Y G V F
<i>Centruroides noxius</i>	P45664 Toxin CngtIII	20a 36	71%	K E G Y L V N K S T G C K Y G C F
<i>C. limpidus limpidus</i>	Q7YT61 Toxin Cll5c	20a 36	71%	K E G Y L V N K S T G C K Y G C F
<i>C. limpidus limpidus</i>	Q7Z1K7 Toxin Cll5b	20a 36	71%	K E G Y L V N K S T G C K Y G C F

Respecto a las demás secuencias encontradas, los alineamientos mostraron una alta similitud con toxinas que actúan sobre canales iónicos y que se han reportado previamente en otros venenos de escorpión (tabla 21).

Tabla 21. Tipos de péptidos y porcentaje de identidad de los aminos terminales purificados del veneno de *T. macrochirus*.

Péptido	Nombre	Secuencia de aminoácidos	% Identidad	Referencia
Péptido Purificado	48	GGKEGYPLNTSWGCKSGCFFGTNSWCNTECKXKA	80,6	(39)
Péptido Similar	Putative beta-neurotoxin (<i>T. pachyurus</i>)	GGKEGYPLNS SNGCKSGRFA GTNSNENTEC KGXDAENGY		
Péptido Purificado	49-9	GGKEGYPLNTSNGCKSGCFF GTNSX	87,5	(39)
Péptido Similar	Putative beta-neurotoxin (<i>T. pachyurus</i>)	GGKEGYPLNS SNGCKSGRFA GTNSNENTEC KGXDAENGY		
Péptido Purificado	51-11	GGKEGYPLNTSNGCKSGCFFGTNS	87,5	(39)
Péptido Similar	Putative beta-neurotoxin (<i>T. pachyurus</i>)	GGKEGYPLNSSNGCKSGRFAGTNSNENTECKGXDAENGY		
Péptido Purificado	49-11	GGKEGYPLNTSNGDKNGYFFGVXI	92,3	(39)
Péptido Similar	Putative beta-neurotoxin (<i>T. pachyurus</i>)	GGKEGYPLNSSNGCKSGRFAGTNSNENTECKGXDAENGY		
Péptido Purificado	52-14	KKEGYLVGND GCFYGCFTRAAQXYE	89,5	(244)
Péptido Similar	Putative sodium channel toxin (<i>T. cambridgei</i>)	KKEGYLVGND GCKYGCITRPHQYCVHECELKRGTDGYCAYWLACYCYNMP DWVPTWSRAT NKCKGK		
Péptido Purificado	55-9	GKEGYWGNDCDYGCFTRDAQY	77,3	(39)
Péptido Similar	Beta-mammal toxin Tpa2 (<i>T. pachyurus</i>)	KKEGYLVGNDGCKYSCFTRPAQYCVHECELKRGTDGYCAYWLACYCYNMP DHVRTWSRAT NRCGS		
Péptido Purificado	FV2-34	LDGYPLSKHNYCKIYCPDDEVCKESCIRAG	80,6	(244)
Péptido Similar	Putative sodium channel toxin <i>T. obscurus</i>	LDGYPLSKNN YCKIYCPNDE VCKDTCKNRAGATNGKGDCI WKNCYCYDV		
Péptido Purificado	FV3-15	KKDDYPVDTAERNCKFECNIVVDKGYCXNL	77,8	(244)
Péptido Similar	Putative sodium channel toxin <i>T. obscurus</i>	KDDYPVDTAK RNCMLDCNIL DDKGYCDKFCCKGRKADSGYC YKLKAACYCY GLPDDSPTKT SGRGNPNLR		
Péptido Purificado	FV3-13	KKDDYPVDTAKRNCKFPCNVIDXEGYCSNN	81,15	(33)
Péptido Similar	Toxin To14 <i>T. obscurus</i>	KKDDYPVDTAKRNCLDCNVWDDGYCDKFCCKGRKADSGYCYKLKAACYCY YGLPDDSPTKTSGRCNPNVR		
Péptido Purificado	FV4-8	LDGYPLSKHNYCKIYCEDDAMCKNSCKIRAGAXNK	76,5	(48); (33)
Péptido Similar	Toxin To6 <i>T. obscurus</i>	LDGYPLSKNNYCKIYCPDEKVCCKWVCKHRAGATNGKGDCI NKGICYDYVAPGTEMYPGRLPCNPY		
Péptido Purificado	FV6-10	LDGYPLSKVNNCKIYCPDDE	90	
Péptido Similar	Toxin To7 <i>T. obscurus</i>	LDGYPLSKNNYCKIYCPDEKVCCKWVCKHRAGATNGKGDCI NKGICYDYVAPGTEMYPGRLPCNPY		(48); (33)
Péptido Purificado	FV7-22	GXLVXNDGCKYQCFIWQAQY	78,6	
Péptido Similar	Toxin Td4 <i>T. discrepans</i>	GVLVNDGCKY SCFTRPGTYCANECRSRVKGDGYCYAWMACYCYSPNWWKTDWRATNRC GRGK		(245); (33)
Péptido	FVI3-5	KEGYLVGSKGCKLECV	75	(246) (247)

Purificado				(245, 248).
Péptido Similar	Alpha-like toxin CsEv5 <i>Centruroides sculpturatus</i>	KDGYPVDSKGGCKLSCVANNYCDNQCKMKKASGGHCYAMSCYCEGLPENAK VSDSATNIC		
Péptido Purificado	FVI3-11	LDGYPLSKVNNCKIYCPDDDTCTC-----EGYLVGNDECK	90,9	
Péptido Similar	Toxin To7 <i>T. obscurus</i>	LDGYPLSKIN NCKIYCPDDD VCKWTCKHRAGATNGKGDCCI WYGCYCYDVA PGTKMYPGSS PCYA		(48); (33)
Péptido Purificado	FVI3-12	LDGYPLSKVNNCKIYCPDPTX-----DVPNTKMYPG	44,8	(244)
Péptido Similar	Putative sodium channel toxin <i>T. obscurus</i>	LDGYPLSKNN YCKIYCPNDE VCKDTCKNRAGATNGRGDCI WKNKYCYDVA PGTKMYPGRL PCNA		
Péptido Purificado	FVI6-17	KKEGYLVGNDGCKYGCFTPAQYCESECSLRXGT	85,3	(39)
Péptido Similar	Beta-mammal toxin Tpa2 <i>T. pachyurus</i>	KKEGYLVGND GCKYSCFTRP AQYCVHECEL RKGTDGYCYA WLACYCYNMPDHVRTWSRAT NRCGS		
Péptido Purificado	FVI8-3	YGCFTPAQYCESECSLRK	78,9	(39)
Péptido Similar	Beta-mammal toxin Tpa2 <i>T. pachyurus</i>	KKEGYLVGND GCKYSCFTRP AQYCVHECEL RKGTDGYCYA WLACYCYNMPDHVRTWSRAT NRCGS		

Para cada amino terminal obtenido, se calculó la cantidad de residuos de aminoácidos faltantes en cada una de las secuencias, teniendo en cuenta el peso molecular identificado (Tabla 22).

Tabla 22. Secuencias de amino terminales de los péptidos purificados del veneno de *T. macrochirus* y cálculo de aminoácidos faltantes en cada una de las secuencias.

Nombre del Péptido	Peso Molecular	# A. A. Amino terminal	Peso molecular Teórico	Secuencia	#A.A. Faltantes
48	7147,19	35	3801,49	GGKEGYPLNTSWGCKSGCFFGT NSWCNTECKKXKA	33,47
F49-9	7147,92	25	2536,96	GGKEGYPLNTSNGCKSGCFF GTNSX	46,1
F51-11	7147,82	24	2425,63	GGKEGYPLNTSNGCKSGCFFGT NS	47,2
F49-11	7146,94	24	2545,98	GGKEGYPLNTSNGDKNGYFFGV XI	46
F52-14	7388,5	25	2831,36	KKEGYLVGND GCFYGCFTRAAQXYE	45,5

F55-9	7389,57	22	2505,63	GKEGYWGNDCDYGCFTTRDAQ Y	48,8
FV2-34	7429,54	31	3532,22	LDGYPLSKHNYCKIYCPDDEVCK ESCXIRAG	38,9
FV3-13	7822,66	30	3492,14	KKDDYPVDTAERNCKFECNIVVD KGYCXNL	43,2
FV3-15	4834,54	30	3449,03	KKDDYPVDTAKRNCKFPCNVIDX EGYCSNN	13,7
FV4-8	7462,45	35	3964,76	LDGYPLSKHNYCKIYCEDDAMCK NSCKIRAGAXNK	34,8
FV6-10	7155,06	20	2286,56	LDGYPLSKVNNCKIYCPDDE	48,6
FV7-22	7389,32	20	2359,09	GXLVXNDGCKYQCFIWQAQY	50,2
FVI3-5	7008,7	16	1713,04	KEGYLVGSKGCKLECV	52,8
FVI3-11	7154,16	38	3685,08	LDGYPLSKVNNCKIYCPDDDTTC-- ----EGYLVGNDECK	34,6
FVI3-12	7156,16	31	3473,13	LDGYPLSKVNNCKIYCPDTX----- DVPNTKMYPG	36,75
FVI6-17	7374,43	34	3775,45	KKEGYLVGNDGCKYGCFTTRPAQ YCESECSLRXGT	35,9
FVI8-3	7389,5	19	2241,54	YGCFTTRPAQYCESECSLRK	51,3

5.4.2. Predicción de la estructura tridimensional del péptido FV2-16 del veneno de *T. macrochirus*.

A partir de la secuencia del péptido FV2-16 purificado del veneno de *T. macrochirus*, que consta de 37 residuos de aminoácidos, con 6 residuos de cisteína, en las posiciones Cys2, Cys9, Cys15, Cys16, Cys23 y Cys32 se generaron varios modelos estructurales. Teniendo en cuenta la cantidad de residuos de cisteína (figura 37), se predice que la estructura tridimensional del péptido FV2-16, está estabilizada por tres puentes disulfuro.

1	5	10	15	20	25	30	35																													
G	C	N	K	L	G	R	K	C	D	S	D	S	D	C	C	R	Y	G	E	R	C	L	S	L	G	S	G	Y	F	C	K	V	D	P	G	A

Figura 37. Secuencia de aminoácidos del péptido FV2-16.

La estructura primaria consta de 37 residuos de aminoácidos, de los cuales en negrilla se resaltan los 6 residuos de cisteína. Estos residuos pueden estar implicados en la formación de tres puentes disulfuro.

La secuencia de aminoácidos del péptido FV2-16, se sometió al análisis estructural por I-TASSER, donde se predijo la estructura secundaria por medio de la herramienta PSSpred, con un score de confiabilidad de 5.3 (Figura 38).

	1	5	10	15	20	25	30	35																													
Secuencia	G	C	N	K	L	G	R	K	C	D	S	D	S	D	C	C	R	Y	G	E	R	C	L	S	L	G	S	G	Y	F	C	K	V	D	P	G	A
Predicción	C	C	C	H	H	C	C	C	C	C	C	C	C	C	H	H	H	H	H	H	H	H	C	C	C	C	C	S	S	C	C	C	C	C	C	C	C
Score	9	2	0	0	1	4	4	3	4	7	8	6	2	2	7	7	7	6	3	4	7	8	7	5	3	8	8	7	0	2	4	6	8	9	9	9	8

Figura 38. Predicción de la estructura secundaria del péptido FV2-16.

Se muestra cada una de los tipos estructurales predichos y el score de cada uno de los residuos de aminoácidos que conforman el péptido FV2-16. (H: Hélice; S: Hebra; C: Coil).

En la predicción de la estructura secundaria para FV2-16, el servidor I-TASSER, normalizó los datos por el factor- B (figura 38). De acuerdo al comportamiento de dicha gráfica, los valores que se encuentran por debajo del umbral (cero) son los residuos con mayor probabilidad a adoptar una estructura secundaria más estable. Teniendo en cuenta esta información, se predice que la estructura secundaria del péptido FV2-16, está conformada por cuatro regiones Coil (C), dos hélices alfa (H) y una hoja beta (S) (figuras 38 y 39).

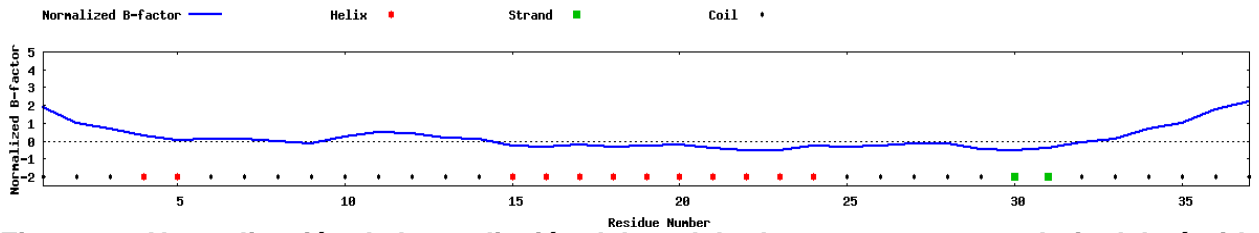


Figura 39. Normalización de la predicción del modelo de estructura secundaria del péptido FV2-16 de *T. macrochirus*

Los valores inferiores a cero indican la estabilidad de la estructura en el punto determinado.

Para la predicción del modelo tridimensional, el servidor I-TASSER seleccionó 10 plantillas (moldes de proteínas) de la base de datos de PDB, con base en los valores de alineamientos pareados que realiza al ser mayores de 1, indica que el alineamiento es confiable (figura 40).

Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Sec. Str	Seq
							20
						CCCHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCSSCCCCC	
						GCNKLGRKCDSDSDCCRYGERCLSLGSGYFCKVDPGA	
1	3asiA	0.31	0.27	0.86	1.82	GPS---TTQEDS--CSNQGVCLQQWDGFSKDCSMGP	
2	1mm8A	0.18	0.19	0.76	0.27	-----CDREADIHAYLQDKLAHNERFVVRSKHP-	
3	1h9hI	0.40	0.32	0.81	1.80	GCPRILIRCKQSDC-LAG--CVCGPNG-FCGSP---	
4	1lmrA	0.36	0.22	0.68	1.18	DCLPRGSKCLGNKQCKKYANRCVGV-----	
5	1lmrA	0.36	0.22	0.68	0.83	DCLPRGSKCLGNKQCKKYANRCVGV-----	
6	2po8A	0.39	0.41	0.89	1.68	-CPKILKKRRRSDCPG---ACICRGNGYCGSGSDGG	
7	1lmrA	0.36	0.22	0.68	1.13	DCLPRGSKCLGNKQCKKYANRCVGV-----	
8	1emxA	0.52	0.35	0.68	0.37	DGKLFSGDTNADCC-----EGYWCKLDW--	
9	1emxA	0.45	0.35	0.78	1.14	DGKLFSGDTNADCC E-GYVC-----RLWCKLDW--	
10	1di0A	0.29	0.27	0.95	1.73	ICTGADRPCAACCPCCP-GTSCKAESNGVYCRKDEP-	

Figura 40. Alineamiento de 10 secuencias con mayor identidad al péptido FV2-16 y valor de Z-score de cada uno de los alineamientos realizados.

Con base en los moldes identificados, se generaron 5 posibilidades de modelo tridimensional para el péptido FV2-16, de los cuales se seleccionó el que presentó un valor de C-Score mayor a -1,5. Sin embargo, este modelo consta de 4 hojas plegadas beta, antiparalelas y una región larga de Coil (figura 41A), lo que va en contraposición a lo predicho por el mismo servidor en cuanto a estructura secundaria.

Los resultados obtenidos por PepFold3 fueron similares a la predicción de estructura secundaria, mostrando una estructura con una hélice alfa en su interior (figura 41B). Sin embargo, la ubicación de los residuos de cisteína en esta estructura, no permiten la formación de los puentes disulfuro predichos por la cantidad de estos residuos. Teniendo en cuenta este aspecto, HHPred generó un modelo que tal vez se aproxime más a la estructura funcional del péptido, pues muestra una sola hélice alfa (figura 41C), y los residuos de cisteína se encuentran ubicados de tal manera, que permiten la formación de tres puentes disulfuro (figura 41C).

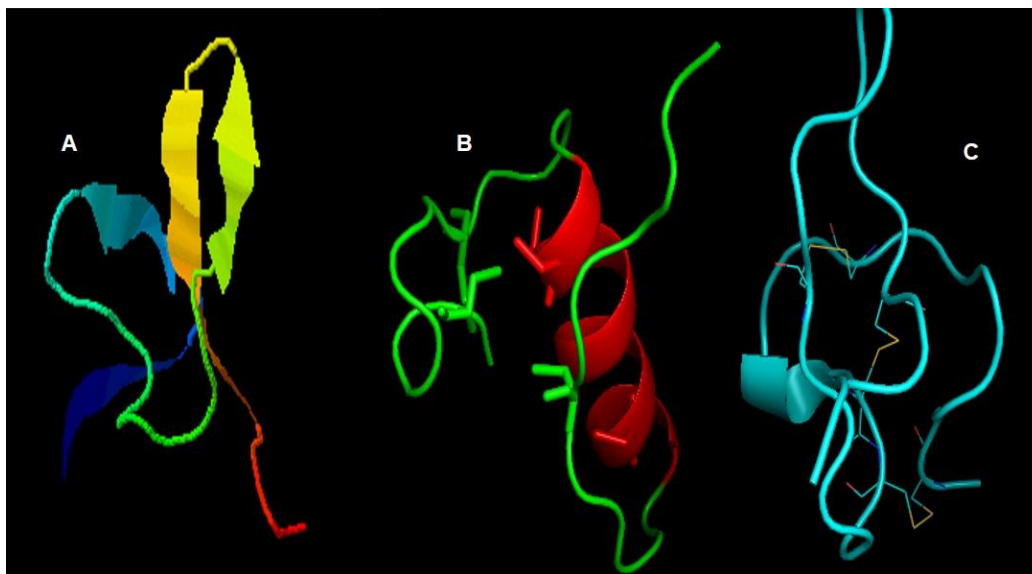


Figura 41. Modelos estructurales generados para la secuencia del péptido FV2-16.

A. Modelo generado por I-Tasser. **B.** Modelo generado por PepFold3, mostrando los residuos de cisteínas como bastones. **C.** Modelo generado por HHPred, identificando los puentes disulfuro que estabilizan la estructura.

5.5. Análisis de resultados

El alineamiento múltiple realizado, entre las secuencias de proteínas y péptidos determinadas en el veneno de *T. macrochirus*, muestra que las secuencias se relacionan claramente en dos grupos representativos de los péptidos y proteínas del veneno de escorpión, entre los cuales se encuentra un grupo con actividad enzimática (metaloproteasa) y uno con actividad específica sobre canales iónicos. Este tipo de composición también se ha reportado en otros venenos de escorpiones tanto del mismo género como de otros géneros diferentes (39, 244, 33, 48, 246, 245, 247, 248). De acuerdo a estos resultados, se logra tener una base para la relación filogenética de *T. macrochirus*, con las diferentes

especies que se hallan en el mundo, como también marca la presencia y ausencia de diferentes componentes específicos de los venenos de escorpión (249). El grupo de enzimas que indica la presencia de metaloproteasas, reportada en el veneno de *T. obscurus*, y de *T. serrulatus*. En este último se encuentran en la familia de peptidasa Gluzincin (250). En cuanto a la presencia de Toxinas de canales de sodio, se relaciona con la cantidad de péptidos purificados del veneno de *T. macrochirus*, con masa molecular de 7000 a 7800 Da, que se encuentran presentes en venenos de escorpión del mismo género, que pueden diferir en algunos aminoácidos, como también en el arreglo estructural (251).

La estructura predicha para el péptido FV2-16 del veneno de *T. macrochirus* corresponde a una estructura similar a la de una toxina con afinidad para canal de potasio, resultado que además se confirma por rasgos como la longitud de la cadena, el peso molecular y la cantidad de residuos de cisteína. Sin embargo, teniendo en cuenta que se usaron diferentes programas de predicción de la estructura terciaria de esta toxina, el modelo generado por I-TASSER mostró una estructura completamente diferente, con una alta proporción de hojas beta en su estructura (figura 41). El motivo de α -hélice característico de las toxinas con afinidad a canales de potasio no se observa en este modelo, pero si se observa en el modelo generado por el programa PepFold3, aunque la ubicación de las cisteínas no es adecuada para la formación de los puentes disulfuro (figura 41B). Sin embargo, el modelo generado por HHPred satisface las dos situaciones anteriores, al observarse un pequeño segmento helicoidal en su interior y la formación de los tres puentes disulfuro posibles con las seis cisteínas presentes en la secuencia (216, 217).

Las principales características de este péptido para catalogarlo como una toxina de canal de potasio son la longitud de la cadena (37 residuos de aminoácidos), la cantidad de cisteínas (6 residuos Cys), y el motivo de cisteinas conservado en Cys15 y Cys16 (57). Además la estructura tridimensional predicha posee uno de los motivos estructurales específicos para toxinas de canales de potasio, como es de una hélice alfa corta conectada a hojas beta antiparalelas por medio de un

loop, denominada CS $\alpha\beta$ (58, 68, 89). Teniendo en cuenta estas características se podría clasificar en las toxinas de la familia α -KTx, y podría ser selectivo para un tipo de canal de potasio de Kv1 KCa2 y KCa3, los cuales pueden ser bloqueados por el motivo de Lisina y otro residuo de aminoácido (58), teniendo en cuenta los resultados de actividad sobre el canal de hKv1.3, y con base a estas características estructurales predichas, se propone que este péptido puede reconocer otro tipo de canal Kv1 (68).

Capítulo 6.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.2. CONCLUSIONES

En el veneno de escorpión *T. macrochirus*, se encuentra 5,52 mg/mL de proteína soluble total, compuesto principalmente por proteínas y péptidos de 3 a 100 kDa y con puntos isoeléctricos entre 6 a 10.

Mediante el método B de HPLC sobre el veneno total de *T. macrochirus* se identificaron 23 fracciones de péptidos con masa molecular de 3000 Da a 5000 Da, 21 fracciones con peso molecular de 5000 Da a 7900 Da y otras fracciones de proteínas con pesos moleculares mayores a 10000Da que corresponden principalmente a enzimas, ente las que se destacan la metaloproteasa y la hialuronidasa.

El procedimiento que permitió separar una mayor cantidad de péptidos puros consistió en usar cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-100), seguido de cromatografía de intercambio catiónico (CM-Celulosa) y por ultimo RP-HPLC por el método B. Por este procedimiento se obtuvieron 36 péptidos puros, de los cuales 10 poseen un peso molecular de 3000 Da a 4000 Da, que podrían corresponder a péptidos que actúan sobre canales de potasio y 26 péptidos con peso molecular de 7000 a 7900Da que corresponderían a toxinas de canales de sodio.

Los veinte péptidos caracterizados en su estructura primaria total o parcialmente, poseen 6 u 8 residuos de cisteína, por lo cual son clasificados como péptidos con puentes disulfuro (DBPs). De acuerdo a esta identificación de secuencias igualmente se establece que estos péptidos se relacionan con toxinas de canales iónicos características de los venenos de escorpión.

Los péptidos 32, 36, 41, 44 y 46 generaron la mayor actividad citotóxica sobre las líneas celulares evaluadas y sobre cultivo primario de neuronas. Estos péptidos poseen entre 6 y 8 cisteínas en su estructura primaria y poseen un peso molecular entre 3000 Da a 3800 Da. Sin embargo, el péptido Tmac48, que presenta un peso molecular de 7147,19 Da y tiene 8 cisteínas en su estructura, también presentó efecto citotóxico significativo sobre las líneas PC3, HeLa y sobre cultivo primario de neurona.

De acuerdo a los ensayos realizados de toxicidad sobre mamíferos e insectos tanto con el veneno total como con las fracciones de péptidos, se identificó que estos componentes pertenecen a toxinas que actúan sobre canales de sodio y potasio clasificados como α -NaTxS y α -KTxs de mamíferos. Este efecto se observó con diferentes grados de intensidad, identificándose que algunos logran ser letales poco tiempo después de su inyección y otros solo generan síntomas que afectan el comportamiento normal del animal.

El veneno de escorpión *T. macrochirus* posee hialuronidasas y proteasas en su composición, mientras que carece de actividad de fosfolipasas y metaloproteasas. La actividad de hialuronidasa se detectó por medio de la hidrólisis de ácido hialurónico y se relacionó esta actividad con una proteína que posee un peso

molecular estimado electroforéticamente entre 46 a 48 kDa. Las proteasas se identificaron por similitud en secuencias obtenidas por huella peptídica del veneno total y no se observó su actividad sobre caseína ni gelatina.

El péptido FV2-16 posee 37 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 3959,03 Da, entre los residuos de aminoácidos se encuentran 6 residuos de cisteínas. Características estructurales con las que se podría clasificar como un péptido o toxina que reconocer canales de potasio y calcio, por su porcentaje de identidad con otras toxinas que poseen esta actividad.

A pesar que del péptido FV2-16, experimentalmente no se observó inhibición de la actividad del canal de tipo hKv1.3. La estructura terciaria predicha del péptido, evidencia la presencia de tres puentes disulfuro que estabilizan el posible motivo estructural CS $\alpha\beta$, característico de toxinas de canales de potasio, por lo cual este péptido podría reconocer y modificar la actividad de otro tipo de canales de potasio.

6.3. RECOMENDACIONES

Realizar estudios a nivel genómico y transcriptómico para completar la información del veneno de *T. macrochirus* e identificar posibles actividades biológicas y biotecnológicas asociadas a los componentes del mismo.

Con base a los resultados obtenidos, determinar el mecanismo por el cual los péptidos desarrollan un efecto citotóxico sobre las líneas celulares evaluadas.

Identificar la relación filogenética de este escorpión con otros reportados previamente de la misma familia, a través de un análisis molecular comparativo

Bibliografía

1. Fet V. Catalogo of the scorpions of the world (1758-1998). Society TNE, editor: The New York Entomological Society,; 2000.
2. Lourenço WR. Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities. *Biogeographica*. 1994;70(3):155-60.
3. Lourenço WR. Les scorpions (Chelicerata, Scorpiones) de l'Équateur avec quelques considérations sur la biogéographie et la diversité des espèces. . *Revue Suisse de Zoologie* 1995;102(1):61-88.
4. Lourenço WR. Additions à la faune de scorpions neotropicaux. *Revue Suisse de Zoologie* 1997a;104(3):587-604.
5. Lourenço WR. Synopsis de la faune de scorpions de Colombie, avec des considérations sur la systématique et la biogéographie des espèces. *Revue Suisse de Zoologie*. 1997b;104(1):61-94.
6. Lourenço WR. Panbiogeographie: Les distributions disjointes et le concept de famille relictuelle chez les scorpions. *Biogeographica*. 1998;74(3):133-44.
7. Lourenço WR. anbiogeographie, les familles des scorpions et leur repartition géographique. *Biogeographica*. 2000;76(1):21-39.
8. Lucas M, y Da Silva, P. Escorpiones de interese medico do Brasil. pehoentos Spvea, editor. Sao Paulo1992.
9. Saldarriaga MMO, R. . Los escorpiones: aspectos ecológicos, biológicos y toxinológicos. *MEDUNAD*. 2000;3(7):17-23.
10. Polis GA. *Biology of Scorpions*. Standford Unis. Pres: Standford; 1990. 33-46 p.
11. Polis GA, y Farley, R.D. . Behavior and ecology of mating in the cannibalistic scorpion, *Paruroctonus messae* Stahnke (Scorpionida: Vaejovidae). *The Journal of Aracnology*. 1979;7:33-46.
12. Peretti AV, y Acosta, L.E. . Comparative analysis of mating in scorpions: the post-transfer satage in selected Argentinian bothriurids (Chelicerata, Scorpiones, Bothriuridae). *Zoologischer Anzeiger*. 1999;237(4):259-65.
13. Flórez DE. Escorpiones de la Familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. *Biota Colomb*. 2001;2:25-30.
14. Gordon D. SP, Gurevitz M., Zinn-Justin S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J Toxicol Toxin Rev* 1998;17:131-59.
15. Garcia M, Hanner, M., Knaus, HG., Koch, R., Schmalhofer, W., Slaughter, RS., Kaczorowski, GJ. Pharmacology of potassium channels *Adv Pharmacol*. 1997;39:425-71.

16. Legros C, Ceard B, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS letters*. 1998;431(3):375-80.
17. DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *The American journal of physiology*. 1993;264(2 Pt 1):C361-9.
18. Tytgat J, Debont T, Rostoll K, Muller GJ, Verdonck F, Daenens P, et al. Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. *FEBS letters*. 1998;441(3):387-91.
19. Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(24):12185-9.
20. Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2001;39(10):1495-504.
21. Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2005;46(8):831-44.
22. Possani LD, Alagon, A.C., Fletcher, P.L.Jr., Erickson, B.W. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1977;180(2):394-403.
23. Possani LD, Martin, B.M., Svendsen, I. . The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ Channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. . *Carlsberg Research Communications*. 1982;47:285-9.
24. Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie*. 2013;95(9):1784-94.
25. Flórez DE. Escorpiones & alacranes. *Libro Rojo de los Invertebrados Terrestres de Colombia*. Colombia: Ed. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional; 2007. p. 70.
26. Possani LD. El alacrán y su piquete. *Ciencia DGdDdl*, editor. UNAM Mexico: UNAM; 2005.
27. Charry H. "Accidentes por picadura de escorpión". In: Gómez-Villegas C, editor. *Memorias del primer simposio de Toxinología Clínica*. Bogotá: Laboratorios Probiol Ltda; 2006.
28. Fet V, y Soleglad., ME. Contributions to scorpion systematics. I. On recent changes in high-level taxonomy. In: Euscopius, editor. *Euscopius-Occasional Publications in Scorpiology*. 312005. p. 1-9.

29. Rein J. <http://scorpion-files.blogspotno/2014/10/kolotl-new-genus-from-mexicohtmlKolotl> [Internet]. Technology TNUoS, editor. Septiembre 16. 2013. [cited 2017].
30. Flórez DE. Comunicación personal [Internet]. Flórez DE, editor. Bogotá Universidad Nacional de Colombia 2013. [cited 2017].
31. Ochoa J, Botero-Trujillo, R., Prendini, L. On the troglomorphic scorpion *Troglotayosicus humiculum* (Scorpiones, Troglotayosidae), with first description of the adults. *American Museum Novitates* 2010;3691:1-19.
32. de Armas Luis F, David LS, Eduardo FD. COMPOSICIÓN DEL GÉNERO CENTRUROIDES MARX, 1890 (SCORPIONES: BUTHIDAE) EN COLOMBIA, CON LA DESCRIPCIÓN DE UNA NUEVA ESPECIE. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA)*. 2012(50 (30/06/2012)):105–14.
33. Guerrero-Vargas JA, Mourao CB, Quintero-Hernandez V, Possani LD, Schwartz EF. Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* novel putative Na⁺-channel scorpion toxins. *PloS one*. 2012;7(2):e30478.
34. Simard J, y Watt, D. . Venoms and toxin. In: University S, editor. *Life history The biology of scorpions*. Stanford: Polis, G.; Sissom, W; 1990. p. 414-43.
35. Inceoglu B, Lango J, Jing J, Chen L, Doymaz F, Pessah IN, et al. One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(3):922-7.
36. Wang X, Gao, B., Zhu, S. Exon Shuffling and Origin of Scorpion Venom Biodiversity. *Toxins*. 2016;9(1).
37. Díaz AM, L.; Rodríguez, H.; Caballero, Y. Citotoxicidad del veneno del escorpión cubano *Rhopalurus junceus* y sus fracciones sobre líneas celulares tumorales humanas. *LABIOFAM*. 2010;1:12-8.
38. Possani LD, Rodríguez De La Vega, R.C. . Scorpion Venom Peptides. *Handbook of Biologically Active Peptide*. 54. United States of America: *Handbook of Biologically Active Peptide*; 2006. p. 16.
39. Barona J, Batista CV, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Wanke E, Otero R, et al. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ - and K⁺ -channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1764(1):76-84.
40. Enrique Escobar C, Tincopa, Luz., y Rivera, D. Partial purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 Y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* KOCH, 1867 (Scorpionida Vejovidae). *Rev peru biol* 2002;9(1):3-10.
41. Kawachi T, Miyashita M, Nakagawa Y, Miyagawa H. Isolation and characterization of an anti-insect beta-toxin from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2013;77(1):205-7.

42. Loret E, y Hammock, B. Structure and Neurotoxicity of Venoms. In: Press OU, editor. Scorpion Biology and Research. Oxford: Oxford University Press; 2001. p. 204-33.
43. Mota JV, y Sevcik, C. . <http://cieasedencom/cursos-gratis/curso-treph/Veneno-Escorpiones/Escorpiones2pdf> [Internet]. <http://cieaseden.com/cursos-gratis/curso-treph/Veneno-Escorpiones/Escorpiones2.pdf> 1999. 1999. [cited 2017].
44. Zamudio F, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P, Possani LD. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *European journal of biochemistry*. 1992;204(1):281-92.
45. El Asmar M. Metabolic effect of scorpion venom. In: Dekker M, editor. Handbook of natural toxins 2. New York: Handbook of natural toxins 1984. p. 551-75.
46. LD. P. Structure of scorpion toxins. In: toxins Hon, editor. Handbook of natural toxins. 2. New York: Marcel Dekker; 1984. p. 317-69.
47. Zlotkin E MF, Rochat H. . Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In: venoms A, editor. Bettini S. Berlin: Berlin: Springer-Verlag; 1978. p. 317-69.
48. Batista CV, del Pozo L, Zamudio FZ, Contreras S, Becerril B, Wanke E, et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2004;803(1):55-66.
49. Rodriguez de la Vega RC, Schwartz EF, Possani LD. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2010;56(7):1155-61.
50. Escobar E, Velásquez, L., Rivera, C. . Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae). *Rev Perú Biol*. 2003;10(2):217-20.
51. Yu K, Fu, W., Liu, H., Luo, X., Chen, K.X., Ding, J., Shen, J., Jiang, H. Computational simulations of interactions of scorpion toxins with the voltage-gated potassium ion channel. *Biophysical journal*. 2004;86(6):3542-55.
52. Koppenhofer E, Schmidt H. Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. *Experientia*. 1968;24(1):41-2.
53. Petricevich VL, y Lebrun, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. *Mediators of inflammation*. 2005;2005(1):39-49.
54. Possani LD, Martin BM, Svendsen I, Rode GS, Erickson BW. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *The Biochemical journal*. 1985;229(3):739-50.
55. Lima PC, Bordon KCF, Pucca MB, Cerni FA, Zoccal KF, Faccioli LH, et al. Partial purification and functional characterization of Ts19 Frag-I, a novel toxin

from *Tityus serrulatus* scorpion venom. The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases. 2015;21:49.

56. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. European journal of biochemistry. 1999;264(2):287-300.

57. Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. Trends in pharmacological sciences. 1999;20(11):444-7.

58. Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2004;43(8):865-75.

59. Tan PT, Veeramani A, Srinivasan KN, Ranganathan S, Brusica V. SCORPION2: a database for structure-function analysis of scorpion toxins. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2006;47(3):356-63.

60. Diaz-Garcia A, Morier-Diaz, L., Frion-Herrera, Y., Rodriguez-Sanchez, H., Caballero-Lorenzo, Y., Mendoza-Lanes, Riquenes-Garlobo, Y. Fraga-Castro, J. A. In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. Journal of venom research. 2013;4:5-12.

61. Bontems F, Roumestand C, Gilquin B, Menez A, Toma F. Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. Science. 1991;254(5037):1521-3.

62. Kobayashi Y, Takashima, H., Tamaoki, H., Kyogoku, Y., Lambert, P., Kuroda, H., Chino, N., Watanabe, T. X., Kimura, T., Sakakibara, S., Moroder, L. . The cystine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. Biopolymers. 1991;31(10):1213-20.

63. Zeng XC, Corzo G, Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. IUBMB life. 2005;57(1):13-21.

64. Landon C, Cornet B, Bonmatin JM, Kopeyan C, Rochat H, Vovelle F, et al. 1H-NMR-derived secondary structure and the overall fold of the potent anti-mammal and anti-insect toxin III from the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. European journal of biochemistry. 1996;236(2):395-404.

65. Ding L, Chen, J., Hao, J., Zhang, J., Huang, X., Hu, F., Wu, Z., Liu, Y., Li, W., Cao, Z., Wu, Y., Li, J., Li, S., Liu, H., Wu, W., Chen, Z. Discovery of three toxin peptides with Kv1.3 channel and IL-2 cytokine-inhibiting activities from Non-Buthidae scorpions, *Chaerilus tricostatus* and *Chaerilus tryznai*. Peptides. 2017;91:13-9.

66. Marinkelle CJ, Stahnke HL. Toxicological and clinical studies on *Centruroides margaritatus* (Gervais), a common scorpion in western Colombia. Journal of medical entomology. 1965;2(2):197-9.

67. Stockwell SA. Systematic observations on North American Scorpionida with a checklist of the family and genera. Journal Medical Entomology. 1992;29(3):407-22.

68. Quintero-Hernandez V, Jimenez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function.

- Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2013;76:328-42.
69. Valderrama R, Otero R., Angel, R., Garcia, M.E. . Envenenamiento por picadura de escorpiones, primer simposio Colombiano de toxicología: toxinas y envenenamiento por animales, plantas y microorganismos. Medellín ecografías limitadas. 1998:169-78.
70. Li T, Xu L, Liu H, He Y, Liang S, Li W, et al. Characterization of a novel BmalphaTX47 toxin modulating sodium channels: the crucial role of expression vectors in toxin pharmacological activity. *Toxins*. 2014;6(3):816-29.
71. del Rio-Portilla F, Hernandez-Marin, E., Pimienta, G., Coronas, F. V., Zamudio, F. Z., Rodriguez de la Vega, R. C., Wanke, E., Possani, L. D. NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity. *European journal of biochemistry*. 2004;271(12):2504-16.
72. Hjelle J. Anatomy and morphology. In: Polis GS, W. , editor. Life history The biology of scorpions. Standford: Standford University; 1990. p. 9-63.
73. Gómez J, Velásquez, P., Saldarriaga, M. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *MEDUNAB*. 2002;5(15):159-65.
74. Social IMdS. Bases para el tratamiento en la intoxicación causada por mordedura de serpientes y picadura de alacrán. IMSS-Instituto BIOCLON. 1996:22.
75. Pintar A, Possani LD, Delepierre M. Solution structure of toxin 2 from *centruroides noxius* Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *Journal of molecular biology*. 1999;287(2):359-67.
76. de la Vega RC, Possani LD. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2007;49(2):171-80.
77. Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. 1985;313(6000):316-8.
78. Goudet C, Chi CW, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2002;40(9):1239-58.
79. Batista CV, Gomez-Lagunas F, Rodriguez de la Vega RC, Hajdu P, Panyi G, Gaspar R, et al. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+)-channels with distinctly different affinities. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1601(2):123-31.
80. Diego-Garcia E, Peigneur S, Debaveye S, Gheldof E, Tytgat J, Caliskan F. Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;61:72-82.
81. He Y, Zhao, R., Di, Z., Li, Z., Xu, X., Hong, W., Wu, Y., Zhao, H., Li, W., Cao, Z. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic

evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. *Journal of proteomics*. 2013;89:1-14.

82. Camargos TS, Restano-Cassulini, R., Possani, L. D., Peigneur, S., Tytgat, J., Schwartz, C. A., Alves, E. M., de Freitas, S. M., Schwartz, E. F. The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides*. 2011;32(7):1509-17.

83. Kuzmenkov AI, Grishin EV, Vassilevski AA. Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochemistry Biokhimiia*. 2015;80(13):1764-99.

84. Schwartz AB, Kapur, A., Wang, W., Huang, Z., Fardone, E., Palui, G., Mattoussi, H., Fadool, D.A. Margatoxin-bound quantum dots as a novel inhibitor of the voltage-gated ion channel Kv1.3. *Journal of neurochemistry*. 2017;140(3):404-20.

85. Korolkova YV, Bocharov, E.V., Angelo, K., Maslennikov, I.V., Grinenko, O.V., Lipkin, A.V., Nosyreva, E.D., Pluzhnikov, K.A., Olesen, S.P., Arseniev, A.S., Grishin, E.V. New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(45):43104-9.

86. Corona M, Gurrola, G. B., Merino, E., Cassulini, R. R., Valdez-Cruz, N. A., Garcia, B., Ramirez-Dominguez, M. E., Coronas, F. I., Zamudio, F. Z., Wanke, E., Possani, L. D. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS letters*. 2002;532(1-2):121-6.

87. Kuzmenkov AI, Peigneur, S., Chugunov, A.O., Tabakmakher, V.M., Efremov, R.G., Tytgat, J., Grishin, E.V., Vassilevski, A.A. C-Terminal residues in small potassium channel blockers OdK1 and OSK3 from scorpion venom fine-tune the selectivity. *Biochimica et biophysica acta*. 2017;1865(5):465-72.

88. Zhu S, Li W, Zeng X, Jiang D, Mao X, Liu H. Molecular cloning and sequencing of two 'short chain' and two 'long chain' K⁽⁺⁾ channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *FEBS letters*. 1999;457(3):509-14.

89. Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M, Sabatier JM. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *The Biochemical journal*. 2004;378(Pt 3):717-26.

90. Martinez F, Munoz-Garay C, Gurrola G, Darszon A, Possani LD, Becerril B. Site directed mutants of Noxiustoxin reveal specific interactions with potassium channels. *FEBS letters*. 1998;429(3):381-4.

91. Frau A, Pisciotta M, Gurrola GB, Possani LD, Prestipino G. Synthetic undecapeptide (NTX10-20) of noxiustoxin blocks completely the I(A) potassium currents of cerebellum granular cells. *European biophysics journal : EBJ*. 2001;29(8):569-73.

92. Wu JJ, He LL, Zhou Z, Chi CW. Gene expression, mutation, and structure-function relationship of scorpion toxin BmP05 active on SK(Ca) channels. *Biochemistry*. 2002;41(8):2844-9.

93. Huys I, Xu CQ, Wang CZ, Vacher H, Martin-Eauclaire MF, Chi CW, et al. BmTx3, a scorpion toxin with two putative functional faces separately active on A-type K⁺ and HERG currents. *The Biochemical journal*. 2004;378(Pt 3):745-52.
94. M'Barek S, Mosbah, A., Sandoz, G., Fajloun, Z., Olamendi-Portugal, T., Rochat, H., Sampieri, F., Guijarro, J. I., Mansuelle, P., Delepierre, M., De Waard, M., Sabatier, J. M. Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels. *European journal of biochemistry*. 2003;270(17):3583-92.
95. Frénal K, Xu, CQ., Wolff, N., Wecker, K., Gurrola, GB., Zhu, SY., Chi, CW., Possani, LD., Tytgat, J., Delepierre, M. Exploring structural features of the interaction between the scorpion toxin CnErg1 and ERG K⁺ channels. *Proteins*. 2004;56(2):367-75.
96. Morgan G, Ward, R., Barton, M. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies. *Clinical oncology*. 2004;16(8):549-60.
97. Wulff H, Castle, N.A., Pardo, L.A. . Voltage-gated potassium channels as therapeutic drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(12):982–1001.
98. Jäger H, Dreker, T., Buck, A., Giehl, K., Gress, T., Grissmer, S. Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺ activated K channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol*. 2004;65:630-8.
99. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(6):4135-44.
100. Gupta SD, Gomes A, Debnath A, Saha A, Gomes A. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chemico-biological interactions*. 2010;183(2):293-303.
101. Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2011;25(8):1748-56.
102. Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and molecular pathology*. 2011;91(1):447-54.
103. Valdez-Velazquez LL, Romero-Gutierrez, M.T., Delgado-Enciso, I., Dobrovinskaya, O., Melnikov, V., Quintero-Hernandez, V., Ceballos-Magana, S.G., Gaitan-Hinojosa, M.A., Coronas, F.I., Puebla-Perez, A.M., Zamudio, F., De la Cruz-Garcia, I., Vazquez-Vuelvas, O. F., Soriano-Hernandez, A.D., Possani, L. D. Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2016;118:95-103.

104. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;93:125-35.
105. Lui VC, Lung, SS., Pu, JK., Hung, KN., Leung, GK. Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including CIC-3. *Anticancer Res*. 2010;30:4515-24.
106. Qin C, He B, Dai W, Zhang H, Wang X, Wang J, et al. Inhibition of metastatic tumor growth and metastasis via targeting metastatic breast cancer by chlorotoxin-modified liposomes. *Molecular pharmaceutics*. 2014;11(10):3233-41.
107. El-Ghlban S, Kasai, T., Shigehiro, T., Yin, H. X., Sekhar, S., Ida, M., Sanchez, A., Mizutani, A., Kudoh, T., Murakami, H., Seno, M. Chlorotoxin-Fc fusion inhibits release of MMP-2 from pancreatic cancer cells. *BioMed research international*. 2014;2014:152659.
108. Jang SH, Choi SY, Ryu PD, Lee SY. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. *European journal of pharmacology*. 2011;651(1-3):26-32.
109. Weaver AK, Liu X, Sontheimer H. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *Journal of neuroscience research*. 2004;78(2):224-34.
110. Schwab A, Reinhardt J, Schneider SW, Gassner B, Schuricht B. K(+) channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 1999;9(3):126-32.
111. Das Gupta S, Halder B, Gomes A, Gomes A. Bengalin initiates autophagic cell death through ERK-MAPK pathway following suppression of apoptosis in human leukemic U937 cells. *Life sciences*. 2013;93(7):271-6.
112. Bloch MO, J. Simon, R. Schraml, P. Gasser, T. C. Mihatsch, M. J. Kunzelmann, K. Bubendorf, L. KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene*. 2007;26(17):2525-34.
113. Perafan C, Sabogal, A., Moreno, J., García, A., Luna, D., Romero, C. & Flórez, E. Diagnóstico del estado actual de la fauna de arácnidos en Colombia. In: Entomología SCd, editor. Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología; Bogotá: Memorias del 40° Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología; 2013. p. 308-36.
114. González-Santillán E. Diversidad, taxonomía y hábitat de alacranes. In: Universidad Nacional Autónoma de México DF, editor. Artropodos de Chamela Instituto de Biología. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2004. p. 25-35.
115. Bohórquez-Gómez RM. Revisión Taxonómica y Distribución Geográfica de las especies de Tityus, Subgénero Atreus, (Scorpiones, Buthidae) Presentes en Colombia [Magister en Ciencias-Biología]. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Universidad Nacional de Colombia; 2016.
116. Rincon-Cortes CA, Reyes-Montano EA, Vega-Castro NA. [Partial purification of peptides present in the Tityus macrochirus (Buthidae) scorpion venom and preliminary assessment of their cytotoxicity]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2017;37(2):238-49.

117. Candido DMN, A. L. Kimura, L. F. Prezotto-Neto, J. P. Barbaro, K. C. Chalkidis, H. M. Dorce, V. A. de Paula Santos-da-Silva, A. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2004;126:51-8.
118. Oukkache N, Chgoury, F., Lalaoui, M., Cano, A., Ghalim, N. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2013;19(5):2-5.
119. Smith P. K, R., Hermanson, G., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson B.J., Klenk, D.C. . Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
120. Suelter CH. A Practical guide to enzymology. Sons JW, editor. New York.: John Wiley & Sons; 1985.
121. Schagger H, y Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*. 1987;166(2):368-79.
122. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
123. Meyer TS, y Lamberts, B.L. . Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1965;107(1):144-5.
124. Switzer RCr, Merrill, C.R., Shifrin, S. . A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1979;98(1):231-7.
125. Healthcare G. 2-D Electrophoresis Principles and Methods Healthcare HfG, editor: GE Healthcare; 2004 September 2004. 162 p.
126. Pimenta A, Martin-Eauclaired, M-F., Rochat, H., Figueiredo, S., Kalapothakis, E., Afonso, L-C., De Lima, M-E. . Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2001;39:1009-19.
127. Incamnoi P, Patramanon, R., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Uawonggul, N., Sukprasert, S., Rungsa, P., Daduang, J., Daduang, S. Heteromtoxin (HmTx), a novel heterodimeric phospholipase A(2) from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;61:62-71.
128. Rocha Soares KS, Cardozo Fonseca, J.L., Oliveira Bitencourt, M. A., Santos, K.S., Silva, A.A. Jr., Fernandes-Pedrosa, M.F. . Serum production against *Tityus serrulatus* scorpion venom using cross-linked chitosan nanoparticles as immunoadjuvant. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2012;60:1349-54.
129. Ramirez-Dominguez ME, Olamendi-Portugal T, Garcia U, Garcia C, Arechiga H, Possani LD. Cn11, the first example of a scorpion toxin that is a true blocker of Na(+) currents in crayfish neurons. *The Journal of experimental biology*. 2002;205(Pt 6):869-76.

130. Olamendi-Portugal T, Bartok A, Zamudio-Zuniga F, Balajthy A, Becerril B, Panyi G, et al. Isolation, chemical and functional characterization of several new K(+)-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2016;115:1-12.
131. Ramirez AN, Martin BM, Gurrola GB, Possani LD. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1994;32(4):479-90.
132. Vergel Galeano CF, Rivera Monroy, Z. J, Rosas Pérez, J. E, Javier, García Castañeda, E. Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis. *J Mex Chem Soc*. 2014;58(4):386-92.
133. D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2010;56(8):1497-505.
134. Schwartz EF, Schwartz, C.A., Gomez-Lagunas, F., Zamudio, F.Z., Possani, L.D. HgeTx1, the first K⁺-channel specific toxin characterized from the venom of the scorpion *Hadrurus gertschi* Soleglad. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2006;48(8):1046-53.
135. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*. 2006;1(6):2856-60.
136. Cid Uribe JI, Jimenez Vargas JM, Ferreira Batista CV, Zamudio Zuniga F, Possani LD. Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2017;125:91-8.
137. Valdez-Velazquez LL, Quintero-Hernandez V, Romero-Gutierrez MT, Coronas FI, Possani LD. Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*. *PloS one*. 2013;8(6):e66486.
138. Yagmur EA, Ozkan O, Karaer KZ. Determination of the Median Lethal Dose and Electrophoretic Pattern of *Hottentotta saulcyi* (Scorpiones, Buthidae) Scorpion Venom. *Journal of arthropod-borne diseases*. 2015;9(2):238-45.
139. Possani LD, Steinmetz, W. E., Dent, M. A., Alagon, A. C., Wuthrich, K. Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin American scorpions. *Biochimica et biophysica acta*. 1981;669(2):183-92.
140. Schiavon E, Pedraza-Escalona M, Gurrola GB, Olamendi-Portugal T, Corzo G, Wanke E, et al. Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by beta-toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2012;59(2):283-93.
141. Gao B, Harvey, P.J., Craik, D.J., Ronjat, M., De Waard, M., Zhu, S. Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Bioscience reports*. 2013;33(3).

142. Fletcher PL, Jr., Fletcher, M. D., Weninger, K., Anderson, T. E., Martin, B. M. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(10):7405-16.
143. Berkut AA, Peigneur, S., Myshkin, M. Y. , Paramonov, A. S., Lyukmanova, E. N., Arseniev, A. S., Grishin, E. V., Tytgat, J., Shenkarev, Z. O., Vassilevski, A. A. . Structure of membrane-active toxin from crab spider *Heriades mellotee* suggests parallel evolution of sodium channel gating modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(1):492-504.
144. Feng S, Streets, A. J., Nesin, V., Tran, U., Nie, H., Onopiuk, M., Wessely, O., Tsiokas, L., Ong, A. C. M. The Sorting Nexin 3 Retromer Pathway Regulates the Cell Surface Localization and Activity of a Wnt-Activated Polycystin Channel Complex. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017.
145. González-Santoyo I, and Córdoba-Aguilar, A. . Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2011;142:1-16.
146. Guan RJ, Wang M, Wang D, Wang DC. A new insect neurotoxin AngP1 with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensii* Karsch: purification and characterization. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*. 2001;58(1):27-35.
147. Zhou XH, Yang D, Zhang JH, Liu CM, Lei KJ. Purification and N-terminal partial sequence of anti-epilepsy peptide from venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *The Biochemical journal*. 1989;257(2):509-17.
148. Shao J, Kang N, Liu Y, Song S, Wu C, Zhang J. Purification and characterization of an analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch. *Biomedical chromatography : BMC*. 2007;21(12):1266-71.
149. Ding J, Chua PJ, Bay BH, Gopalakrishnakone P. Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. *Experimental biology and medicine*. 2014;239(4):387-93.
150. Zou X, Wu Y, Chen J, Zhao F, Zhang F, Yu B, et al. Activation of sodium channel by a novel alpha-scorpion toxin, BmK NT2, stimulates ERK1/2 and CERB phosphorylation through a Ca²⁺ dependent pathway in neocortical neurons. *International journal of biological macromolecules*. 2017;104(Pt A):70-7.
151. Guerrero-Vargas JA, Libério, Castro MS. Aplicación biotecnológica de la Toxinología: La importancia del veneno de escorpiones y la secreción cutánea *Innovación y Ciencia* 2008;15(2):16-25.
152. Zhang JZ, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T, Karbat I, Cohen L, Gordon D, et al. Structure-function map of the receptor site for beta-scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(38):33641-51.
153. Quintero-Hernandez V, Juarez-Gonzalez VR, Ortiz-Leon M, Sanchez R, Possani LD, Becerril B. The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. *Molecular immunology*. 2007;44(6):1307-15.

154. Olamendi-Portugal T, Garcia BI, Lopez-Gonzalez I, Van Der Walt J, Dyason K, Ulens C, et al. Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;299(4):562-8.
155. Thompson CH, Olivetti PR, Fuller MD, Freeman CS, McMaster D, French RJ, et al. Isolation and characterization of a high affinity peptide inhibitor of ClC-2 chloride channels. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(38):26051-62.
156. Fuller MD, Thompson CH, Zhang ZR, Freeman CS, Schay E, Szakacs G, et al. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(52):37545-55.
157. Zhao Z, Hong W., Zeng Z., Wu Y., Hu K., Tian X., Li W., Cao Z. Mucroporin-M1 inhibits hepatitis B virus replication by activating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and down-regulating HNF4 α in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(36):30181-90.
158. Chen Y, Cao L., Zhong M., Zhang Y., Han C., Li Q., Yang J., Zhou D., Shi W., He B., Liu F., Yu J., Sun Y., Cao Y., Li Y., Li W., Guo D., Cao Z., Yan H. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *PloS one*. 2012;7(4):e34947.
159. Gomes A, Bhattacharjee P., Mishra R., Biswas A.K., Dasgupta S.C., Giri B. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian journal of experimental biology*. 2010;48(2):93-103.
160. Heinen TE, da Veiga AB. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2011;57(4):497-511.
161. Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. *Glia*. 2002;39(2):162-73.
162. Salud O-OMdl. <http://www.who.int/topics/cancer/es/>: <http://www.who.int/es/>; 2017 [cited 2017].
163. Ortiz E, Rendon-Anaya M, Rego SC, Schwartz EF, Possani LD. Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(6):1738-46.
164. Possani LD, Martin BM, Fletcher MD, Fletcher PL, Jr. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(5):3178-85.
165. Jridi I, Catacchio I., Majdoub H., Shahbazeddah D., El Ayeb M., Frassanito M. A., Ribatti D., Vacca A., Borchani L. Hemilipin, a novel *Hemiscorpius lepturus* venom heterodimeric phospholipase A₂, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;105:34-44.
166. Zamudio FZ, Conde R, Arevalo C, Becerril B, Martin BM, Valdivia HH, et al. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(18):11886-94.

167. Conde R, Zamudio FZ, Becerril B, Possani LD. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS letters*. 1999;460(3):447-50.
168. Valdez-Cruz NA, Batista CV, Possani LD. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *European journal of biochemistry*. 2004;271(8):1453-64.
169. Kreil G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1995;4(9):1666-9.
170. ATCC. Copyright 2017 ATCC All rights Reserved <https://www.atcc.org/2017> [cited 2017].
171. Reyes-Guzman EA, Vega-Castro N, Reyes-Montano EA, Recio-Pinto E. Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed. *BMC neuroscience*. 2017;18(1):44.
172. Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A. Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *The Journal of comparative neurology*. 2004;472(2):156-72.
173. Beaudoin GM, Lee, S. H. Singh, D. Yuan, Y. Ng, Y. G. Reichardt, L. F. Arikath, J. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols*. 2012;7(9):1741-54.
174. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
175. Shen ES, Cooke GM, Horlick RA. Improved expression cloning using reporter genes and Epstein-Barr virus ori-containing vectors. *Gene*. 1995;156(2):235-9.
176. Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *The Journal of general physiology*. 1993;102(4):601-30.
177. Habermann E, Hardt KL. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical biochemistry*. 1972;50(1):163-73.
178. Wang WJ, Shih CH, Huang TF. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkistlysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324(1):224-30.
179. Gutierrez JM, Sanz, L., Escolano, J., Fernandez, J., Lomonte, B., Angulo, Y., Rucavado, A., Warrell, D. A., Calvete, J. J. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *Journal of proteome research*. 2008;7(10):4396-408.
180. Worthington K, and Worthington, V. *Worthington Enzyme Manual*. (<http://www.worthington-biochem.com/pap/default.html>). <http://www.worthington-biochem.com/hse/assay.html>; 2011 [cited 2017 June 2017].
181. Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2010;61(2):205-9.

182. Zhang JW, Gottschall PE. Zymographic measurement of gelatinase activity in brain tissue after detergent extraction and affinity-support purification. *Journal of neuroscience methods*. 1997;76(1):15-20.
183. Oliver GW, Leferson JD, Stetler-Stevenson WG, Kleiner DE. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Analytical biochemistry*. 1997;244(1):161-6.
184. Makowski GS, Ramsby ML. Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Analytical biochemistry*. 1996;236(2):353-6.
185. Raser KJ, Posner A, Wang KK. Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995;319(1):211-6.
186. Fernandez-Resa P, Mira E, Quesada AR. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical biochemistry*. 1995;224(1):434-5.
187. Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Analytical biochemistry*. 1998;255(2):211-6.
188. Hattori S, Fujisaki, Hitomi, Kiriya, Tomomi, Yokoyama, Tsukao, Irie, Shinkichi. Real-Time Zymography and Reverse Zymography: A Method for Detecting Activities of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors Using FITC-Labeled Collagen and Casein as Substrates. *Analytical biochemistry*. 2002;301:27-34.
189. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical biochemistry*. 1997;249(1):24-8.
190. Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clinical biochemistry*. 1993;26(3):191-8.
191. Khodakhah K, Melishchuk, A., Armstrong, C.M. Killing K Channels with TEA1. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:13335-8.
192. Rajendra W, Armugam A, Jeyaseelan K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2004;44(1):1-17.
193. Ojeda PG, Wang CK, Craik DJ. Chlorotoxin: Structure, activity, and potential uses in cancer therapy. *Biopolymers*. 2016;106(1):25-36.
194. Fan S, Sun, Z., Jiang, D., Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Liu, H., Wu, Y., Cao, Z., Li, W. BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis. *Cancer letters*. 2010;291(2):158-66.
195. Weaver EM, Zamora FJ, Pupilampu-Dove YA, Kiessu E, Hearne JL, Martin-Caraballo M. Regulation of T-type calcium channel expression by sodium butyrate in prostate cancer cells. *European journal of pharmacology*. 2015;749:20-31.
196. Akef H, Kotb N, Abo-Elmatty D, Salem S. Anti-proliferative Effects of *Androctonus amoreuxi* Scorpion and *Cerastes cerastes* Snake Venoms on Human Prostate Cancer Cells. *Journal of cancer prevention*. 2017;22(1):40-6.

197. Tarokh Z, Naderi-Manesh H, Nazari M. Towards prostate cancer gene therapy: Development of a chlorotoxin-targeted nanovector for toxic (melittin) gene delivery. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2017;99:209-18.
198. Al Asmari A, Al Moutaery K, Manthari RA, Khan HA. Time-course of lipid peroxidation in different organs of mice treated with *Echis pyramidum* snake venom. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2006;20(2):93-5.
199. Al-Asmari AK, Islam M, Al-Zahrani AM. In vitro analysis of the anticancer properties of scorpion venom in colorectal and breast cancer cell lines. *Oncology letters*. 2016;11(2):1256-62.
200. Schlaepfer DD, y Mitra, S.K. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Current opinion in genetics & development*. 2004;14(1):92-101.
201. Li W, Li Y, Zhao Y, Yuan J, Mao W. Inhibition effects of scorpion venom extracts (*Buthus matensii* Karsch) on the growth of human breast cancer MCF-7 cells. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*. 2014;11(5):105-10.
202. Valdez-Velazquez LL, Romero-Gutierrez MT, Delgado-Enciso I, Dobrovinskaya O, Melnikov V, Quintero-Hernandez V, et al. Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2016;118:95-103.
203. Zhang YY, Wu LC, Wang ZP, Wang ZX, Jia Q, Jiang GS, et al. Anti-proliferation Effect of Polypeptide Extracted from Scorpion Venom on Human Prostate Cancer Cells in vitro. *Journal of clinical medicine research*. 2009;1(1):24-31.
204. Wu JJ, Dai L, Lan ZD, Chi CW. The gene cloning and sequencing of Bm-12, a chlorotoxin-like peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2000;38(5):661-8.
205. Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez, P., Hidalgo, A., Lazos, M., Moreno, J., Alvarado, I., Cruz, F., Hernandez, D.M., Perez-Plascencia, C., Salcedo, M. [Global expression analysis in uterine cervical cancer: metabolic pathways and altered genes]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2005;57(3):434-41.
206. Veiseh M, Gabikian, P., Bahrami, S.B., Veiseh, O., Zhang, M., Hackman, R.C., Ravanpay, A.C., Stroud, M.R., Kusuma, Y., Hansen, S.J., Kwok, D., Munoz, N.M., Sze, R.W., Grady, W.M., Greenberg, N.M., Ellenbogen, R.G., Olson, J.M. Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer research*. 2007;67(14):6882-8.
207. Sui WW, Zhang WD, Wu LC, Zhang YY, Wang ZP, Wang ZX, et al. [Study on the mechanism of polypeptide extract from scorpion venom on inhibition of angiogenesis of H 22 hepatoma]. *Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi = Chinese journal of integrated traditional and Western medicine*. 2014;34(5):581-6.
208. Sun X, Zhang Y, Jia Q, Wang Z, Wang Z, Zhang W. [Effect of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) with chemotherapy inhibited angiogenesis of

- Lewis lung carcinomas]. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*. 2011;36(12):1644-9.
209. Gao L, Shan BE, Chen J, Liu JH, Song DX, Zhu BC. Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005;26(3):369-76.
210. Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Ali S, Khan HA. Scorpion (*Odontobuthus doriae*) venom induces apoptosis and inhibits DNA synthesis in human neuroblastoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;348(1-2):173-81.
211. Simard JM, Watt DD. Spontaneous, rhythmic myoelectric activity induced by scorpion neurotoxin, reduced [calcium]₀ and cadmium in chick striated muscle. *Comparative biochemistry and physiology A, Comparative physiology*. 1983;75(3):413-9.
212. Pucca MB, Amorim FG, Cerni FA, Bordon Kde C, Cardoso IA, Anjolette FA, et al. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2014;90:326-36.
213. Oliveira FN, Mortari MR, Carneiro FP, Guerrero-Vargas JA, Santos DM, Pimenta AM, et al. Another record of significant regional variation in toxicity of *Tityus serrulatus* venom in Brazil: a step towards understanding the possible role of sodium channel modulators. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;73:33-46.
214. Rodriguez-Ravelo R, Coronas FI, Zamudio FZ, Gonzalez-Morales L, Lopez GE, Urquiola AR, et al. The Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2013;19(1):13.
215. Cordeiro FA, Amorim FG, Anjolette FA, Arantes EC. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2015;21:24.
216. Housset D, Habersetzer-Rochat C, Astier JP, Fontecilla-Camps JC. Crystal structure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector refined at 1.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*. 1994;238(1):88-103.
217. Oren DA, Froy O, Amit E, Kleinberger-Doron N, Gurevitz M, Shaanan B. An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure*. 1998;6(9):1095-103.
218. Cohen L, Karbat I, Gilles N, Froy O, Corzo G, Angelovici R, et al. Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative "hot spot" common to all scorpion beta-toxins affecting Na⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(9):8206-11.
219. Gordon D, Karbat I, Ilan N, Cohen L, Kahn R, Gilles N, et al. The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2007;49(4):452-72.

220. Cohen L, Karbat I, Gilles N, Ilan N, Benveniste M, Gordon D, et al. Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(6):5045-53.
221. Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2007;49(2):142-58.
222. Corzo GP, F. Varga, Z. Barraza, O. Espino-Solis, P. G. Rodriguez de la Vega, R. C. Gaspar, R. Panyi, G. Possani, L. D. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochemical pharmacology*. 2008;76(9):1142-54.
223. Ye F, Hu, Y., Yu, W., Xie, Z., Hu, J., Cao, Z., Li, W., Wu, Y. The Scorpion Toxin Analogue BmKTX-D33H as a Potential Kv1.3 Channel-Selective Immunomodulator for Autoimmune Diseases. *Toxins*. 2016;8(4):115.
224. Bartok A, Toth A, Somodi S, Szanto TG, Hajdu P, Panyi G, et al. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2014;87:6-16.
225. Vargas-Jaimes L, Xiao L, Zhang J, Possani LD, Valdivia HH, Quintero-Hernandez V. Recombinant expression of Intrepicalcin from the scorpion *Vaejovis intrepidus* and its effect on skeletal ryanodine receptors. *Biochimica et biophysica acta*. 2017;1861(4):936-46.
226. DeBin JA, Strichartz GR. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1991;29(11):1403-8.
227. Dauplais M, Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C. L., Rowan, E. G., Harvey, A. L., Menez, A. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(7):4302-9.
228. Venancio EJ, Portaro FC, Kuniyoshi AK, Carvalho DC, Pidde-Queiroz G, Tambourgi DV. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2013;69:180-90.
229. Almeida DDS, K. C. Kobashi, L. S. Agnez-Lima, L. F. Medeiros, S. R. Silva-Junior, A. A. Junqueira-de-Azevedo Ide, L. Fernandes-Pedrosa Mde, F. . Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC genomics*. 2012;13:362.
230. Alvarenga ER MT, Magalhães BF, Siqueira FF, Dantas AE, Barroca TM, et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open J Genetics*. 2012;2(4):210–20.
231. Horta CC, Magalhaes Bde, F., Oliveira-Mendes, B. B., do Carmo, A. O., Duarte, C. G., Felicori, L. F., Machado-de-Avila, R. A., Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(2):e2693.

232. Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, McMichael AJ, White NJ, Bunnag D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1988;26(7):629-37.
233. Poh CH, Yuen, R., Chung, M.C.M., Khoo H.E. . Purification and partial characterization of hyaluronidase from Stone fish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp Biochem Physiol (B)* 1992;101:159-63.
234. Batista CV, Roman-Gonzalez SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Possani LD. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2007;146(1-2):147-57.
235. Rodríguez de la Vega RC, Vidal, N., Lourival, D., Possani, L.D. Scorpion peptides. In: Press A, editor. *Handbook of Biologically Active Peptides. Scorpion Venom Peptides*. 59. second ed 2013. p. 423–9
236. Srinivasan KN, Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T.K., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., San, B.C., Ranganathan, S., Bowie, H.J., Kini, R.M., Gopalakrishnakone, P. kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):30040-7.
237. Chagot B, Pimentel, C., Dai, L., Pil, J., Tytgat, J., Nakajima, T., Corzo, G., Darbon, H., Ferrat, G. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *The Biochemical journal*. 2005;388(Pt 1):263-71.
238. Saucedo AL, Flores-Solis, D., Rodriguez de la Vega, R.C., Ramirez-Cordero, B., Hernandez-Lopez, R., Cano-Sanchez, P., Noriega Navarro, R., Garcia-Valdes, J., Coronas-Valderrama, F., de Roodt, A., Brieba, L.G., Possani, L.D., del Rio-Portilla, F. New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(15):12321-30.
239. Bonmatin JMB, J. L. Gallet, X. Vovelle, F. Ptak, M. Reichhart, J. M. Hoffmann, J. A. Keppi, E. Legrain, M. Achstetter, T. Two-dimensional ¹H NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding. *Journal of biomolecular NMR*. 1992;2(3):235-56.
240. Lee CW, Lee, E.H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin, S.Y., Kim do, H., Kim, J.I.,. Molecular basis for the highaffinity activation of skeletal ryanodine receptor Ca²⁺-release channel by imperatoxin a. . *Biochem J* 2004;377:385–94.
241. Alva V, Nam SZ, Soding J, Lupas AN. The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic acids research*. 2016;44(W1):W410-5.
242. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*. 2015;12(1):7-8.

243. Lamiable A, Thevenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tuffery P. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic acids research*. 2016;44(W1):W449-54.
244. Oliveira U.C. NMYJ, Santos M.B., Silva A.P., Chalkidis H.M., Imberg A.S., Candido D.M., Yamanouye N., Dorce V.A., Junqueira-de-Azevedo I.L. Proteomic endorsed transcriptomic profile of the venom gland from *Tityus obscurus*. the EMBL/GenBank/DDBJ databases. 2015;(AUG-2015).
245. Borges A, Garcia CC, Lugo E, Alfonzo MJ, Jowers MJ, Op den Camp HJ. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2006;142(3-4):240-52.
246. David RM, Krishna NR, Watt DD. Characterization of cationic binding sites of neurotoxins from venom of the scorpion (*Centruroides sculpturatus* Ewing) using lanthanides as binding probes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 1991;29(6):645-62.
247. Jablonsky MJ, Jackson PL, Krishna NR. Solution structure of an insect-specific neurotoxin from the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochemistry*. 2001;40(28):8273-82.
248. Xu Y, Jablonsky MJ, Jackson PL, Braun W, Krishna NR. Automatic assignment of NOESY cross peaks and determination of the protein structure of a new world scorpion neurotoxin using NOAH/DIAMOD. *Journal of magnetic resonance*. 2001;148(1):35-46.
249. Nascimento DG, Rates B., Santos, D.M., Verano-Braga, T., Barbosa-Silva, A., Dutra, A. A., Biondi, I., Martin-Eauclaire, M.F., De Lima, M.E., Pimenta, A.M. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2006;47(6):628-39.
250. Carmo AO, Oliveira-Mendes, B. B., Horta, C. C., Magalhaes, B. F., Dantas, A. E., Chaves, L. M., Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E. . Molecular and functional characterization of metallo-serrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2014;90:45-55.
251. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*. 2000;82(9-10):861-8.

Anexo A: Preparación de geles SDS-PAGE- Tris-Tricina.

Tabla AnexoA1. Cantidades de reactivos empleados para la preparación de geles SDS-PAGE, en tris Tricina. Para la identificación de péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*.(121)

Reactivo	Gel de Separación 15%	Gel de concentración 10%
Acrilamida: bisacrilamida (48%T; 1,5%C)	1,5 mL	324 µL
Buffer (Tris- HCl 3,0M, 0,3%SDS pH 8,45)	1,67 mL	0,62 mL
Agua desionizada	1,3 mL	1,55 mL
Glicerol	530 µL	---
Persulfato de Amonio 10%	50 µL	13,3 µL
TEMED	8 µL	1,5 µL
Volumen total	5 mL	2,5 mL

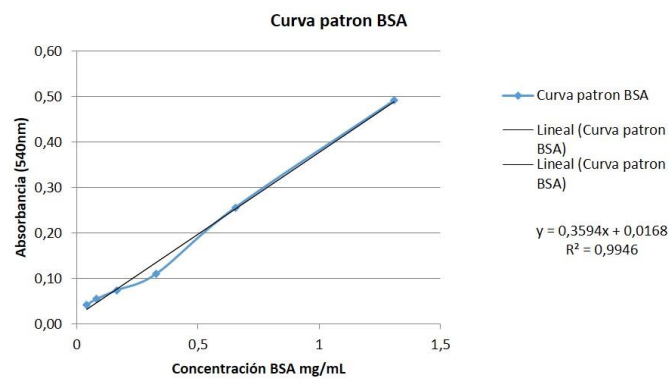
Anexo A2: Preparación de geles SDS-PAGE- Tris-Glicina.

Tabla Anexo A2. Cantidades de reactivos empleados para la preparación de geles SDS-PAGE, en Tris Glicina. Para la identificación de péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, y la segunda dimensión de 2D. (122)

Reactivo	Gel de Separación 7,5%	Gel de Separación 10%	Gel de Separación 16%	Gel de concentración 10%	Gel de Separación 12%
Acrilamida: Bisacrilamida (30%)	3,75 mL	5 mL	7,5 mL	2 mL	4 mL
Buffer (Tris- HCl 1,5M, pH 8,8)	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL
Glicerol	--	1,5mL	2,25 mL	---	1.5 mL
SDS 10%	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
Persulfato de Amonio 10%	75 µL	75 µL	75 µL	7 5µL	7 5µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Agua desionizada	7,27 mL	6 mL	1,25 mL	3 mL	5 mL
Volumen total	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	15 L

Anexo B: Curva de calibración para la cuantificación de proteína total soluble del veneno de *T. macrochirus*, por medio del método de BCA.

Figura B1. Curva de calibración de BSA. Determinación de concentración de proteína soluble del veneno *T. macrochirus*, a partir de la ecuación de la recta, empleando como



patrón de proteína BSA.

Tabla B1. Cuantificación de concentración de proteína total soluble del veneno *T. macrochirus*, obtenidos por el método de ácido bicinconínico. Los datos se obtuvieron a partir de la ecuación de la recta dada en la curva de calibración de BSA, por el método de cuantificación de proteína BCA.

Abs BSA	*[BSA]	AbsMV1	*[Proteína MV1]	Abs MV2	*[Proteína MV2]	Abs MV3	*[Proteína MV3]
0,49	1,31	0,87	2,36	0,90	1,18	1,70	2,43
0,26	0,66	0,52	1,41	0,64	0,77	0,48	0,51
0,11	0,33	0,25	0,64	0,31	0,24	0,50	0,54
0,07	0,16	0,11	0,26	0,20	0,07	0,24	0,14
0,06	0,08	0,06	0,13	0,17	0,03	0,20	0,07
0,04	0,04	0,04	0,07	0,13	-0,03	0,18	0,05

MV=Muestra de veneno total *T. macrochirus*.

Tabla B2. Cuantificación de proteína soluble total presente en el veneno de *T. macrochirus*, por el método de espectrofotometría (Suelter CH, 1985).

Muestra	Abs 260nm	Abs 280nm	[Proteína] mg/mL	µg Proteína Total
MV1	2,066	2,233	1,89	378,20
MV2	1,574	1,932	1,79	359,67
MV3	1,56	1,913	1,77	355,91

MV=Muestra de veneno total *T. macrochirus*

Tabla B3. Cuantificación de proteína soluble total presente en el veneno de *T. macrochirus*, por el método de espectrofotometría ([Possani, Martin et al. 1985.](#)).

Muestra	Abs 280nm	[Proteína] mg/mL	µg Proteína Total
MV1	1,555	1,55	231,8
MV2	1,001	1,00	100,1
MV3	2,318	2,32	232

MV=Muestra de veneno total *T. macrochirus*

Anexo C: Cromatografía de columna abierta

Anexo C1. Cromatografía de filtración en gel con soporte de BioGelP30.

Para el desarrollo de este método se realizó empleando dos cantidades diferentes de veneno total, como se describe a continuación.

- En el primer ensayo, se sembraron 32,14 μg de proteína total del veneno de *T. macrochirus*. obteniendo 7 fracciones (Figura C1).
- El segundo ensayo se realizó con 279,1 μg de proteína total del veneno del escorpión, obteniendo tres fracciones (Figura C2).

Cada una de las fracciones obtenidas, por este método se liofilizaron y una vez secas, se re-suspendieron en 100 μL de agua grado HPLC y se les determinó su concentración de proteína total por el método de absorción a 280 nm, obteniendo valores de cantidad de proteína, en cada una de las fracciones menores a 0,5 μg , con un porcentaje de menor a 0,5% (Tabla C1).

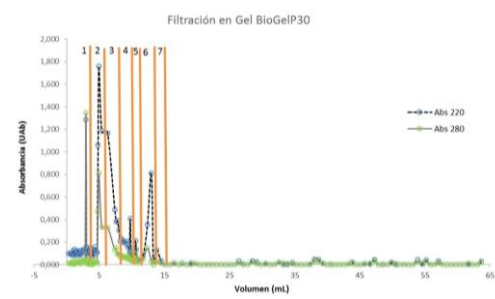


Figura C1. Perfil cromatográficos de cromatografía en filtración en gel BioGelP30, del veneno total de *T. macrochirus*. Cada una de las líneas indica las 7 fracciones obtenidos durante la purificación del veneno total. La línea discontinua

indica la absorbancia a 220nm y la línea continua la absorbancia a 280nm.

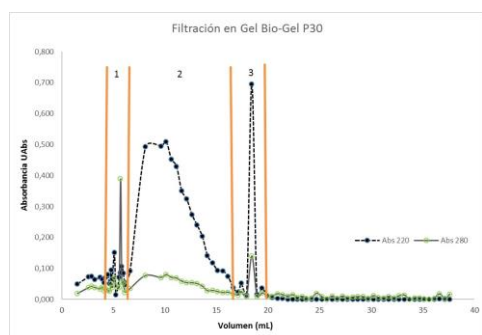


Figura C2. Perfil cromatográficos de cromatografía en filtración en gel BioGelP30, del veneno total de *T. macrochirus*. Cada una de las líneas indica las 3 fracciones obtenidos durante la purificación del veneno total. La línea discontinua indica la absorbancia a 220nm y la línea continua la absorbancia a 280nm.

Tabla C1. Concentración de las fracciones obtenidos en las cromatografías de filtración en gel (CF). Se muestra la concentración y rendimiento de las dos purificaciones realizados con el soporte de BioGel P30.

Fracciones Primera CF	Proteína Total µg	%de <u>Recuperación</u> en la purificación	µg de proteína para RP-HPLC	Fracciones Segunda CF	Proteína Total µg	%de <u>Recuperación</u> en la purificación	µg de proteína para RP-HPLC
1	0,025	0,078	0,0050	1	0,042	0,0150	0,0084
2	0,069	0,215	0,0138	2	0,529	0,1895	0,1058
3	0,044	0,137	0,0088	3	0,025	0,0090	0,005
4	0,006	0,019	0,0012				
5	0,025	0,078	0,0050				
6	0,045	0,140	0,0090				
7	0,029	0,090	0,0058				

Una vez determinada la concentración de cada una de las fracciones obtenidas, se analizaron por el método A de RP-HPLC, con las cantidades descritas en la tabla 1, para detectar la presencia de péptidos purificados por el método de filtración en gel BioGel-

P30 (Figura C3). Al comparar los cromatogramas de RP-HPLC con el cromatograma del veneno total de *T. macrochirus* (Figura C3), ninguna de las fracciones presento señales significativas o similares a las observadas en el cromatograma del veneno total, pero si presenta un cromatograma muy similar al blanco (Figura C3A y B).

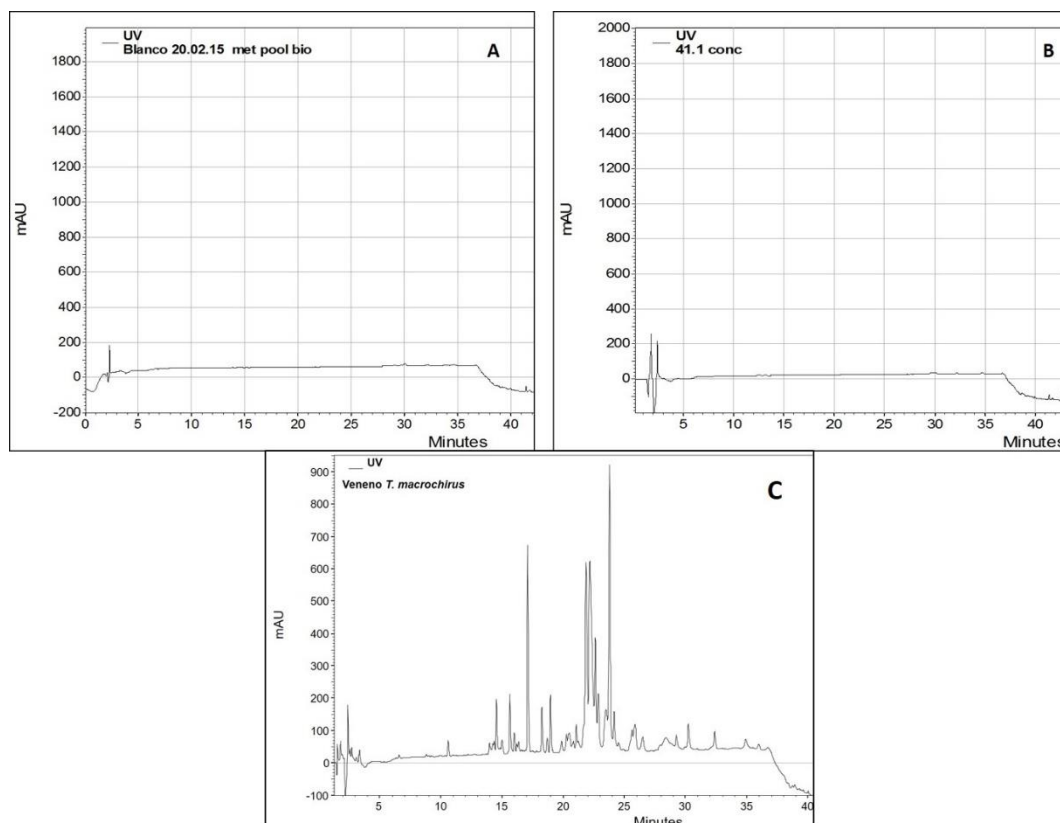


Figura C3 Cromatogramas de RP-HPLC, de las fracciones obtenidas en filtración en gel por BioGelP30. A. Cromatograma del blanco (H_2O), no se observa ningún tipo de señal o interferencia para la detección de péptidos. **B.** Cromatograma de una de la fracción 2 de la primera Filtración en Gel BioGelP30. No se observa ningún tipo de señal diferente al blanco. **C.** Cromatograma del veneno total, se logran observa cada una de las señales correspondientes a péptidos.

Anexo C2. Cromatografía de intercambio aniónico

Para este método se emplearon 3,74 μ g, de proteína total. En el desarrollo de este

método se logró obtener una señal mayor a 0,3UA en la elución de 150mM de NaCl y tres señales con una absorbancia mayor 0,1 UA durante la elución con 250mM de NaCl (figura C4). Se reunieron las fracciones que reportarán absorbancia mayor de 0,05 UA y cada uno de las fracciones obtenidos se liofilizaron y se re-suspendieron en 100µL de agua grado HPLC.

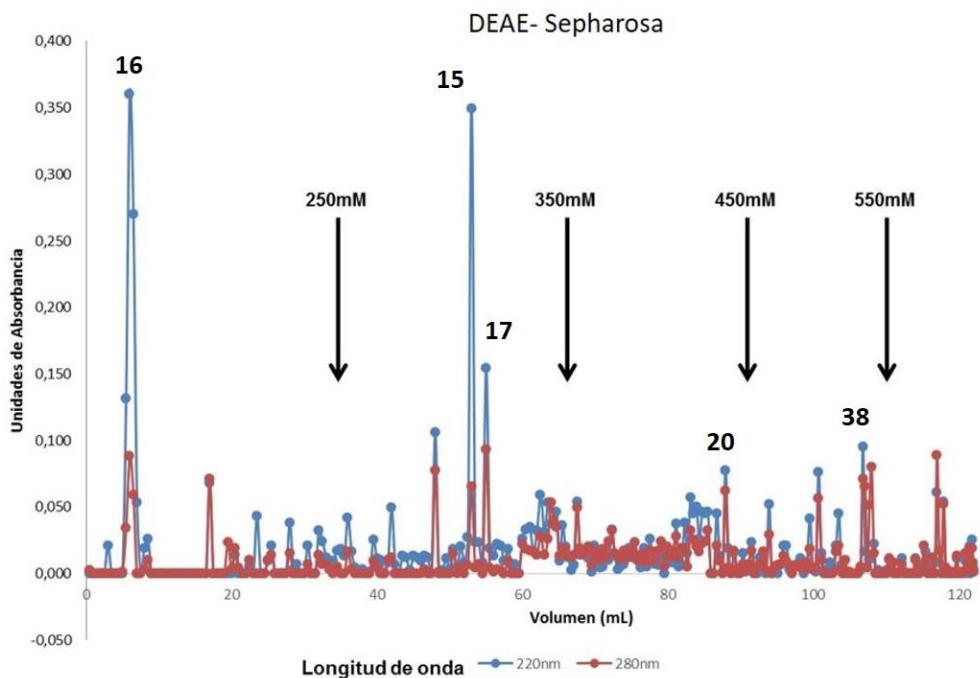


Figura C4. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico. Se realizó empleando un soporte de DEAE-Sepharosa. Las flechas indican la concentración de NaCl, el que se realizó el intercambio. Los números indican las fracciones obtenidas con las concentraciones de con absorbancia mayor a 0,05UA.

Las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico, se les determinó su concentración por absorción a 280nm, reportando varios datos de concentración menor de cero, y unos pocos mayor a este valor (tabla C2).

Las fracciones con concentración mayor a 0,1, se analizaron por RP-HPLC (método A), posterior a su liofilización (Figura C5). Pero no se observaron señales diferentes al blanco referente o similares al del veneno total de *T. macrochirus* (figura C5C), ni semejantes a las obtenidas del veneno total de *T. macrochirus*.

Tabla C2. Concentración de las fracciones obtenidas en cromatografía de intercambio aniónico. En cada fracción el valor que se encuentra en paréntesis indica la concentración de NaCl a la cual fue eluida.

FRACCIÓN	CONCENTRACIÓN µg/µL	µg de proteína analizados en RP- HPLC	%Rendimiento de la purificación
16(150mM)	0,023	2,3	0,61
15(250mM)	0,0166	1,66	4,43
17(250Mm)	0,0107	1,7	2,86
20(350Mm)	0,015	1,5	0,401
38(450Mm)	0,0090	0,9	0,24

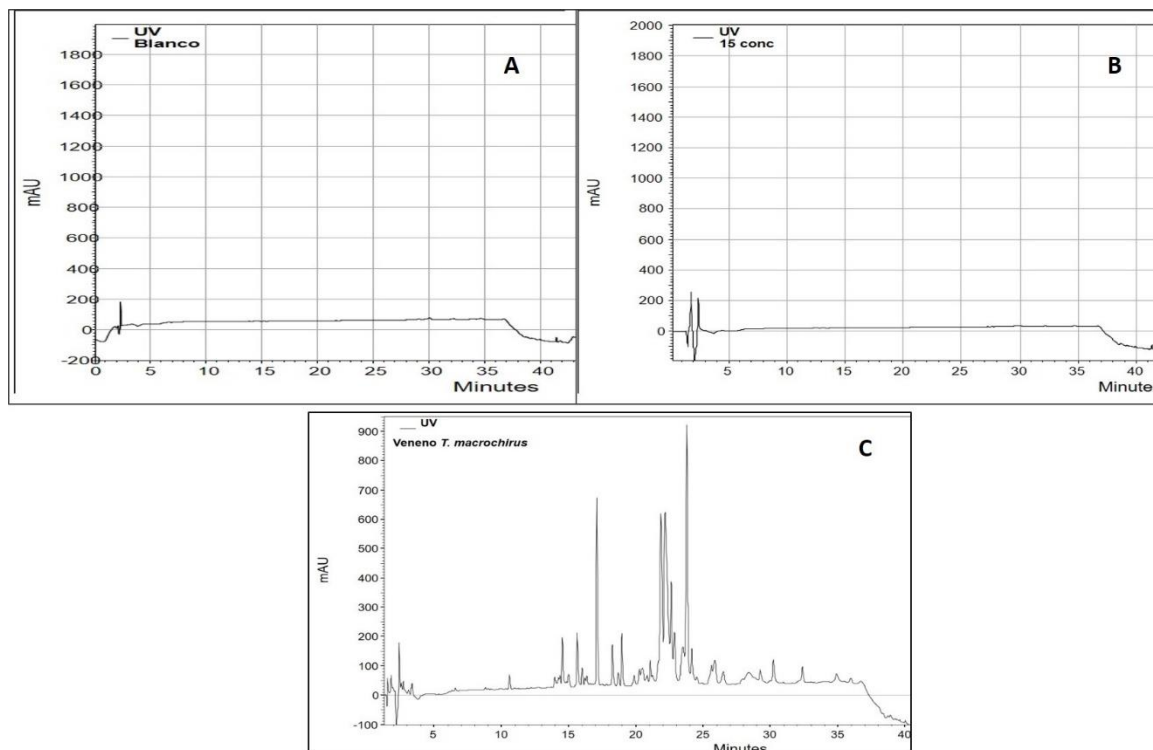


Figura C5. Cromatograma RP-HPLC, de la fracción obtenida en cromatografía de intercambio aniónico. A. Cromatograma del blanco (H₂O), B. Cromatograma de

la fracción 15, **C**. Cromatograma del veneno total. No se observan señales de la fracción 61, que podrían ser correspondientes a péptidos.

Anexo C2. Cromatografía de intercambio catiónico

La cromatografía de este tipo, se realizó con CM-Sephadex, con 2,26 μ g. se obtuvieron tres fracciones con unidades de absorbancia mayores a 0,05, durante la elución con 150mM y 450mM de NaCl (figura C6). Cada una de las fracciones se liofilizaron. Una vez secas se re-suspendieron en 200 μ L de agua.

Al determinar la concentración por absorbancia a 280nm, reportaron valores menores a cero. Por lo cual se seleccionaron las fracciones con unidades de absorbancia mayores a 0,05UA (Figura C6), para realizar el análisis por RP-HPLC. Pero no se logró observar ningún tipo de señal diferente al blanco de referencia, o similares al del veneno total. (Figura C7).

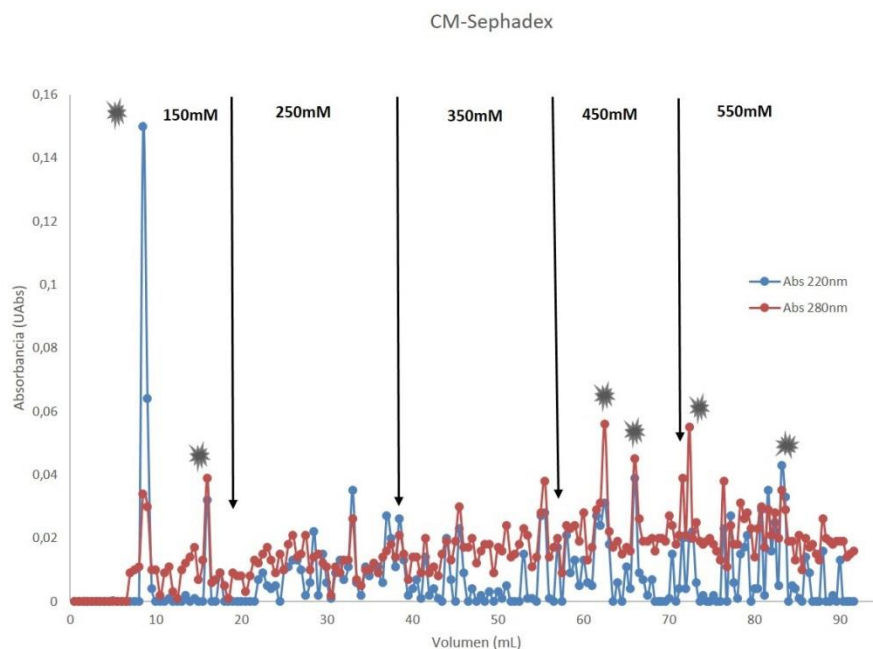


Figura C6. Perfil cromatográficos de intercambio catiónico. Se realizó empleando un soporte de CM- Sephadex. Las flechas indican la concentración de NaCl, el que se realizó el intercambio. Para el análisis por RP-HPLC se seleccionaron las fracciones señaladas con *.

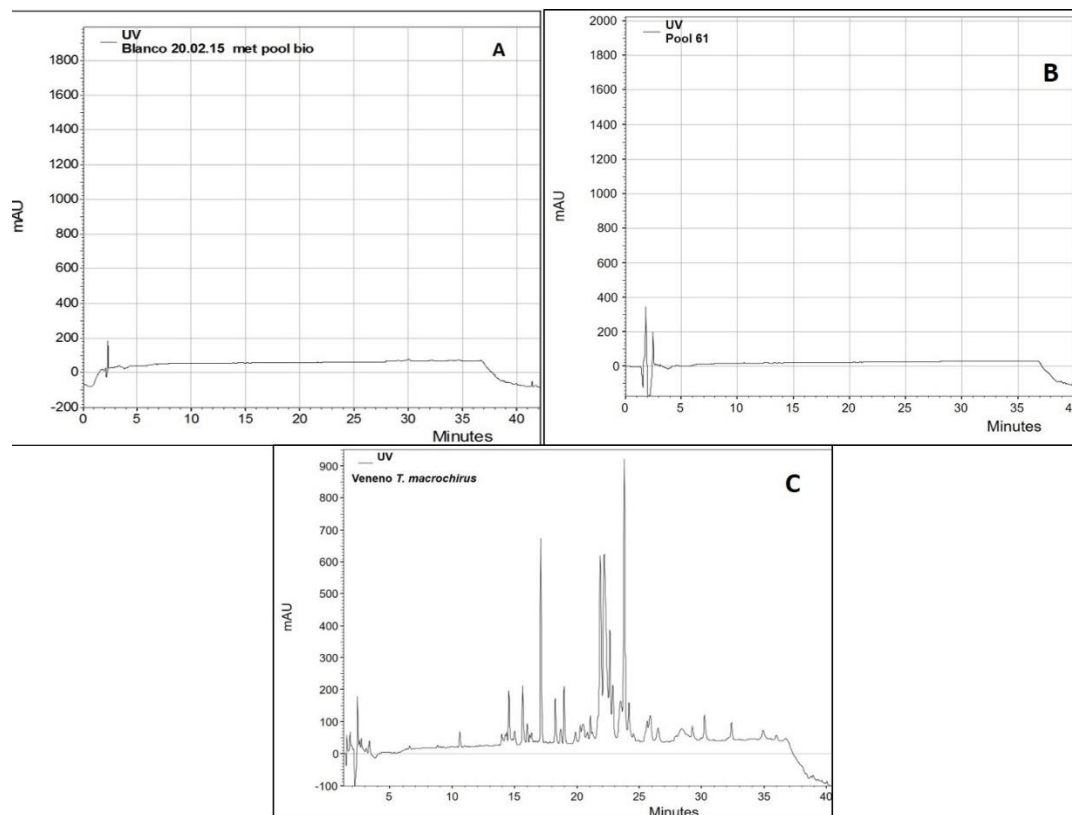


Figura C7. Cromatograma RP-HPLC, de una de las fracciones obtenidas en cromatografía de intercambio catiónico. El cromatograma de la fracción 61, seleccionada por presentar absorción mayor de 0,05UA. No se observan señales diferentes al blanco de referencia o relacionadas con las del veneno total.

ANEXO D. Método de Ultrafiltración:

Para el desarrollo de este método se inició con 130 µg de proteína total del veneno de *T. macrochirus*, los cuales fueron ultrafiltrados inicialmente con el Amicon Ultra-0,5® 100 kDa (Diagrama 1), hasta obtener el Retentato con el Amicon Ultra-0,5® 3 kDa. A cada uno de los retentatos y difusatos obtenidos se les determinó la concentración por el factor de absorbancia a 260nm y 280 nm, (Tabla D1). El retentato de interés obtenido en la ultrafiltración fue el de Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, el cual posee un total de proteína de 4,49 µg, con un porcentaje de recuperación de 3,44%. (Este procedimiento se realizó tres veces).

Tabla D1. Ultrafiltración del veneno total de *T. macrochirus*. Concentración y cantidad de proteína total obtenida por la ultrafiltración del veneno de *T. macrochirus* desde el Amicon Ultra-0,5® de 100 kDa, hasta el Amicon Ultra-0,5® 3 kDa.

Fracción	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Volumen (µL)	Concentración Proteína [µg/µL]	µg proteína
Veneno	0,648	0,738	200	0,65142	130,284
1mer Filtrado 100 kDa	0,572	0,646	150	0,56658	84,987
1mer Retenido 100 kDa	0,287	0,284	200	0,22208	44,416
2do Filtrado 100 kDa	0,269	0,348	170	0,33496	56,9432
2do Retenido 100 kDa	0,204	0,176	200	0,11776	23,552
3cer Filtrado 100 kDa	0,238	0,274	170	0,24382	41,4494
3cer Retenido 100 kDa	0,187	0,153	200	0,09503	19,006
4to Filtrado 100 kDa	0,204	0,223	165	0,19061	31,45065
4to Retenido 100 kDa	0,541	0,449	200	0,28479	56,958
5to Filtrado 100 kDa	0,031	0,021	160	0,00899	1,4384
5to Retenido 100 kDa	0,157	0,128	200	0,07908	15,816

6to Filtrado 100 kDa	0,017	0,01	157	0,00258	0,40506
6to y final Retenido 100 kDa	0,147	0,128	200	0,08668	17,336
Filtrado Total	0,128	0,138	1200	0,11662	139,944
Filtrado 100 kDa para 50 kDa	0,137	0,151	400	0,12993	51,972
1mer Filtrado 50 kDa	0,064	0,081	350	0,07691	26,9185
1mer Retenido 50 kDa	0,055	0,053	200	0,04035	8,07
2do Filtrado 50 kDa	0,066	0,046	600	0,02114	12,684
2do Retenido 50 kDa	0,072	0,063	200	0,04293	8,586
3cer Filtrado 50 kDa	0,044	0,05	700	0,04406	30,842
3cer Retenido 50 kDa	0,036	0,025	200	0,01139	2,278
4to Total Filtrado 50 kDa	0,035	0,033	700	0,02455	17,185
4to Total Retenido 50 kDa	0,028	0,02	100	0,00972	0,972
Muestra de 50 kDa para 30 kDa	0,035	0,033	300	0,02455	7,365
1mer Filtrado 30 kDa	0,007	0,007	270	0,00553	1,4931
1mer Retenido 30 kDa	0,021	0,023	200	0,01969	3,938
2do Filtrado 30 kDa	0,034	0,032	165	0,02376	3,9204
2do Retenido 30 kDa	0,043	0,045	200	0,03707	7,414
3cer Total Filtrado 30 kDa	0,026	0,027	600	0,02209	13,254
3cer Total Retenido 30 kDa	0,05	0,048	300	0,0364	10,92
Muestra de 30K para 10 kDa	0,043	0,032	300	0,01692	5,076
1mer Filtrado 10 kDa	0,053	0,044	250	0,02792	6,98
1mer Retenido	0,042	0,048	80	0,04248	3,3984
Muestra del 10 kDa para 3 kDa	0,065	0,059	150	0,04205	6,3075
1mer Filtrado 3 kDa	0,058	0,061	95	0,05047	4,79465
1mer Retenido 3 kDa	0,096	0,088	200	0,06344	12,688
2do Total Filtrado 3 kDa	0,026	0,061	300	0,07479	22,437
2do Total Retenido 3 kDa	0,111	0,083	100	0,0442	4,429

De acuerdo a los resultados obtenidos por la ultrafiltración desde el Amicon Ultra-0,5® 100 kDa, se realizó nuevamente el procedimiento, pero esta vez se inició desde el Amicon Ultra-0,5® 30 kDa (Diagrama 1). Obteniendo una concentración y cantidad de proteína total mayor en el retentato del Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, que lo obtenido con el procedimiento de ultrafiltración iniciando desde Amicon Ultra-0,5® 100 kDa. Que

correspondió a 26,33 µg de proteína total (Tabla D2), con un 20,31% de recuperación, para la purificación de los péptidos del veneno de *T. macrochirus*. (Este procedimiento se realizó por triplicado Tabla D2).

Tabla D2. Ultrafiltración del veneno total de *T. macrochirus*. Concentración y cantidad de proteína obtenida por la ultrafiltración realizada desde el Amicon Ultra-0,5® 30 kDa, hasta 3 kDa.

Fracción	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	Volumen (µL)	[Proteína] µg/µL	µg proteína
Veneno	0,575	0,7	200	0,648	129,6000
1mer Filtrado 30 kDa	0,243	0,262	200	0,22142	44,2840
1mer Retenido 30 kDa	0,362	0,446	200	0,41618	83,2360
2do Filtrado 30 kDa	0,196	0,227	400	0,20289	81,1560
Filtrado Final 30 kDa al 10 kDa	0,196	0,227	300	0,20289	60,8670
1mer Filtrado 10 kDa	0,161	0,17	250	0,14114	35,2850
1mer Retenido 10 kDa	0,121	0,132	200	0,11264	22,5280
2do Filtrado 10 kDa	0,138	0,142	500	0,11522	57,6100
2do Retenido 10 kDa	0,093	0,097	200	0,07967	15,9340
Filtrado Final 10 kDa al 3 kDa	0,138	0,142	300	0,11522	34,5660
1mer Filtrado 3 kDa	0,063	0,058	250	0,04202	10,5050
1mer Retenido 3 kDa	0,173	0,167	200	0,12737	25,4740
2do Filtrado 3 kDa	0,069	0,067	500	0,05141	25,7050
2do Retenido 3 kDa	0,151	0,159	200	0,13169	26,3380

Una vez terminado el método de ultrafiltración por Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, se analizaron 12,6 µg de proteína total, del retentato obtenido en Amicon Ultra-0,5® 3 kDa, por RP-HPLC (método A), encontrándose siete señales que corresponden a péptidos presentes en el veneno de *T. macrochirus*, en tiempos de retención de 15 a 25 minutos y que también se encuentran en el perfil cromatográfico obtenido a partir del veneno total

(Figura D1 A y B). Al comparar estos dos cromatogramas se puede observar que el método de ultrafiltración logra purificar parcialmente los péptidos, que se encuentran en los tiempos de retención de 23 a 25 minutos, con respecto a las señales observadas en el cromatograma del veneno total de *T. macrochirus*.

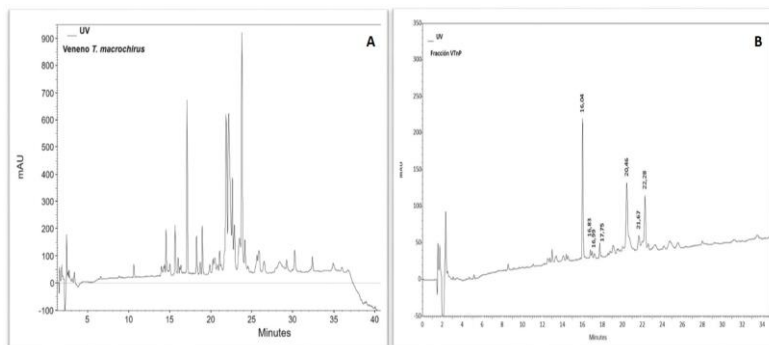


Figura D1. Cromatogramas RP-HPLC (método A, 40 minutos) del veneno total y del retentato de Amicon Ultra-0,5® 3 kDa. A. Cromatograma de 10µg de proteína total del veneno de *T. macrochirus*. **B.** Cromatograma del retentato de Amicon Ultra-0,5® 3 kDa. Se analizaron 12,6 µg de proteína total del retentato 3 kDa. Cada una de las muestras se analizaron con el método A de RP-HPLC. Se marcan los tiempos de retención obtenidos de señales que corresponden a péptidos del veneno de *T. macrochirus*.

Anexo E. Purificación de las fracciones obtenidas en el procedimiento 4.

Perfiles cromatográficos de RP-HPLC, para la purificación de las fracciones obtenidas en el procedimiento 4.

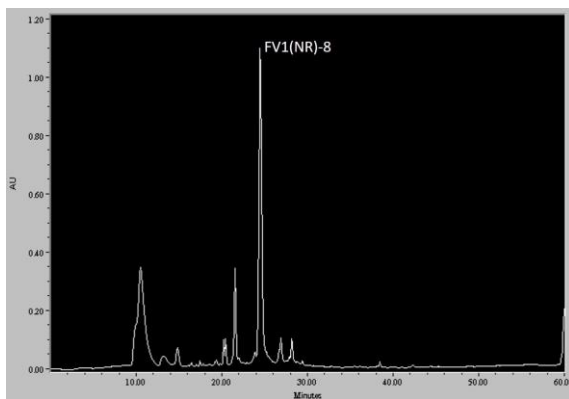


Figura E1. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV1(NR)-8

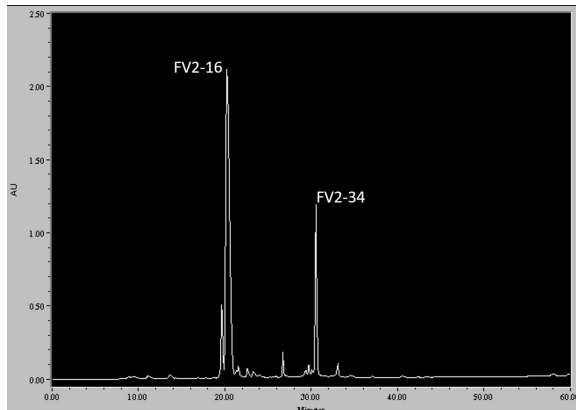


Figura E2. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV2

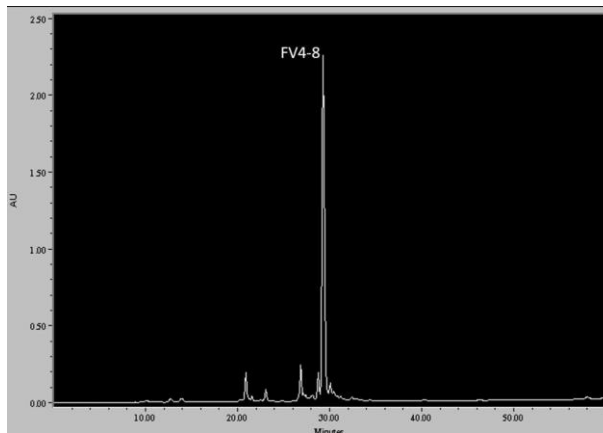


Figura E3. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV3

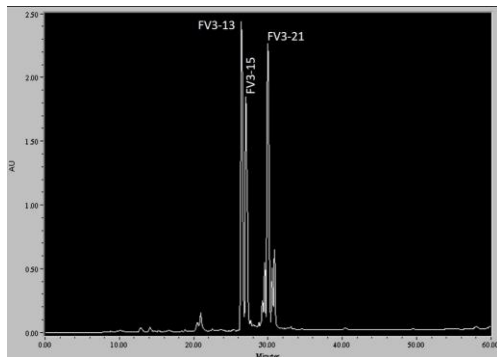


Figura E4. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV4

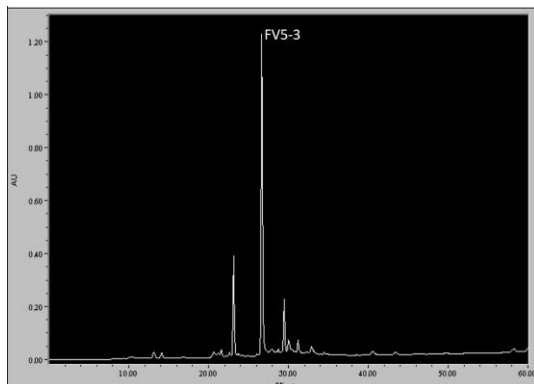


Figura E5. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV5

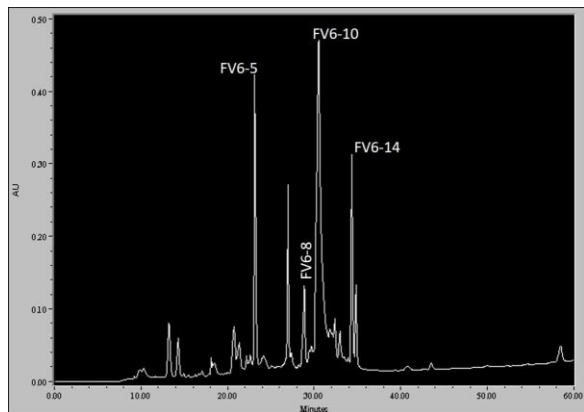


Figura E6. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV6

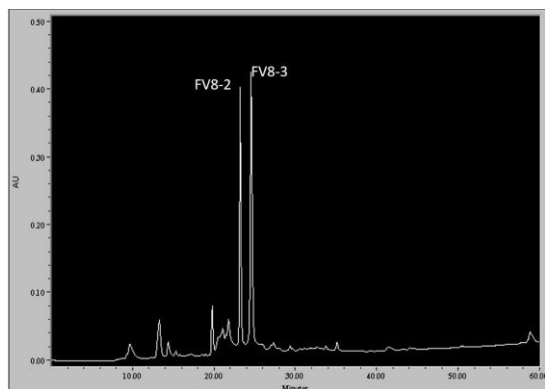


Figura E7. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV7

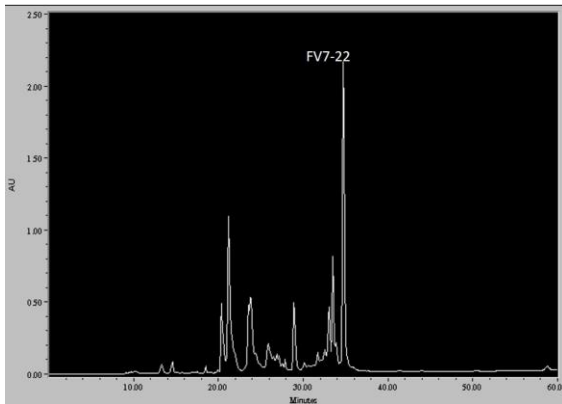


Figura E8. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV8

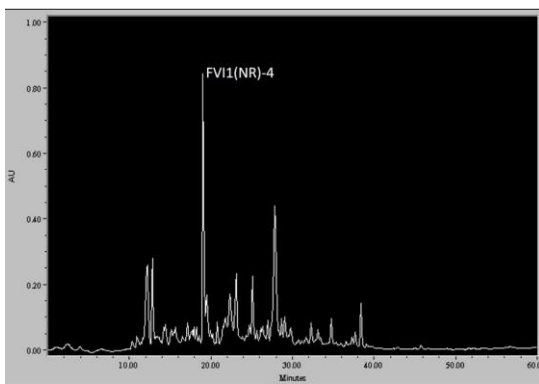


Figura E9. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FVINR

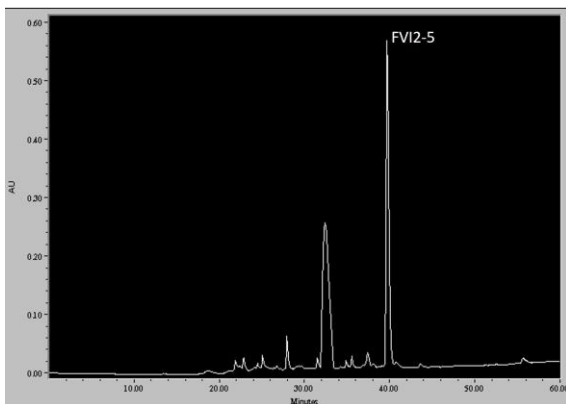


Figura E10. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FVI2

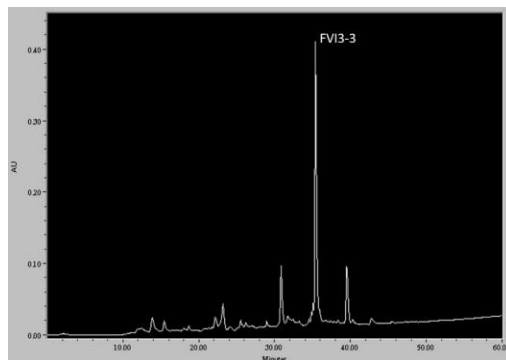


Figura E11. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FVI3

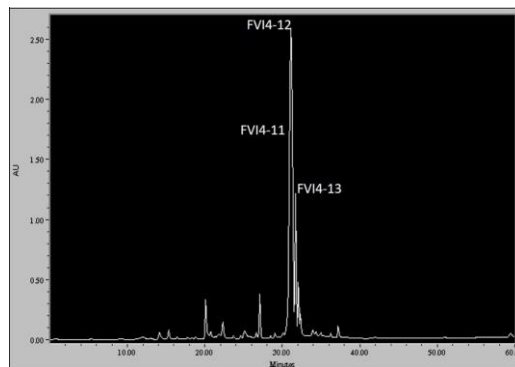


Figura E12. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FVI4

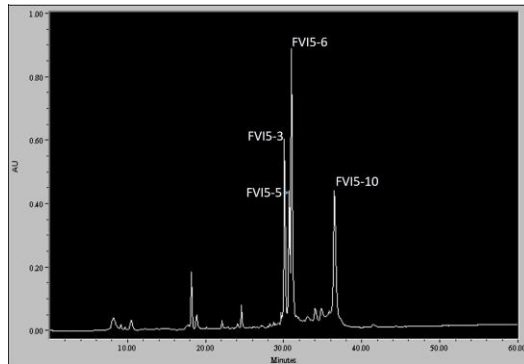


Figura E13. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV15

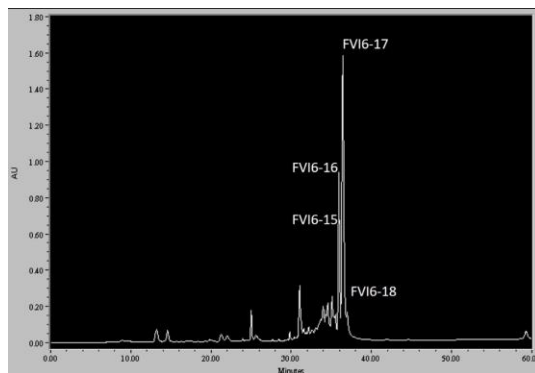


Figura E14. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV16

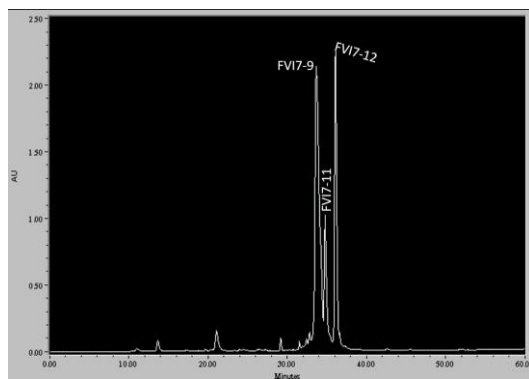


Figura E15. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV17

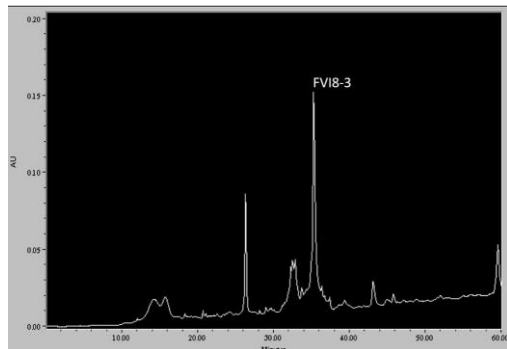


Figura E16. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV18

A la fracción de péptido FV2-16 se realizó reducción y alquilación (Figura E17),

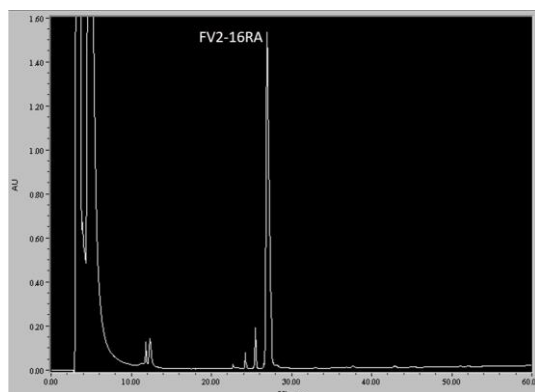


Figura E17. Perfil cromatográfico RP-HPLC, fracción FV2-16RA

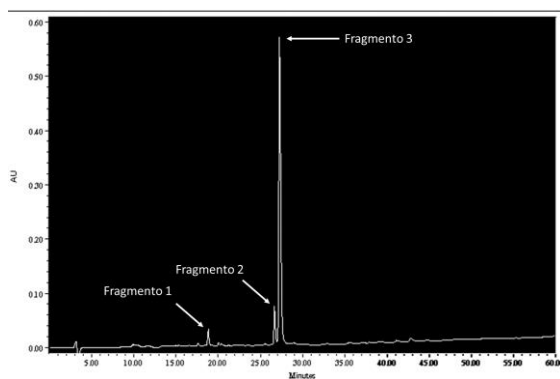
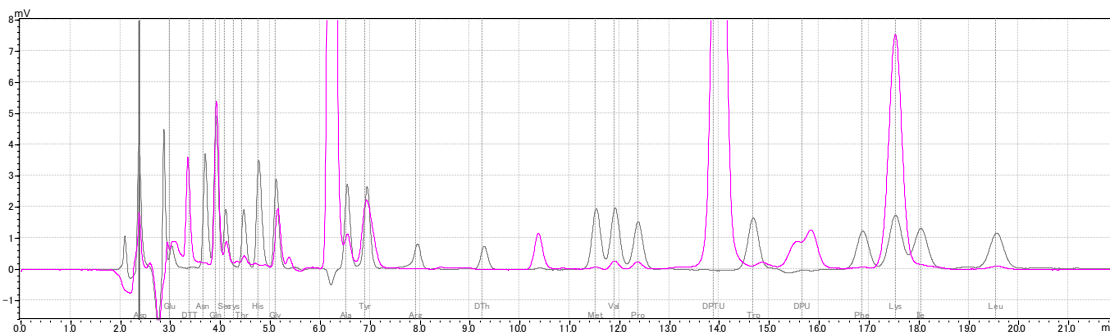


Figura E18. Perfil cromatográfico RP-HPLC, del resultado de digestión del péptido FV2-16RA, para su posterior secuenciación.

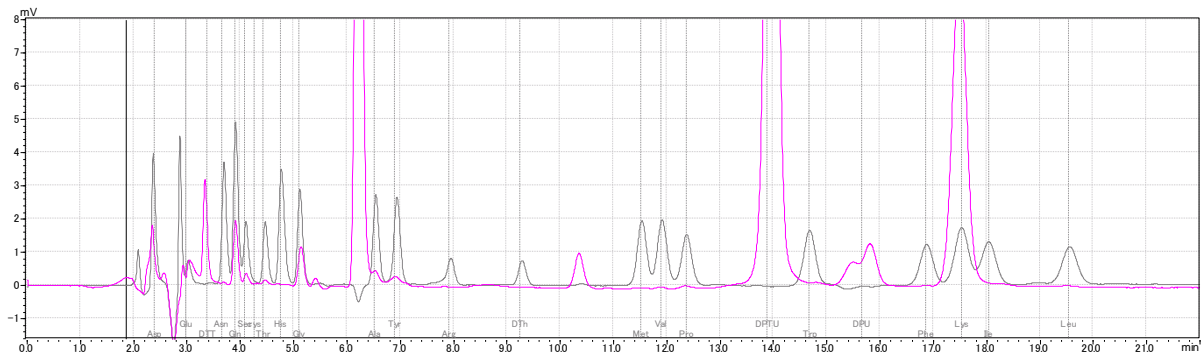
Una vez obtenida la fracción reducida y alquilada del péptido FV2-16, se realizó digestión enzimática con V8, obteniendo tres fragmentos (Figura E18). Al fragmento 2 se realizó degradación automática de Edman y se obtuvo la secuencia primaria de este péptido

Ejemplo de resultado obtenido en la obtención de la secuencia primaria de los péptidos purificados.

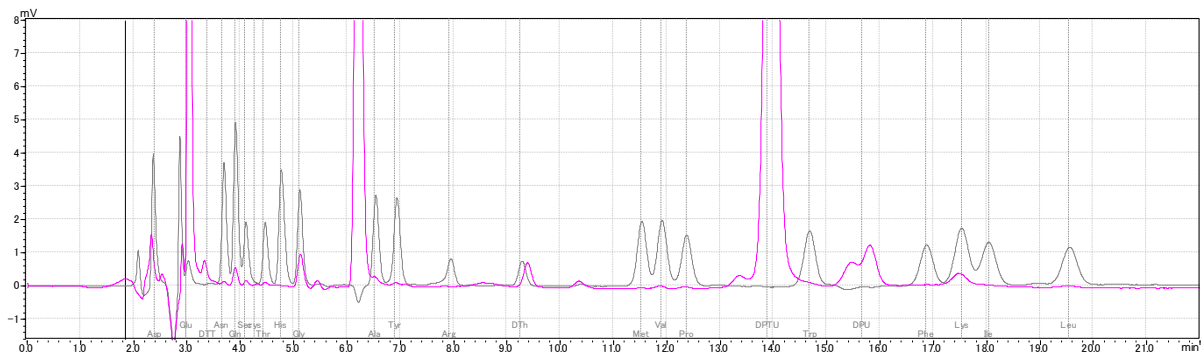
Figura E19. Secuenciación del péptido Tmac FVI5-17RA. Cada una de las figuras corresponden a los ciclos realizados en la secuenciación automática de Edman.



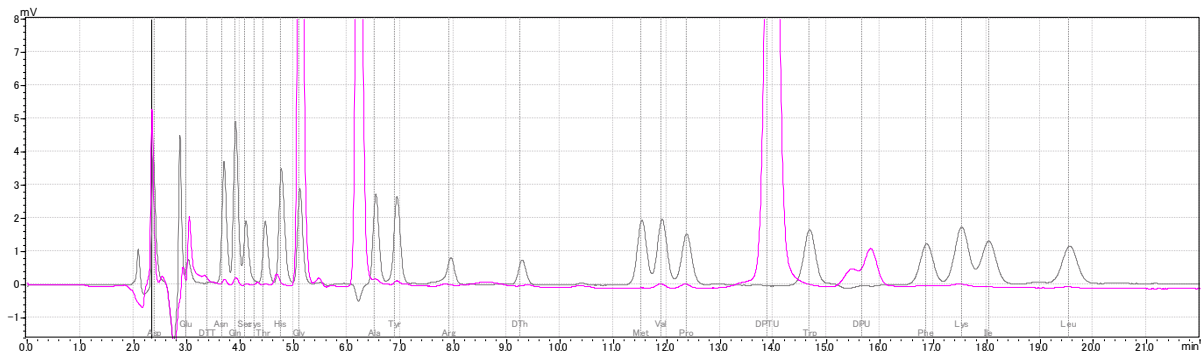
Ciclo1



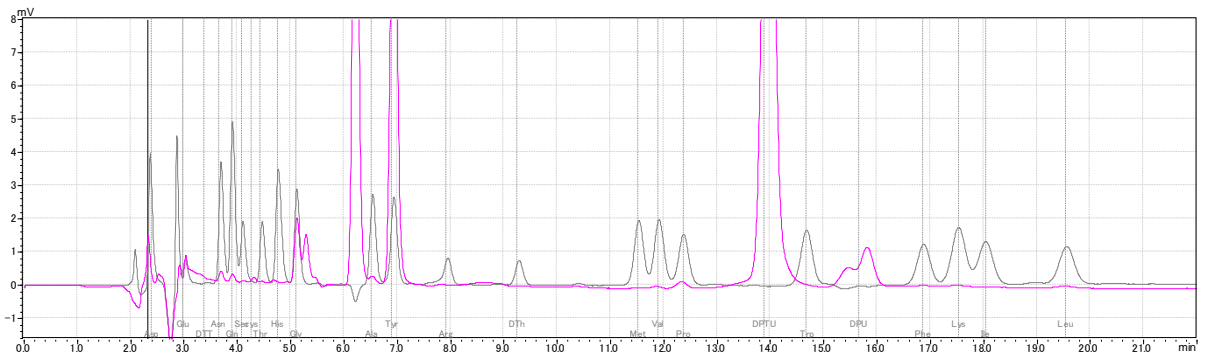
Ciclo2



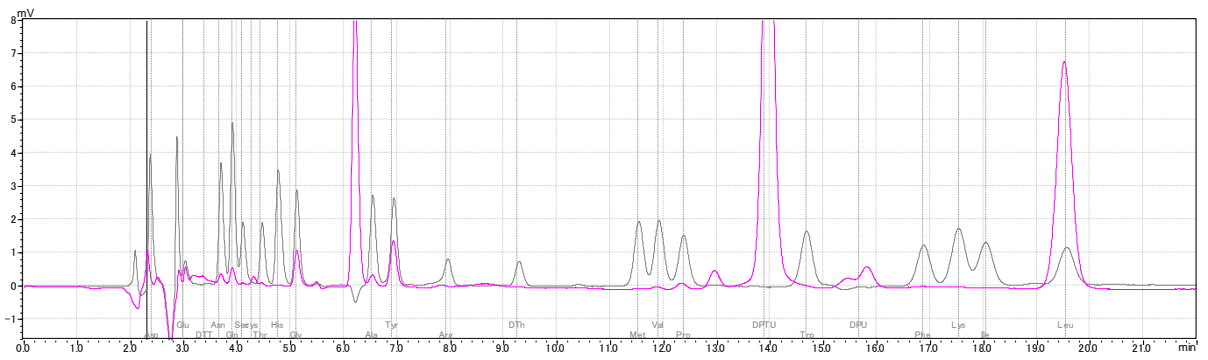
Ciclo3



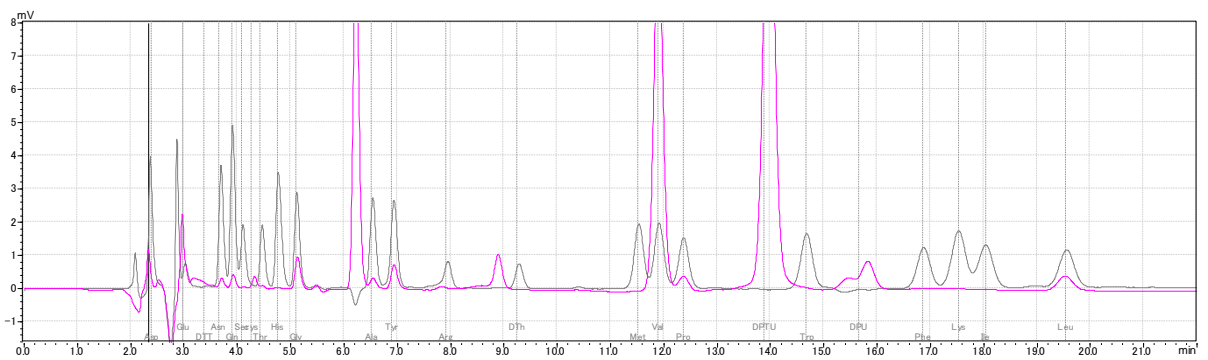
Ciclo4



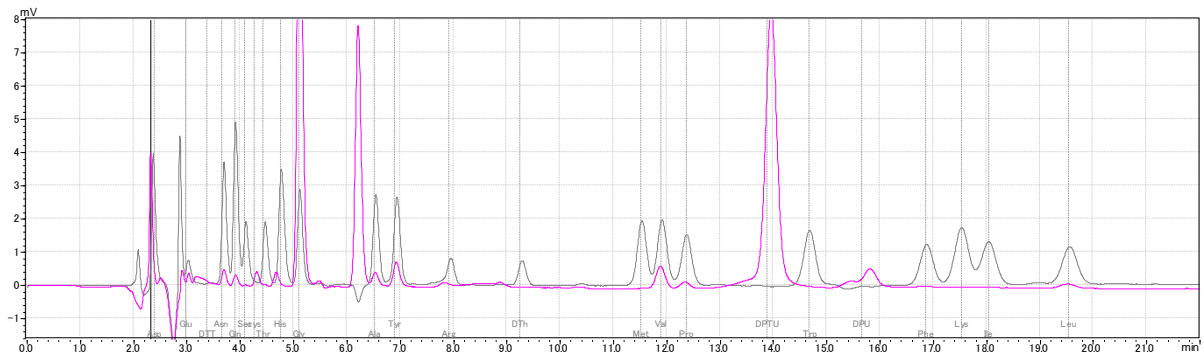
Ciclo5



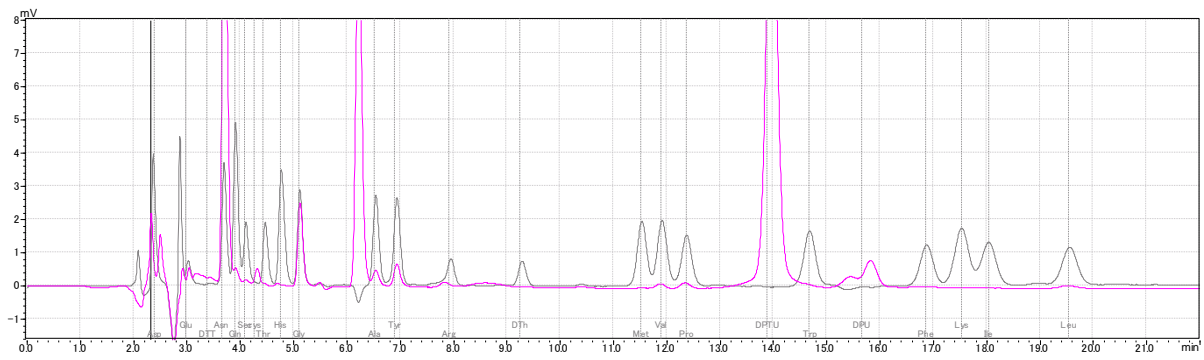
Ciclo6



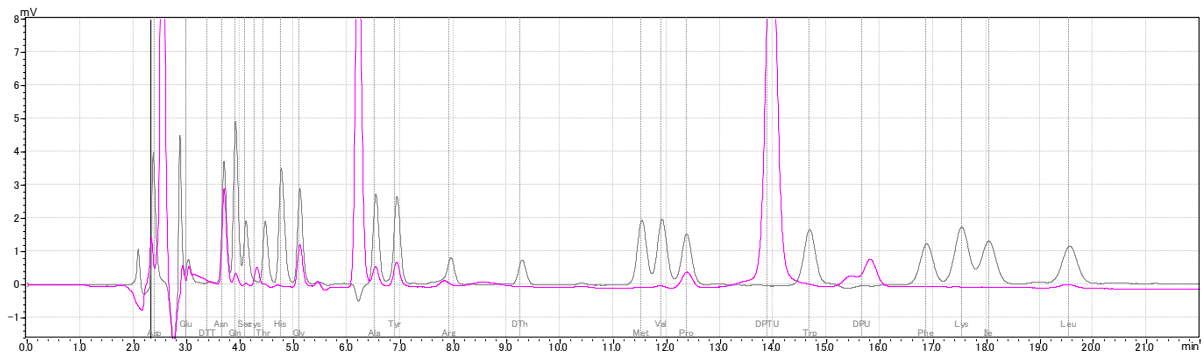
Ciclo7



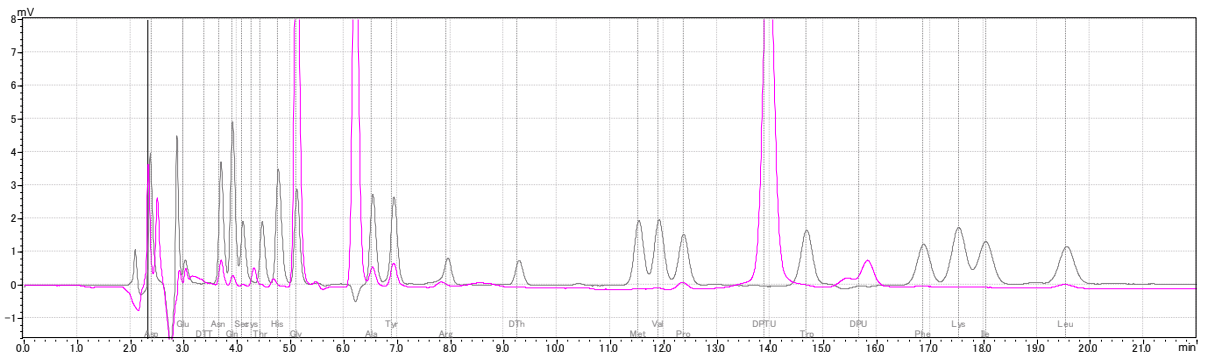
Ciclo8



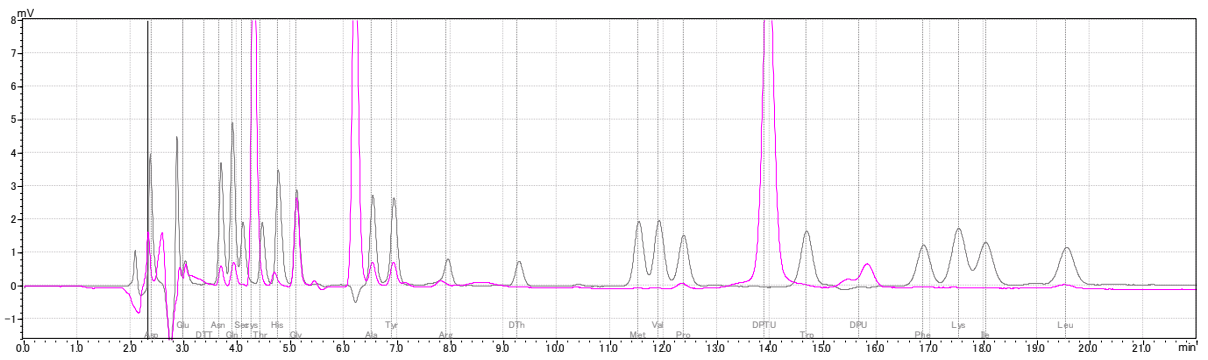
Ciclo9



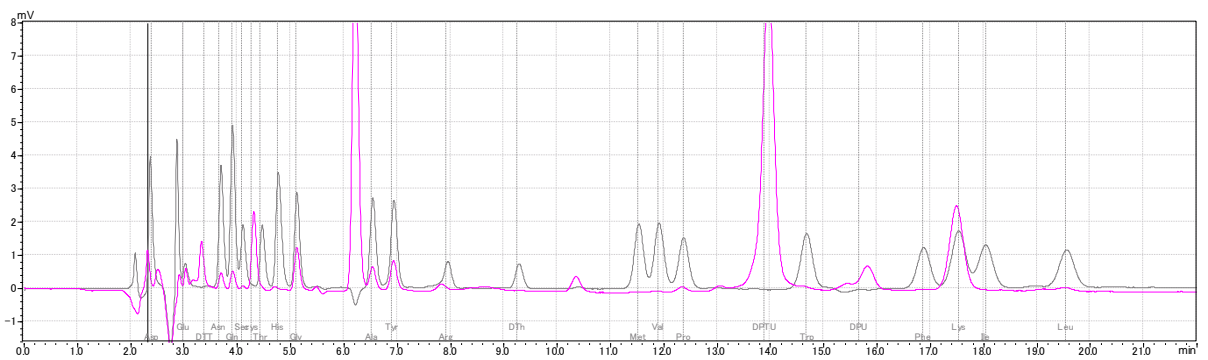
Ciclo10



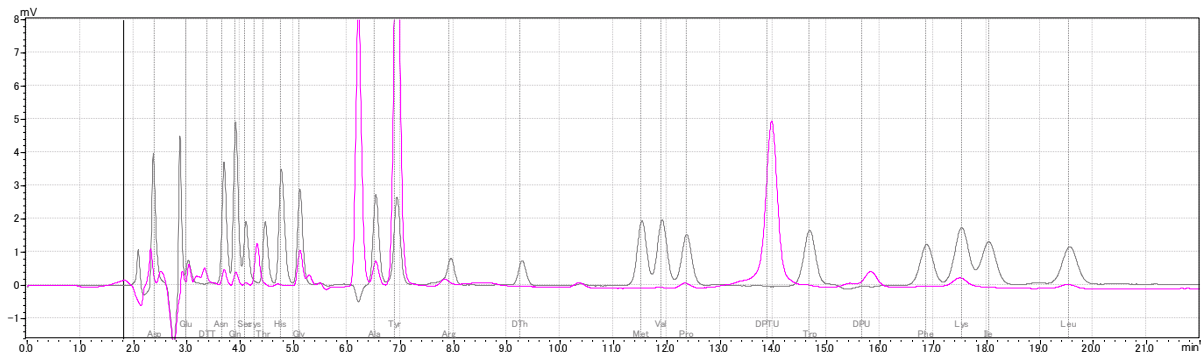
Ciclo11



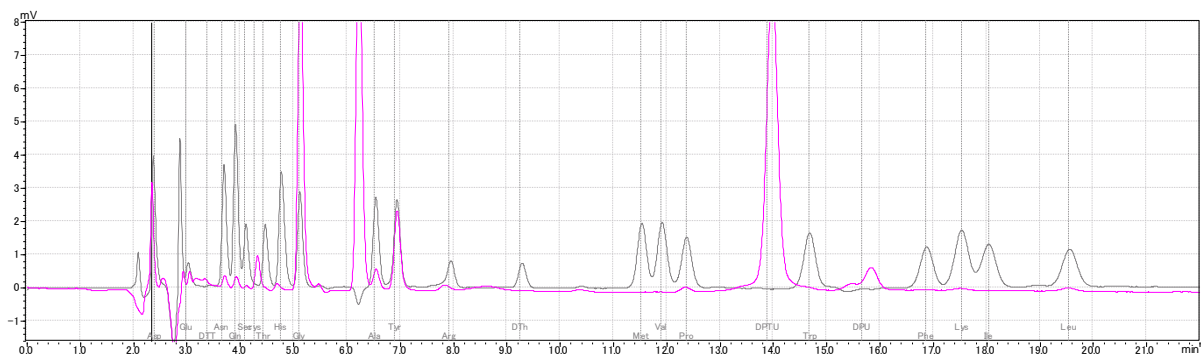
Ciclo12



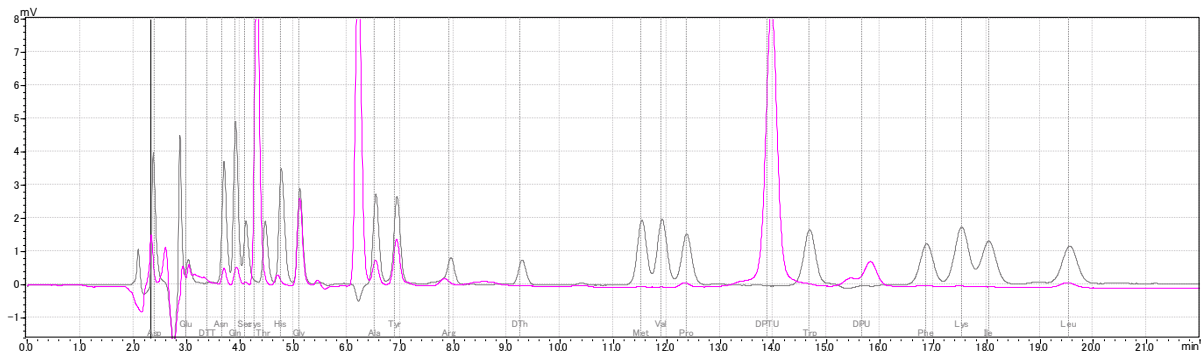
Ciclo13



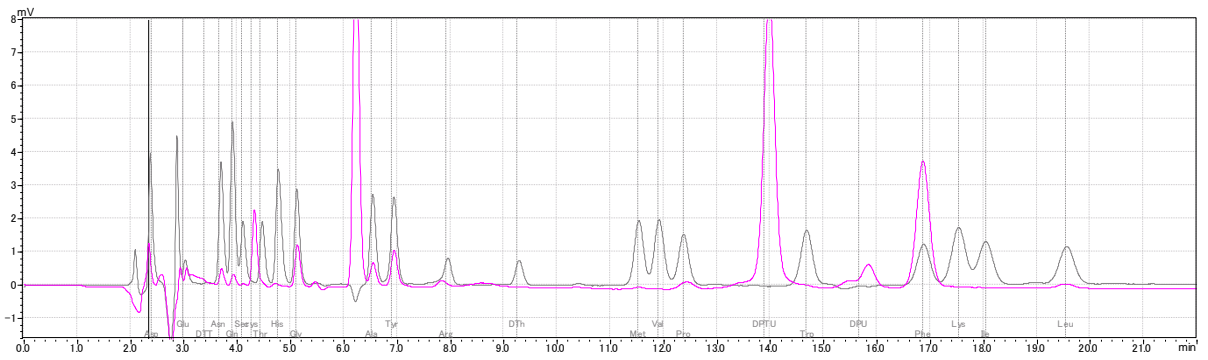
Ciclo14



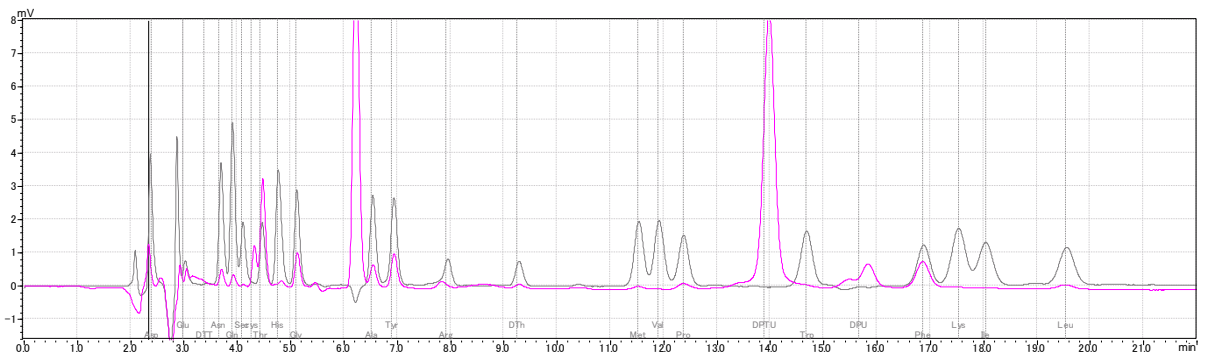
Ciclo15



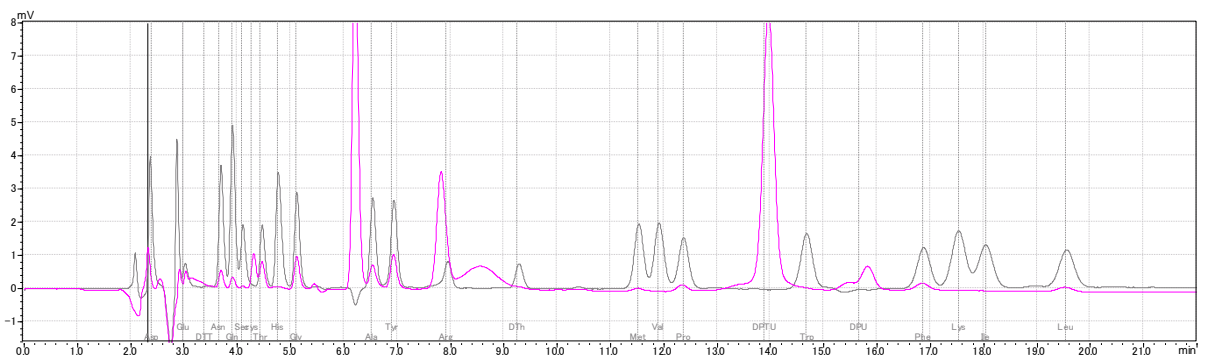
Ciclo16



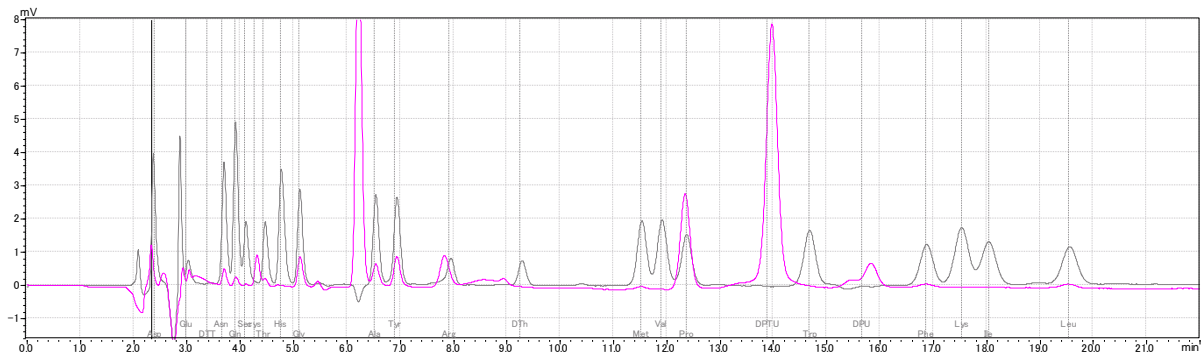
Ciclo17



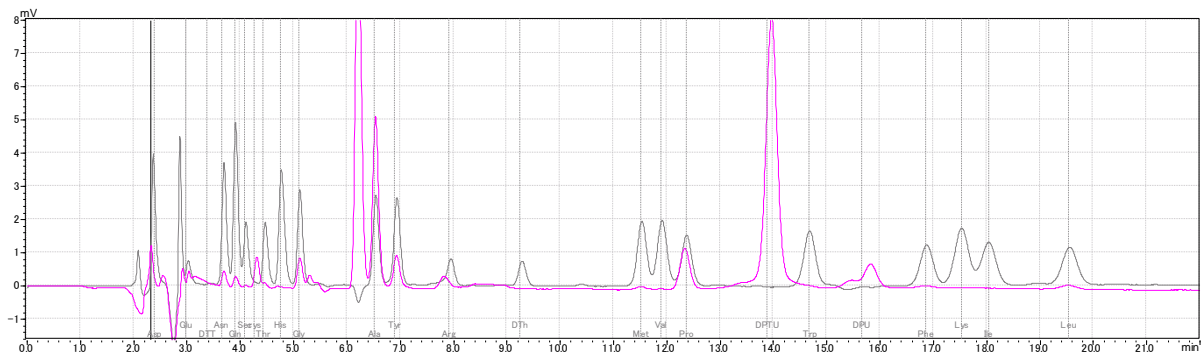
Ciclo18



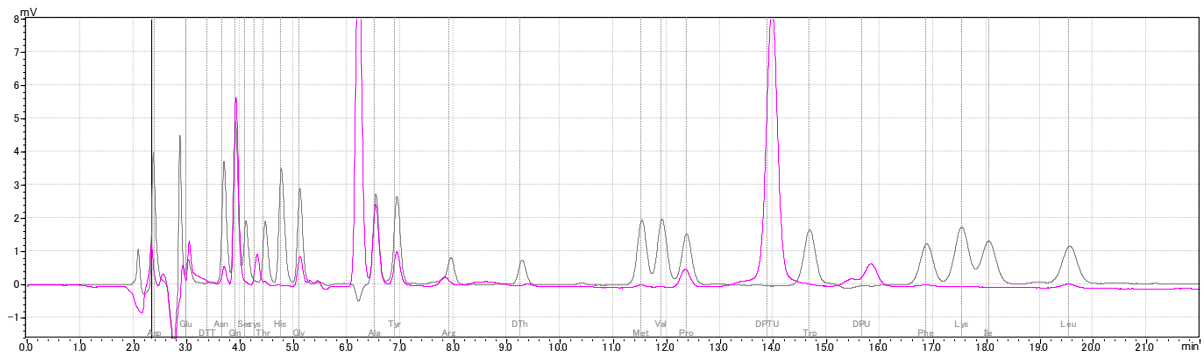
Ciclo19



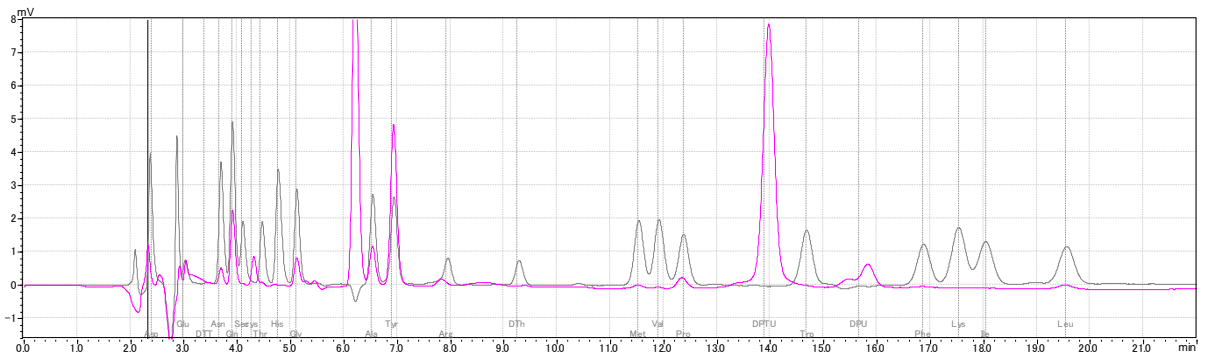
Ciclo20



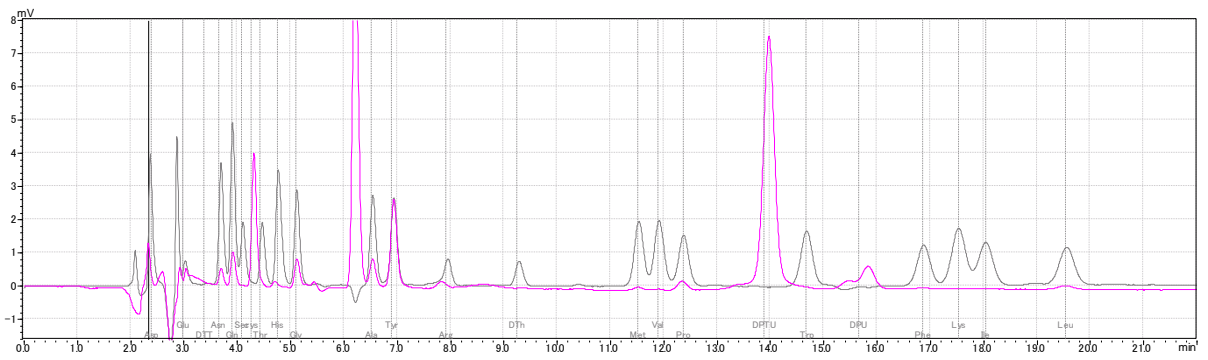
Ciclo21



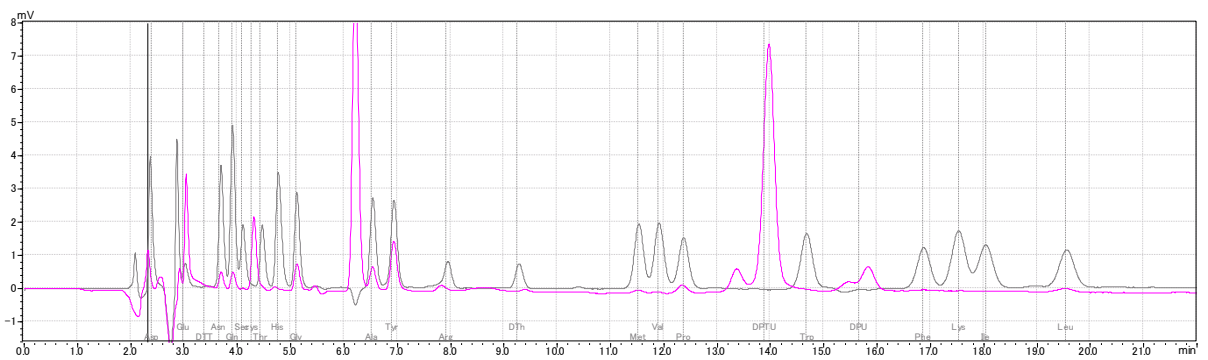
Ciclo22



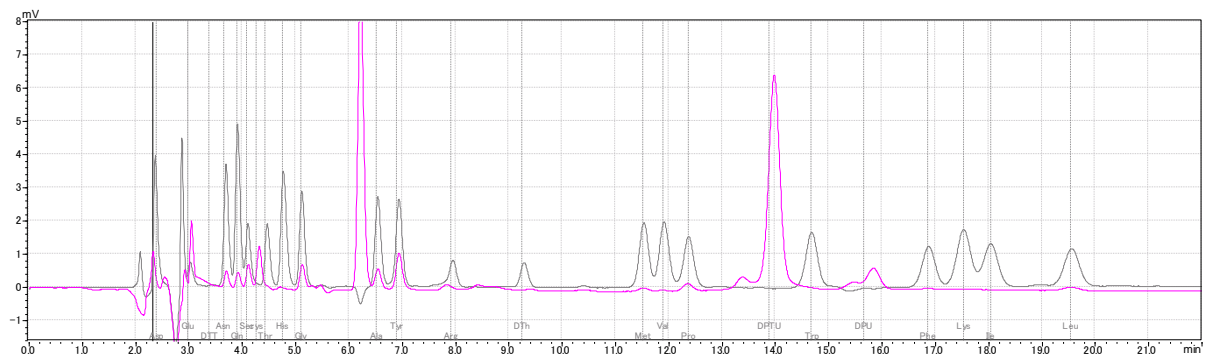
Ciclo23



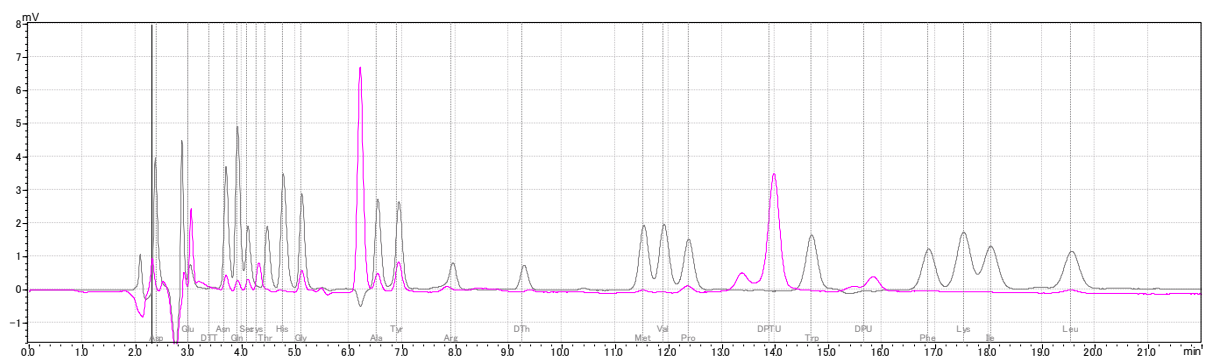
Ciclo24



Ciclo25



Ciclo26



Ciclo27

ANEXO F: Resultados Preliminares de Citotoxicidad

En estos resultados, se obtuvieron a partir de la evaluación citotóxica del veneno total de *T. macrochirus*, observando que a las 24 horas que el porcentaje de viabilidad disminuyó en todas las líneas celulares evaluadas. De las cuales donde se obtuvo mayor efecto fue sobre la línea PC3, en la cual al usar 50 $\mu\text{g/mL}$ de veneno total, se disminuyó su viabilidad al 28% con respecto al control. En cuanto a HT-29, la viabilidad obtenida a 50 $\mu\text{g/mL}$ de veneno fue cercana al 50%. Mientras que, en las demás líneas celulares, con este valor de concentración no logró disminuir la viabilidad en un valor menor del 50%. Casos resaltando la línea celular A549, donde el porcentaje de viabilidad fue cercano al 62%, seguido de MDA-MB231 y SiHa, que con esta misma concentración de veneno generaron una viabilidad de 73 % y 89 % respectivamente (figura F1).

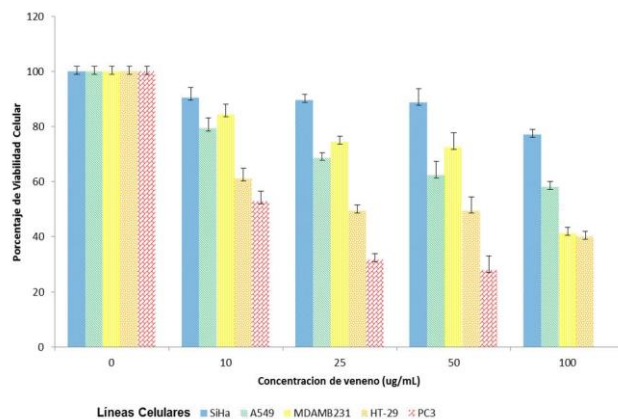


Figura F1. Identificación de la actividad citotóxica del veneno total de *T. macrochirus*, en diferentes líneas celulares. Se observa la disminución del porcentaje de viabilidad de las cinco líneas celulares analizadas SiHa, A549, MDA-MB231 HT-29, PC3. El porcentaje de viabilidad se observa que es menor en las líneas

celulares PC3, HT-29 y MDA-MB231, en un 50% de acuerdo a las concentraciones empleadas.

Este efecto se evaluó también tanto en líneas celulares derivadas de tumor, como en una línea celular de proveniente de fibroblastos sano (MRC-5). Observando que la viabilidad de MRC-5 se mantuvo por encima del 85% con respecto a las concentraciones usadas de veneno total de *T. macrochirus*, indicando que el veneno podría generar efecto sobre células provenientes de tumor y no sobre células normales (figura F2, tabla F1). De acuerdo al análisis estadístico realizado (tabla F2), se presentó una diferencia estadísticamente significativa en todas las concentraciones usadas del veneno sobre líneas celulares PC3 y HT29, lo que indica que desde la menor concentración utilizada del veneno (10 µg/mL) se afecta la viabilidad celular de estas líneas celulares. Mientras que en las líneas de MDA-MB31 y A549, la concentración más baja no presenta efecto significativo sobre la viabilidad celular, pero al usar 25 µg/mL y concentraciones más altas, se encuentran diferencias significativas que indican efecto citotóxico generado por el veneno en cada una de estas líneas. Un efecto menor se observó sobre la línea SiHa donde solamente la concentración más alta (100 µg/mL) mostró efecto significativo sobre la viabilidad celular (figura F2).

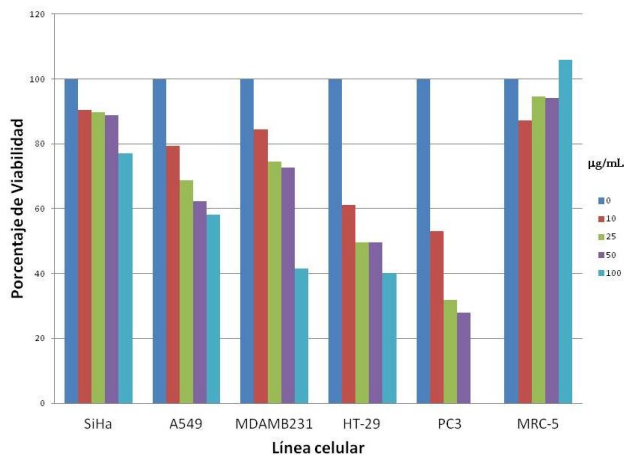


Figura F2. Identificación de la actividad citotóxica del veneno total *T. macrochirus*, en diferentes líneas celulares. De acuerdo a la concentración de veneno empleada se observa la disminución del porcentaje de viabilidad de las seis líneas celulares analizadas SiHa, A549, MDA-MB231, HT-29, PC3 y MRC-5. El porcentaje de viabilidad de las líneas celulares PC3, MDA-MB231y HT-29, se disminuye hasta menos del 50%, mientras que la línea MRC-5, disminuye solo hasta un 85%.

Tabla F1. Determinación de la significancia estadística de los resultados de citotoxicidad del veneno de *T. macrochirus*. El análisis de varianza de un factor, estableciendo que valores $p < 0,01$. Determinan el porcentaje de viabilidad generado por el veneno sobre la línea celular ensayadas. ND: No Determinado.

LINEA CELULAR	Concentración del veneno (µg/mL)				
	0	10	25	50	100
MRC-5	0,219	0,297	0,398	0,471	0,294
SiHa	0,201	0,058	0,061	0,018	<0,01
MDA-	0,209	0,071	<0,01	<0,01	<0,01

MB231					
A549	0,178	0,011	<0,01	<0,01	<0,01
PC3	0,211	<0,01	<0,01	<0,01	ND
HT29	0,196	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

El ensayo citotóxico también se realizó con la fracción de péptido parcialmente (VTnP), en la línea celular proveniente de tumor de cérvix HeLa, como resultado se obtuvo que a 56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la fracción VTnP la viabilidad celular fue del 60%; en este último caso la disminución de viabilidad tuvo una variación lineal respecto a la concentración de fracción VTnP utilizada (figura F3).

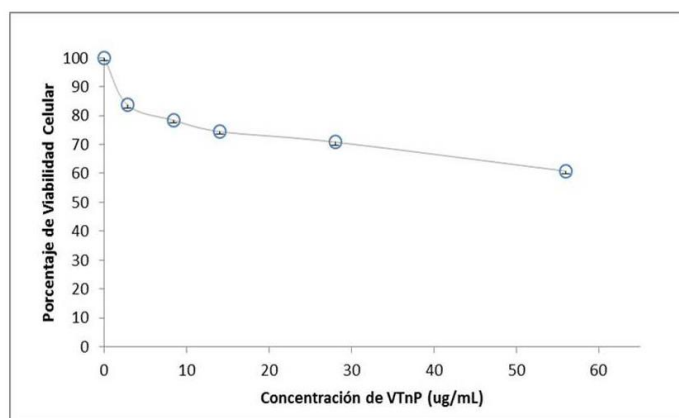


Figura F3. Identificación de la actividad citotóxica de la fracción de péptidos parcialmente purificado del veneno de escorpión *Tityus macrochirus* (VTnP), en la línea celular HeLa. El porcentaje de viabilidad en la línea celular de HeLa, disminuye con respecto a la concentración de la fracción, con una disminución del 60% en una concentración de VTnP 56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,01$).

Anexo G. Análisis estadístico del efecto citotóxico del veneno total de *T. macrochirus* y de las fracciones de péptidos purificadas.

Se evaluaron 15 fracciones de péptidos purificados y el veneno total de *T. macrochirus*, en las líneas celulares de PC3, HT-29, HBT-26, HeLa y neurona. En cada una para el análisis estadístico se seleccionaron la que presentaron un valor de desviación estándar menor de 2 Tabla G1.

Tabla G1. Fracciones de péptidos purificadas del veneno de *T. macrochirus*, seleccionadas para el análisis estadístico y resultados finales.

Línea	Fracción	IC50	datos AI		PROMEDIO	DS
HT-29	32	19,2699	19,7170	20,0639	19,6836	0,39805235
HT-29	33	10,7128	11,1942	10,4944	10,8005	0,35804203
HT-29	35	24,2419	24,1943	23,0960	23,8441	0,64828176
HT-29	36	27,9114	27,6345	26,8005	27,4488	0,57826298
HT-29	37	7,6625	7,3762	7,4721	7,5036	0,14572615
HT-29	38	15,5512	15,4825	16,2131	15,7489	0,40344509
HT-29	42	8,4173	8,1390	8,7684	8,4416	0,31540092
HT-29	44	15,24690	14,6152	15,3160	15,0594	0,38620813
HT-29	46	17,7833	16,9857	17,8643	17,5444	0,48556921
HT-29	48	14,871	14,2106	15,5905	14,8907	0,6901609
HT-29	51-9	18,008	17,3271	18,2726	17,8692	0,48778551
HT-29	51	21,3864	22,4529	22,3511	22,0635	0,58856203

HT-29	52	17,9864	18,6911	17,5429	18,0735	0,57903045
HT-29	53	23,2117	23,8048	24,1511	23,7225	0,47507257
HT-29	Veneno	10,914	10,7879	11,2148	10,9722	0,2193268
HeLa	32	9,4443	9,6752	9,5867	9,5687	0,11649379
HeLa	33	18,5311	18,0521	18,9632	18,5155	0,45575114
HeLa	34	27,69190	28,3761	26,3957	27,4879	1,00583698
HeLa	35	9,9783	10,3476	9,9534	10,0931	0,22075482
HeLa	36	9,0341	8,6132	9,1397	8,9290	0,27854097
HeLa	37	9,8859	9,4350	9,9917	9,7709	0,29564036
HeLa	38	9,2157	8,8088	8,9506	8,9917	0,20654009
HeLa	42	10,0014	10,2653	9,7238	9,9968	0,27077888
HeLa	44	8,9307	9,3290	9,0289	9,0962	0,20750347
HeLa	46	30,1954	28,8749	31,6344	30,2349	1,38017399
HeLa	48	14,1041	14,7426	14,7806	14,5424	0,380083
HeLa	51-9	15,9841	16,7541	15,9983	16,2455	0,44051774
HeLa	51	19,8003	20,7544	19,7316	20,0954	0,57171472
HeLa	52	15,475	15,4062	14,8324	15,2379	0,35282541
HeLa	53	16,9779	16,3216	17,5544	16,9513	0,61683031
HeLa	Veneno	9,0075	8,9029	8,7974	8,9026	0,10505032
HBT-26	32	17,6233	17,8424	17,4783	17,6480	0,1833024
HBT-26	35	19,8399	19,1275	18,9263	19,2979	0,48004516
HBT-26	36	20,9451	20,3214	20,1825	20,4830	0,4061719
HBT-26	37	31,6396	30,2314	30,1840	30,6850	0,8270475
HBT-26	38	42,4677	42,7961	42,0224	42,4287	0,3883191
HBT-26	42	15,1435	15,8686	15,5428	15,5183	0,36317033
HBT-26	46	32,4067	32,3724	33,0054	32,5948	0,35597453
HBT-26	51-9	26,717	26,0402	26,4716	26,4096	0,34263327
HBT-26	51	25,4062	24,8821	25,4220	25,2368	0,30725192
HBT-26	52	17,1891	17,2844	17,4435	17,3057	0,12852643
HBT-26	53	16,8904	16,3920	17,4366	16,9063	0,52248224
HBT-26	Veneno	19,2348	18,6695	20,0152	19,3065	0,6757091
PC-3	33	18,6738	18,9123	18,8734	18,8198	0,12795547

PC-3	34	32,87690	34,2322	34,1323	33,7471	0,75529765
PC-3	35	14,4301	14,3518	14,7018	14,4946	0,18368986
PC-3	36	15,5785	15,5946	16,3301	15,8344	0,42936426
PC-3	38	15,4739	16,0246	15,0033	15,5006	0,51117325
PC-3	42	15,7399	15,0284	16,4437	15,7373	0,70765349
PC-3	44	16,9405	17,5419	16,5995	17,0273	0,47715838
PC-3	46	43,6242	43,5504	44,9993	44,0580	0,81605327
PC-3	48	22,8733	22,5135	23,0461	22,8110	0,27171635
PC-3	51-9	18,6932	19,1915	18,7004	18,8617	0,28563787
PC-3	51	26,0172	25,3501	27,0100	26,1258	0,83525867
PC-3	52	28,3722	27,5267	28,4249	28,1079	0,50405204
PC-3	Veneno	46,4149	47,5262	44,8034	46,2482	1,36903614
Neurona	33	1,4729	1,4139	1,5257	1,4708	0,05592865
Neurona	34	12,86860	12,8859	13,2622	13,0056	0,22241925
Neurona	35	9,9516	10,2153	9,5396	9,9022	0,34055156
Neurona	36	5,7291	5,9035	5,5741	5,7356	0,16479519
Neurona	37	6,4233	6,3836	6,6945	6,5005	0,16920616
Neurona	38	6,679	6,4344	6,3945	6,5026	0,1540354
Neurona	42	5,2365	5,4853	5,4887	5,4035	0,14463623
Neurona	44	12,8218	13,0016	12,5443	12,7892	0,23038286
Neurona	46	10,5886	10,8837	10,1491	10,5405	0,36965782
Neurona	48	16,2446	16,8548	16,4289	16,5094	0,31297
Neurona	51-9	4,4665	4,2734	4,2727	4,3375	0,11168896
Neurona	51	9,5132	9,8515	9,6021	9,6556	0,17538076
Neurona	53	18,4647	19,2153	18,8652	18,8484	0,37558191
Neurona	Veneno	2,3211	2,2514	2,3702	2,3142	0,05969693

A continuación, se detalla el análisis estadístico realizado sobre el efecto citotóxico de las fracciones de péptidos y el veneno, en cada una de las líneas celulares

```

ONEWAY ic50ht29 ic50hela raizhbt26 raizneurona logpc3 BY fraccion
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/PLOT MEANS
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=TUKEY SCHEFFE ALPHA(0.05) .

```

Unidireccional

Notas

Salida creada		19-JUN-2017 22:40:29
Comentarios		
Entrada	Datos	C: \Users\cgarc_000\Documents\factorial datos clara.sav
	Conjunto de datos activo	Conjunto_de_datos1
	Filtro	<ninguno>
	Ponderación	<ninguno>
	Segmentar archivo	<ninguno>
	N de filas en el archivo de datos de trabajo	48
Manejo de valor perdido	Definición de ausencia	Los valores perdidos definidos por el usuario se tratan como perdidos.
	Casos utilizados	Los estadísticos para cada análisis se basan en casos sin datos perdidos para cualquier variable del análisis.
Sintaxis		ONEWAY ic50ht29 ic50hela raizhbt26 raizneurona logpc3 BY fraccion /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /PLOT MEANS /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=TUKEY SCHEFFE ALPHA(0.05).
Recursos	Tiempo de procesador	00:00:03,09
	Tiempo transcurrido	00:00:02,96

Descriptivos

		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de ...
						Límite inferior
HT-29	veneno	3	6,428680	,3214340	,1855800	5,630194
	FRACC30	3	10,925640	,5462820	,3153961	9,568600
	FRACC31	3	12,896450	,6448225	,3722884	11,294622
	FRACC32	3	9,144790	,4572395	,2639873	8,008944
	FRACC33	3	11,438270	,5719135	,3301944	10,017558
	FRACC37	3	9,489870	,4744935	,2739489	8,311163
	FRACC39	3	12,239960	,6119980	,3533372	10,719673
	FRACC41	3	12,186400	,6093200	,3517911	10,672765
	FRACC43	3	11,698400	,5849200	,3377037	10,245378
	FRACC44-9	3	18,008000	,9004000	,5198462	15,771282
	FRACC46	3	15,637900	,7818950	,4514273	13,695565
	FRACC47	3	17,986400	,8993200	,5192226	15,752365
	FRACC48	3	11,961600	,5980800	,3453016	10,475887
	FRACC27	3	12,580200	,6290100	,3631591	11,017653
	FRACC28	3	10,712800	,5356400	,3092519	9,382196
	FRACC29	3	6,517120	,3258560	,1881330	5,707649
	Total	48	11,865780	3,2835641	,4739417	10,912332
HeLa	veneno	3	10,505800	,5252900	,3032763	9,200907
	FRACC30	3	9,978300	,4989150	,2880487	8,738926
	FRACC31	3	9,034100	,4517050	,2607920	7,912003
	FRACC32	3	9,885900	,4942950	,2853814	8,658003
	FRACC33	3	9,215700	,4607850	,2660343	8,071047
	FRACC37	3	9,982800	,4991400	,2881786	8,742868
	FRACC39	3	9,569700	,4784850	,2762534	8,381077
	FRACC41	3	30,195400	1,5097700	,8716661	26,444923
	FRACC43	3	14,104100	,7052050	,4071503	12,352274
	FRACC44-9	3	17,751400	,8875700	,5124388	15,546554
	FRACC46	3	16,575800	,8287900	,4785021	14,516972
	FRACC47	3	15,475000	,7737500	,4467248	13,552898
	FRACC48	3	16,977900	,8488950	,4901098	14,869128
	FRACC27	3	9,444300	,4722150	,2726335	8,271253
	FRACC28	3	23,695500	1,1847750	,6840302	20,752356
	FRACC29	3	17,797800	,8898900	,5137782	15,587191
	Total	48	14,386844	5,9567530	,8597832	12,657183
raizhbt26	veneno	3	3,856954	,0964766	,0557008	3,617293
	FRACC30	3	4,453272	,1113927	,0643126	4,176557
	FRACC31	3	4,575627	,1144533	,0660797	4,291310

Descriptivos

		95% del intervalo de confianza ...		
		Límite superior	Mínimo	Máximo
HT-29	veneno	7,227166	6,1072	6,7501
	FRACC30	12,282680	10,3794	11,4719
	FRACC31	14,498278	12,2516	13,5413
	FRACC32	10,280636	8,6876	9,6020
	FRACC33	12,858982	10,8664	12,0102
	FRACC37	10,668577	9,0154	9,9644
	FRACC39	13,760247	11,6280	12,8520
	FRACC41	13,700035	11,5771	12,7957
	FRACC43	13,151422	11,1135	12,2833
	FRACC44-9	20,244718	17,1076	18,9084
	FRACC46	17,580235	14,8560	16,4198
	FRACC47	20,220435	17,0871	18,8857
	FRACC48	13,447313	11,3635	12,5597
	FRACC27	14,142747	11,9512	13,2092
	FRACC28	12,043404	10,1772	11,2484
	FRACC29	7,326591	6,1913	6,8430
		Total	12,819228	6,1072
HeLa	veneno	11,810693	9,9805	11,0311
	FRACC30	11,217674	9,4794	10,4772
	FRACC31	10,156197	8,5824	9,4858
	FRACC32	11,113797	9,3916	10,3802
	FRACC33	10,360353	8,7549	9,6765
	FRACC37	11,222732	9,4837	10,4819
	FRACC39	10,758323	9,0912	10,0482
	FRACC41	33,945877	28,6856	31,7052
	FRACC43	15,855926	13,3989	14,8093
	FRACC44-9	19,956246	16,8638	18,6390
	FRACC46	18,634628	15,7470	17,4046
	FRACC47	17,397102	14,7013	16,2488
	FRACC48	19,086672	16,1290	17,8268
	FRACC27	10,617347	8,9721	9,9165
	FRACC28	26,638644	22,5107	24,8803
	FRACC29	20,008409	16,9079	18,6877
		Total	16,116505	8,5824
raizhbt26	veneno	4,096615	3,7601	3,9530
	FRACC30	4,729987	4,3414	4,5642
	FRACC31	4,859945	4,4607	4,6896

Descriptivos

		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de ...
						Límite inferior
	FRACC32	3	5,623736	,1406704	,0812161	5,274292
	FRACC33	3	6,515366	,1629733	,0940927	6,110518
	FRACC37	3	3,890654	,0973196	,0561875	3,648898
	FRACC39	3	5,678446	,1420389	,0820062	5,325602
	FRACC41	3	5,901904	,1476284	,0852333	5,535175
	FRACC43	3	7,654911	,1914775	,1105496	7,179254
	FRACC44-9	3	5,167771	,1292650	,0746312	4,846659
	FRACC46	3	5,039405	,1260541	,0727774	4,726270
	FRACC47	3	4,145110	,1036845	,0598623	3,887543
	FRACC48	3	3,671250	,0918315	,0530189	3,443128
	FRACC27	3	4,197136	,1049859	,0606136	3,936337
	FRACC28	3	7,810176	,1953613	,1127919	7,324872
	FRACC29	3	14,939291	,3736868	,2157482	14,011001
	Total	48	5,820063	2,6903415	,3883173	5,038869
raizneurona	veneno	3	1,481683	,0370624	,0213980	1,389615
	FRACC30	3	4,750367	,1188242	,0686032	4,455191
	FRACC31	3	2,518463	,0629960	,0363708	2,361972
	FRACC32	3	8,407093	,2102924	,1214124	7,884698
	FRACC33	3	2,418772	,0605024	,0349311	2,268476
	FRACC37	3	2,166135	,0541830	,0312826	2,031537
	FRACC39	3	3,014765	,0754104	,0435382	2,827435
	FRACC41	3	3,487066	,0872244	,0503590	3,270388
	FRACC43	3	3,449353	,0862810	,0498144	3,235019
	FRACC44-9	3	6,255588	,1564753	,0903411	5,866881
	FRACC46	3	7,387377	,1847855	,1066860	6,928344
	FRACC47	3	21,960418	,5493110	,3171449	20,595853
	FRACC48	3	4,366778	,1092292	,0630635	4,095437
	FRACC27	3	21,568177	,5394997	,3114803	20,227986
	FRACC28	3	4,579896	,1145601	,0661413	4,295313
	FRACC29	3	4,281676	,1071005	,0618345	4,015624
	Total	48	6,380850	6,1579034	,8888168	4,592782
logpc3	veneno	3	1,249391	,0217351	,0125488	1,195398
	FRACC30	3	1,158907	,0217351	,0125488	1,104914
	FRACC31	3	1,192163	,0217351	,0125488	1,138170
	FRACC32	3	3,311527	,0217351	,0125488	3,257534
	FRACC33	3	1,189237	,0217351	,0125488	1,135244
	FRACC37	3	1,196640	,0217351	,0125488	1,142647

Descriptivos

		95% del intervalo de confianza ...		
		Límite superior	Mínimo	Máximo
	FRACC32	5,973181	5,4825	5,7638
	FRACC33	6,920214	6,3517	6,6777
	FRACC37	4,132409	3,7929	3,9876
	FRACC39	6,031290	5,5358	5,8199
	FRACC41	6,268633	5,7537	6,0489
	FRACC43	8,130567	7,4626	7,8456
	FRACC44-9	5,488883	5,0380	5,2965
	FRACC46	5,352541	4,9128	5,1649
	FRACC47	4,402676	4,0410	4,2484
	FRACC48	3,899372	3,5790	3,7627
	FRACC27	4,457935	4,0917	4,3017
	FRACC28	8,295481	7,6140	8,0047
	FRACC29	15,867580	14,5641	15,3114
	Total	6,601257	3,5790	15,3114
raizneurona	veneno	1,573751	1,4445	1,5186
	FRACC30	5,045543	4,6311	4,8687
	FRACC31	2,674954	2,4552	2,5812
	FRACC32	8,929489	8,1959	8,6165
	FRACC33	2,569069	2,3580	2,4790
	FRACC37	2,300734	2,1117	2,2201
	FRACC39	3,202095	2,9390	3,0899
	FRACC41	3,703743	3,3995	3,5739
	FRACC43	3,663687	3,3627	3,5353
	FRACC44-9	6,644294	6,0985	6,4114
	FRACC46	7,846410	7,2018	7,5714
	FRACC47	23,324982	21,4088	22,5074
	FRACC48	4,638118	4,2571	4,4755
	FRACC27	22,908368	21,0264	22,1054
	FRACC28	4,864479	4,4649	4,6940
	FRACC29	4,547729	4,1741	4,3883
	Total	8,168919	1,4445	22,5074
logpc3	veneno	1,303384	1,2275	1,2709
	FRACC30	1,212900	1,1370	1,1805
	FRACC31	1,246156	1,1702	1,2137
	FRACC32	3,365520	3,2896	3,3331
	FRACC33	1,243230	1,1673	1,2108
	FRACC37	1,250633	1,1747	1,2182

Descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de ...
					Límite inferior
FRACC39	3	1,228564	,0217351	,0125488	1,174571
FRACC41	3	1,639365	,0217351	,0125488	1,585372
FRACC43	3	1,292407	,0217351	,0125488	1,238414
FRACC44-9	3	1,180176	,0217351	,0125488	1,126183
FRACC46	3	1,414898	,0217351	,0125488	1,360905
FRACC47	3	1,353488	,0217351	,0125488	1,299495
FRACC48	3	1,904746	,0217351	,0125488	1,850753
FRACC27	3	2,507829	,0217351	,0125488	2,453836
FRACC28	3	1,173334	,0217351	,0125488	1,119341
FRACC29	3	1,516528	,0217351	,0125488	1,462535
Total	48	1,531825	,5809030	,0838461	1,363148

Descriptivos

	95% del intervalo de confianza ...	Mínimo	Máximo
	Límite superior		
FRACC39	1,282557	1,2066	1,2501
FRACC41	1,693358	1,6175	1,6609
FRACC43	1,346400	1,2705	1,3140
FRACC44-9	1,234169	1,1583	1,2017
FRACC46	1,468891	1,3930	1,4364
FRACC47	1,407482	1,3316	1,3750
FRACC48	1,958739	1,8828	1,9263
FRACC27	2,561822	2,4859	2,5294
FRACC28	1,227327	1,1514	1,1949
FRACC29	1,570522	1,4946	1,5381
Total	1,700502	1,1370	3,3331

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
HT-29	,291	15	32	,993
HeLa	,607	15	32	,847
raizhbt26	,755	15	32	,713
raizneurona	2,086	15	32	,040
logpc3	,000	15	32	1,000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
HT-29	Entre grupos	494,656	15	32,977	87,297	,000
	Dentro de grupos	12,088	32	,378		
	Total	506,744	47			
HeLa	Entre grupos	1648,391	15	109,893	182,151	,000
	Dentro de grupos	19,306	32	,603		
	Total	1667,697	47			
raizhbt26	Entre grupos	339,363	15	22,624	883,154	,000
	Dentro de grupos	,820	32	,026		
	Total	340,183	47			
raizneurona	Entre grupos	1780,671	15	118,711	2438,301	,000
	Dentro de grupos	1,558	32	,049		
	Total	1782,229	47			
logpc3	Entre grupos	15,845	15	1,056	2236,021	,000
	Dentro de grupos	,015	32	,000		
	Total	15,860	47			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.			
HT-29	HSD Tukey	veneno	FRACC30	-4,4969600 *	,5018334	,000		
			FRACC31	-6,4677700 *	,5018334	,000		
			FRACC32	-2,7161100 *	,5018334	,001		
			FRACC33	-5,0095900 *	,5018334	,000		
			FRACC37	-3,0611900 *	,5018334	,000		
			FRACC39	-5,8112800 *	,5018334	,000		
			FRACC41	-5,7577200 *	,5018334	,000		
			FRACC43	-5,2697200 *	,5018334	,000		
			FRACC44-9	-11,5793200 *	,5018334	,000		
			FRACC46	-9,2092200 *	,5018334	,000		
			FRACC47	-11,5577200 *	,5018334	,000		
			FRACC48	-5,5329200 *	,5018334	,000		
			FRACC27	-6,1515200 *	,5018334	,000		
			FRACC28	-4,2841200 *	,5018334	,000		
			FRACC29	-,0884400	,5018334	1,000		
				FRACC30	veneno	4,4969600 *	,5018334	,000
					FRACC31	-1,9708100 *	,5018334	,029

Comparaciones múltiples

				95% de intervalo de confianza				
Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion		Límite inferior	Límite superior			
HT-29	HSD Tukey	veneno	FRACC30	-6,357801	-2,636119			
			FRACC31	-8,328611	-4,606929			
			FRACC32	-4,576951	-,855269			
			FRACC33	-6,870431	-3,148749			
			FRACC37	-4,922031	-1,200349			
			FRACC39	-7,672121	-3,950439			
			FRACC41	-7,618561	-3,896879			
			FRACC43	-7,130561	-3,408879			
			FRACC44-9	-13,440161	-9,718479			
			FRACC46	-11,070061	-7,348379			
			FRACC47	-13,418561	-9,696879			
			FRACC48	-7,393761	-3,672079			
			FRACC27	-8,012361	-4,290679			
			FRACC28	-6,144961	-2,423279			
			FRACC29	-1,949281	1,772401			
				FRACC30	veneno		2,636119	6,357801
					FRACC31		-3,831651	-,109969

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC32	1,7808500	,5018334	,072
		FRACC33	-,5126300	,5018334	,999
		FRACC37	1,4357700	,5018334	,287
		FRACC39	-1,3143200	,5018334	,421
		FRACC41	-1,2607600	,5018334	,487
		FRACC43	-,7727600	,5018334	,968
		FRACC44-9	-7,0823600*	,5018334	,000
		FRACC46	-4,7122600*	,5018334	,000
		FRACC47	-7,0607600*	,5018334	,000
		FRACC48	-1,0359600	,5018334	,773
		FRACC27	-1,6545600	,5018334	,125
		FRACC28	,2128400	,5018334	1,000
		FRACC29	4,4085200*	,5018334	,000
	FRACC31	veneno	6,4677700*	,5018334	,000
		FRACC30	1,9708100*	,5018334	,029
		FRACC32	3,7516600*	,5018334	,000
		FRACC33	1,4581800	,5018334	,266
		FRACC37	3,4065800*	,5018334	,000
		FRACC39	,6564900	,5018334	,993
		FRACC41	,7100500	,5018334	,985
		FRACC43	1,1980500	,5018334	,569
		FRACC44-9	-5,1115500*	,5018334	,000
		FRACC46	-2,7414500*	,5018334	,000
		FRACC47	-5,0899500*	,5018334	,000
		FRACC48	,9348500	,5018334	,874
		FRACC27	,3162500	,5018334	1,000
		FRACC28	2,1836500*	,5018334	,010
		FRACC29	6,3793300*	,5018334	,000
	FRACC32	veneno	2,7161100*	,5018334	,001
		FRACC30	-1,7808500	,5018334	,072
		FRACC31	-3,7516600*	,5018334	,000
		FRACC33	-2,2934800*	,5018334	,006
		FRACC37	-,3450800	,5018334	1,000
		FRACC39	-3,0951700*	,5018334	,000
		FRACC41	-3,0416100*	,5018334	,000
		FRACC43	-2,5536100*	,5018334	,001
		FRACC44-9	-8,8632100*	,5018334	,000
		FRACC46	-6,4931100*	,5018334	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC32	-,079991	3,641691
		FRACC33	-2,373471	1,348211
		FRACC37	-,425071	3,296611
		FRACC39	-3,175161	,546521
		FRACC41	-3,121601	,600081
		FRACC43	-2,633601	1,088081
		FRACC44-9	-8,943201	-5,221519
		FRACC46	-6,573101	-2,851419
		FRACC47	-8,921601	-5,199919
		FRACC48	-2,896801	,824881
		FRACC27	-3,515401	,206281
		FRACC28	-1,648001	2,073681
		FRACC29	2,547679	6,269361
	FRACC31	veneno	4,606929	8,328611
		FRACC30	,109969	3,831651
		FRACC32	1,890819	5,612501
		FRACC33	-,402661	3,319021
		FRACC37	1,545739	5,267421
		FRACC39	-1,204351	2,517331
		FRACC41	-1,150791	2,570891
		FRACC43	-,662791	3,058891
		FRACC44-9	-6,972391	-3,250709
		FRACC46	-4,602291	-,880609
		FRACC47	-6,950791	-3,229109
		FRACC48	-,925991	2,795691
		FRACC27	-1,544591	2,177091
		FRACC28	,322809	4,044491
		FRACC29	4,518489	8,240171
	FRACC32	veneno	,855269	4,576951
		FRACC30	-3,641691	,079991
		FRACC31	-5,612501	-1,890819
		FRACC33	-4,154321	-,432639
		FRACC37	-2,205921	1,515761
		FRACC39	-4,956011	-1,234329
		FRACC41	-4,902451	-1,180769
		FRACC43	-4,414451	-,692769
		FRACC44-9	-10,724051	-7,002369
		FRACC46	-8,353951	-4,632269

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC47	-8,8416100*	,5018334	,000
		FRACC48	-2,8168100*	,5018334	,000
		FRACC27	-3,4354100*	,5018334	,000
		FRACC28	-1,5680100	,5018334	,177
		FRACC29	2,6276700*	,5018334	,001
	FRACC33	veneno	5,0095900*	,5018334	,000
		FRACC30	,5126300	,5018334	,999
		FRACC31	-1,4581800	,5018334	,266
		FRACC32	2,2934800*	,5018334	,006
		FRACC37	1,9484000*	,5018334	,033
		FRACC39	-,8016900	,5018334	,957
		FRACC41	-,7481300	,5018334	,976
		FRACC43	-,2601300	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-6,5697300*	,5018334	,000
		FRACC46	-4,1996300*	,5018334	,000
		FRACC47	-6,5481300*	,5018334	,000
		FRACC48	-,5233300	,5018334	,999
		FRACC27	-1,1419300	,5018334	,642
		FRACC28	,7254700	,5018334	,981
		FRACC29	4,9211500*	,5018334	,000
	FRACC37	veneno	3,0611900*	,5018334	,000
		FRACC30	-1,4357700	,5018334	,287
		FRACC31	-3,4065800*	,5018334	,000
		FRACC32	,3450800	,5018334	1,000
		FRACC33	-1,9484000*	,5018334	,033
		FRACC39	-2,7500900*	,5018334	,000
		FRACC41	-2,6965300*	,5018334	,001
		FRACC43	-2,2085300*	,5018334	,009
		FRACC44-9	-8,5181300*	,5018334	,000
		FRACC46	-6,1480300*	,5018334	,000
		FRACC47	-8,4965300*	,5018334	,000
		FRACC48	-2,4717300*	,5018334	,002
		FRACC27	-3,0903300*	,5018334	,000
		FRACC28	-1,2229300	,5018334	,536
		FRACC29	2,9727500*	,5018334	,000
	FRACC39	veneno	5,8112800*	,5018334	,000
		FRACC30	1,3143200	,5018334	,421
		FRACC31	-,6564900	,5018334	,993

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC47	-10,702451	-6,980769
		FRACC48	-4,677651	-,955969
		FRACC27	-5,296251	-1,574569
		FRACC28	-3,428851	,292831
		FRACC29	,766829	4,488511
	FRACC33	veneno	3,148749	6,870431
		FRACC30	-1,348211	2,373471
		FRACC31	-3,319021	,402661
		FRACC32	,432639	4,154321
		FRACC37	,087559	3,809241
		FRACC39	-2,662531	1,059151
		FRACC41	-2,608971	1,112711
		FRACC43	-2,120971	1,600711
		FRACC44-9	-8,430571	-4,708889
		FRACC46	-6,060471	-2,338789
		FRACC47	-8,408971	-4,687289
		FRACC48	-2,384171	1,337511
		FRACC27	-3,002771	,718911
		FRACC28	-1,135371	2,586311
		FRACC29	3,060309	6,781991
	FRACC37	veneno	1,200349	4,922031
		FRACC30	-3,296611	,425071
		FRACC31	-5,267421	-1,545739
		FRACC32	-1,515761	2,205921
		FRACC33	-3,809241	-,087559
		FRACC39	-4,610931	-,889249
		FRACC41	-4,557371	-,835689
		FRACC43	-4,069371	-,347689
		FRACC44-9	-10,378971	-6,657289
		FRACC46	-8,008871	-4,287189
		FRACC47	-10,357371	-6,635689
		FRACC48	-4,332571	-,610889
		FRACC27	-4,951171	-1,229489
		FRACC28	-3,083771	,637911
		FRACC29	1,111909	4,833591
	FRACC39	veneno	3,950439	7,672121
		FRACC30	-,546521	3,175161
		FRACC31	-2,517331	1,204351

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC32	3,0951700*	,5018334	,000
		FRACC33	,8016900	,5018334	,957
		FRACC37	2,7500900*	,5018334	,000
		FRACC41	,0535600	,5018334	1,000
		FRACC43	,5415600	,5018334	,999
		FRACC44-9	-5,7680400*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,3979400*	,5018334	,000
		FRACC47	-5,7464400*	,5018334	,000
		FRACC48	,2783600	,5018334	1,000
		FRACC27	-,3402400	,5018334	1,000
		FRACC28	1,5271600	,5018334	,207
		FRACC29	5,7228400*	,5018334	,000
	FRACC41	veneno	5,7577200*	,5018334	,000
		FRACC30	1,2607600	,5018334	,487
		FRACC31	-,7100500	,5018334	,985
		FRACC32	3,0416100*	,5018334	,000
		FRACC33	,7481300	,5018334	,976
		FRACC37	2,6965300*	,5018334	,001
		FRACC39	-,0535600	,5018334	1,000
		FRACC43	,4880000	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-5,8216000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,4515000*	,5018334	,000
		FRACC47	-5,8000000*	,5018334	,000
		FRACC48	,2248000	,5018334	1,000
		FRACC27	-,3938000	,5018334	1,000
		FRACC28	1,4736000	,5018334	,252
		FRACC29	5,6692800*	,5018334	,000
	FRACC43	veneno	5,2697200*	,5018334	,000
		FRACC30	,7727600	,5018334	,968
		FRACC31	-1,1980500	,5018334	,569
		FRACC32	2,5536100*	,5018334	,001
		FRACC33	,2601300	,5018334	1,000
		FRACC37	2,2085300*	,5018334	,009
		FRACC39	-,5415600	,5018334	,999
		FRACC41	-,4880000	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-6,3096000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,9395000*	,5018334	,000
		FRACC47	-6,2880000*	,5018334	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC32	1,234329	4,956011
		FRACC33	-1,059151	2,662531
		FRACC37	,889249	4,610931
		FRACC41	-1,807281	1,914401
		FRACC43	-1,319281	2,402401
		FRACC44-9	-7,628881	-3,907199
		FRACC46	-5,258781	-1,537099
		FRACC47	-7,607281	-3,885599
		FRACC48	-1,582481	2,139201
		FRACC27	-2,201081	1,520601
		FRACC28	-,333681	3,388001
		FRACC29	3,861999	7,583681
	FRACC41	veneno	3,896879	7,618561
		FRACC30	-,600081	3,121601
		FRACC31	-2,570891	1,150791
		FRACC32	1,180769	4,902451
		FRACC33	-1,112711	2,608971
		FRACC37	,835689	4,557371
		FRACC39	-1,914401	1,807281
		FRACC43	-1,372841	2,348841
		FRACC44-9	-7,682441	-3,960759
		FRACC46	-5,312341	-1,590659
		FRACC47	-7,660841	-3,939159
		FRACC48	-1,636041	2,085641
		FRACC27	-2,254641	1,467041
		FRACC28	-,387241	3,334441
		FRACC29	3,808439	7,530121
	FRACC43	veneno	3,408879	7,130561
		FRACC30	-1,088081	2,633601
		FRACC31	-3,058891	,662791
		FRACC32	,692769	4,414451
		FRACC33	-1,600711	2,120971
		FRACC37	,347689	4,069371
		FRACC39	-2,402401	1,319281
		FRACC41	-2,348841	1,372841
		FRACC44-9	-8,170441	-4,448759
		FRACC46	-5,800341	-2,078659
		FRACC47	-8,148841	-4,427159

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC48	-,2632000	,5018334	1,000
		FRACC27	-,8818000	,5018334	,914
		FRACC28	,9856000	,5018334	,827
		FRACC29	5,1812800 *	,5018334	,000
	FRACC44-9	veneno	11,5793200 *	,5018334	,000
		FRACC30	7,0823600 *	,5018334	,000
		FRACC31	5,1115500 *	,5018334	,000
		FRACC32	8,8632100 *	,5018334	,000
		FRACC33	6,5697300 *	,5018334	,000
		FRACC37	8,5181300 *	,5018334	,000
		FRACC39	5,7680400 *	,5018334	,000
		FRACC41	5,8216000 *	,5018334	,000
		FRACC43	6,3096000 *	,5018334	,000
		FRACC46	2,3701000 *	,5018334	,004
		FRACC47	,0216000	,5018334	1,000
		FRACC48	6,0464000 *	,5018334	,000
		FRACC27	5,4278000 *	,5018334	,000
		FRACC28	7,2952000 *	,5018334	,000
		FRACC29	11,4908800 *	,5018334	,000
	FRACC46	veneno	9,2092200 *	,5018334	,000
		FRACC30	4,7122600 *	,5018334	,000
		FRACC31	2,7414500 *	,5018334	,000
		FRACC32	6,4931100 *	,5018334	,000
		FRACC33	4,1996300 *	,5018334	,000
		FRACC37	6,1480300 *	,5018334	,000
		FRACC39	3,3979400 *	,5018334	,000
		FRACC41	3,4515000 *	,5018334	,000
		FRACC43	3,9395000 *	,5018334	,000
		FRACC44-9	-2,3701000 *	,5018334	,004
		FRACC47	-2,3485000 *	,5018334	,004
		FRACC48	3,6763000 *	,5018334	,000
		FRACC27	3,0577000 *	,5018334	,000
		FRACC28	4,9251000 *	,5018334	,000
		FRACC29	9,1207800 *	,5018334	,000
	FRACC47	veneno	11,5577200 *	,5018334	,000
		FRACC30	7,0607600 *	,5018334	,000
		FRACC31	5,0899500 *	,5018334	,000
		FRACC32	8,8416100 *	,5018334	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC48	-2,124041	1,597641
		FRACC27	-2,742641	,979041
		FRACC28	-,875241	2,846441
		FRACC29	3,320439	7,042121
	FRACC44-9	veneno	9,718479	13,440161
		FRACC30	5,221519	8,943201
		FRACC31	3,250709	6,972391
		FRACC32	7,002369	10,724051
		FRACC33	4,708889	8,430571
		FRACC37	6,657289	10,378971
		FRACC39	3,907199	7,628881
		FRACC41	3,960759	7,682441
		FRACC43	4,448759	8,170441
		FRACC46	,509259	4,230941
		FRACC47	-1,839241	1,882441
		FRACC48	4,185559	7,907241
		FRACC27	3,566959	7,288641
		FRACC28	5,434359	9,156041
		FRACC29	9,630039	13,351721
	FRACC46	veneno	7,348379	11,070061
		FRACC30	2,851419	6,573101
		FRACC31	,880609	4,602291
		FRACC32	4,632269	8,353951
		FRACC33	2,338789	6,060471
		FRACC37	4,287189	8,008871
		FRACC39	1,537099	5,258781
		FRACC41	1,590659	5,312341
		FRACC43	2,078659	5,800341
		FRACC44-9	-4,230941	-,509259
		FRACC47	-4,209341	-,487659
		FRACC48	1,815459	5,537141
		FRACC27	1,196859	4,918541
		FRACC28	3,064259	6,785941
		FRACC29	7,259939	10,981621
	FRACC47	veneno	9,696879	13,418561
		FRACC30	5,199919	8,921601
		FRACC31	3,229109	6,950791
		FRACC32	6,980769	10,702451

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC33	6,5481300*	,5018334	,000
		FRACC37	8,4965300*	,5018334	,000
		FRACC39	5,7464400*	,5018334	,000
		FRACC41	5,8000000*	,5018334	,000
		FRACC43	6,2880000*	,5018334	,000
		FRACC44-9	-,0216000	,5018334	1,000
		FRACC46	2,3485000*	,5018334	,004
		FRACC48	6,0248000*	,5018334	,000
		FRACC27	5,4062000*	,5018334	,000
		FRACC28	7,2736000*	,5018334	,000
		FRACC29	11,4692800*	,5018334	,000
	FRACC48	veneno	5,5329200*	,5018334	,000
		FRACC30	1,0359600	,5018334	,773
		FRACC31	-,9348500	,5018334	,874
		FRACC32	2,8168100*	,5018334	,000
		FRACC33	,5233300	,5018334	,999
		FRACC37	2,4717300*	,5018334	,002
		FRACC39	-,2783600	,5018334	1,000
		FRACC41	-,2248000	,5018334	1,000
		FRACC43	,2632000	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-6,0464000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,6763000*	,5018334	,000
		FRACC47	-6,0248000*	,5018334	,000
		FRACC27	-,6186000	,5018334	,996
		FRACC28	1,2488000	,5018334	,503
		FRACC29	5,4444800*	,5018334	,000
	FRACC27	veneno	6,1515200*	,5018334	,000
		FRACC30	1,6545600	,5018334	,125
		FRACC31	-,3162500	,5018334	1,000
		FRACC32	3,4354100*	,5018334	,000
		FRACC33	1,1419300	,5018334	,642
		FRACC37	3,0903300*	,5018334	,000
		FRACC39	,3402400	,5018334	1,000
		FRACC41	,3938000	,5018334	1,000
		FRACC43	,8818000	,5018334	,914
		FRACC44-9	-5,4278000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,0577000*	,5018334	,000
		FRACC47	-5,4062000*	,5018334	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC33	4,687289	8,408971
		FRACC37	6,635689	10,357371
		FRACC39	3,885599	7,607281
		FRACC41	3,939159	7,660841
		FRACC43	4,427159	8,148841
		FRACC44-9	-1,882441	1,839241
		FRACC46	,487659	4,209341
		FRACC48	4,163959	7,885641
		FRACC27	3,545359	7,267041
		FRACC28	5,412759	9,134441
		FRACC29	9,608439	13,330121
	FRACC48	veneno	3,672079	7,393761
		FRACC30	-,824881	2,896801
		FRACC31	-2,795691	,925991
		FRACC32	,955969	4,677651
		FRACC33	-1,337511	2,384171
		FRACC37	,610889	4,332571
		FRACC39	-2,139201	1,582481
		FRACC41	-2,085641	1,636041
		FRACC43	-1,597641	2,124041
		FRACC44-9	-7,907241	-4,185559
		FRACC46	-5,537141	-1,815459
		FRACC47	-7,885641	-4,163959
		FRACC27	-2,479441	1,242241
		FRACC28	-,612041	3,109641
		FRACC29	3,583639	7,305321
	FRACC27	veneno	4,290679	8,012361
		FRACC30	-,206281	3,515401
		FRACC31	-2,177091	1,544591
		FRACC32	1,574569	5,296251
		FRACC33	-,718911	3,002771
		FRACC37	1,229489	4,951171
		FRACC39	-1,520601	2,201081
		FRACC41	-1,467041	2,254641
		FRACC43	-,979041	2,742641
		FRACC44-9	-7,288641	-3,566959
		FRACC46	-4,918541	-1,196859
		FRACC47	-7,267041	-3,545359

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC48	,6186000	,5018334	,996
		FRACC28	1,8674000*	,5018334	,048
		FRACC29	6,0630800*	,5018334	,000
	FRACC28	veneno	4,2841200*	,5018334	,000
		FRACC30	-,2128400	,5018334	1,000
		FRACC31	-2,1836500*	,5018334	,010
		FRACC32	1,5680100	,5018334	,177
		FRACC33	-,7254700	,5018334	,981
		FRACC37	1,2229300	,5018334	,536
		FRACC39	-1,5271600	,5018334	,207
		FRACC41	-1,4736000	,5018334	,252
		FRACC43	-,9856000	,5018334	,827
		FRACC44-9	-7,2952000*	,5018334	,000
		FRACC46	-4,9251000*	,5018334	,000
		FRACC47	-7,2736000*	,5018334	,000
		FRACC48	-1,2488000	,5018334	,503
		FRACC27	-1,8674000*	,5018334	,048
		FRACC29	4,1956800*	,5018334	,000
	FRACC29	veneno	,0884400	,5018334	1,000
		FRACC30	-4,4085200*	,5018334	,000
		FRACC31	-6,3793300*	,5018334	,000
		FRACC32	-2,6276700*	,5018334	,001
		FRACC33	-4,9211500*	,5018334	,000
		FRACC37	-2,9727500*	,5018334	,000
		FRACC39	-5,7228400*	,5018334	,000
		FRACC41	-5,6692800*	,5018334	,000
		FRACC43	-5,1812800*	,5018334	,000
		FRACC44-9	-11,4908800*	,5018334	,000
		FRACC46	-9,1207800*	,5018334	,000
		FRACC47	-11,4692800*	,5018334	,000
		FRACC48	-5,4444800*	,5018334	,000
		FRACC27	-6,0630800*	,5018334	,000
		FRACC28	-4,1956800*	,5018334	,000
Scheffe	veneno	FRACC30	-4,4969600*	,5018334	,000
		FRACC31	-6,4677700*	,5018334	,000
		FRACC32	-2,7161100	,5018334	,055
		FRACC33	-5,0095900*	,5018334	,000
		FRACC37	-3,0611900*	,5018334	,015

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC48	-1,242241	2,479441
		FRACC28	,006559	3,728241
		FRACC29	4,202239	7,923921
	FRACC28	veneno	2,423279	6,144961
		FRACC30	-2,073681	1,648001
		FRACC31	-4,044491	-,322809
		FRACC32	-,292831	3,428851
		FRACC33	-2,586311	1,135371
		FRACC37	-,637911	3,083771
		FRACC39	-3,388001	,333681
		FRACC41	-3,334441	,387241
		FRACC43	-2,846441	,875241
		FRACC44-9	-9,156041	-5,434359
		FRACC46	-6,785941	-3,064259
		FRACC47	-9,134441	-5,412759
		FRACC48	-3,109641	,612041
		FRACC27	-3,728241	-,006559
		FRACC29	2,334839	6,056521
	FRACC29	veneno	-1,772401	1,949281
		FRACC30	-6,269361	-2,547679
		FRACC31	-8,240171	-4,518489
		FRACC32	-4,488511	-,766829
		FRACC33	-6,781991	-3,060309
		FRACC37	-4,833591	-1,111909
		FRACC39	-7,583681	-3,861999
		FRACC41	-7,530121	-3,808439
		FRACC43	-7,042121	-3,320439
		FRACC44-9	-13,351721	-9,630039
		FRACC46	-10,981621	-7,259939
		FRACC47	-13,330121	-9,608439
		FRACC48	-7,305321	-3,583639
		FRACC27	-7,923921	-4,202239
		FRACC28	-6,056521	-2,334839
Scheffe	veneno	FRACC30	-7,240105	-1,753815
		FRACC31	-9,210915	-3,724625
		FRACC32	-5,459255	,027035
		FRACC33	-7,752735	-2,266445
		FRACC37	-5,804335	-,318045

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC39	-5,8112800*	,5018334	,000
		FRACC41	-5,7577200*	,5018334	,000
		FRACC43	-5,2697200*	,5018334	,000
		FRACC44-9	-11,5793200*	,5018334	,000
		FRACC46	-9,2092200*	,5018334	,000
		FRACC47	-11,5577200*	,5018334	,000
		FRACC48	-5,5329200*	,5018334	,000
		FRACC27	-6,1515200*	,5018334	,000
		FRACC28	-4,2841200*	,5018334	,000
		FRACC29	-,0884400	,5018334	1,000
	FRACC30	veneno	4,4969600*	,5018334	,000
		FRACC31	-1,9708100	,5018334	,454
		FRACC32	1,7808500	,5018334	,630
		FRACC33	-,5126300	,5018334	1,000
		FRACC37	1,4357700	,5018334	,893
		FRACC39	-1,3143200	,5018334	,945
		FRACC41	-1,2607600	,5018334	,961
		FRACC43	-,7727600	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-7,0823600*	,5018334	,000
		FRACC46	-4,7122600*	,5018334	,000
		FRACC47	-7,0607600*	,5018334	,000
		FRACC48	-1,0359600	,5018334	,994
		FRACC27	-1,6545600	,5018334	,742
		FRACC28	,2128400	,5018334	1,000
		FRACC29	4,4085200*	,5018334	,000
	FRACC31	veneno	6,4677700*	,5018334	,000
		FRACC30	1,9708100	,5018334	,454
		FRACC32	3,7516600*	,5018334	,001
		FRACC33	1,4581800	,5018334	,881
		FRACC37	3,4065800*	,5018334	,004
		FRACC39	,6564900	,5018334	1,000
		FRACC41	,7100500	,5018334	1,000
		FRACC43	1,1980500	,5018334	,975
		FRACC44-9	-5,1115500*	,5018334	,000
		FRACC46	-2,7414500	,5018334	,050
		FRACC47	-5,0899500*	,5018334	,000
		FRACC48	,9348500	,5018334	,998
		FRACC27	,3162500	,5018334	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC39	-8,554425	-3,068135
		FRACC41	-8,500865	-3,014575
		FRACC43	-8,012865	-2,526575
		FRACC44-9	-14,322465	-8,836175
		FRACC46	-11,952365	-6,466075
		FRACC47	-14,300865	-8,814575
		FRACC48	-8,276065	-2,789775
		FRACC27	-8,894665	-3,408375
		FRACC28	-7,027265	-1,540975
		FRACC29	-2,831585	2,654705
	FRACC30	veneno	1,753815	7,240105
		FRACC31	-4,713955	,772335
		FRACC32	-,962295	4,523995
		FRACC33	-3,255775	2,230515
		FRACC37	-1,307375	4,178915
		FRACC39	-4,057465	1,428825
		FRACC41	-4,003905	1,482385
		FRACC43	-3,515905	1,970385
		FRACC44-9	-9,825505	-4,339215
		FRACC46	-7,455405	-1,969115
		FRACC47	-9,803905	-4,317615
		FRACC48	-3,779105	1,707185
		FRACC27	-4,397705	1,088585
		FRACC28	-2,530305	2,955985
		FRACC29	1,665375	7,151665
	FRACC31	veneno	3,724625	9,210915
		FRACC30	-,772335	4,713955
		FRACC32	1,008515	6,494805
		FRACC33	-1,284965	4,201325
		FRACC37	,663435	6,149725
		FRACC39	-2,086655	3,399635
		FRACC41	-2,033095	3,453195
		FRACC43	-1,545095	3,941195
		FRACC44-9	-7,854695	-2,368405
		FRACC46	-5,484595	,001695
		FRACC47	-7,833095	-2,346805
		FRACC48	-1,808295	3,677995
		FRACC27	-2,426895	3,059395

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC28	2,1836500	,5018334	,281
		FRACC29	6,3793300*	,5018334	,000
	FRACC32	veneno	2,7161100	,5018334	,055
		FRACC30	-1,7808500	,5018334	,630
		FRACC31	-3,7516600*	,5018334	,001
		FRACC33	-2,2934800	,5018334	,210
		FRACC37	-,3450800	,5018334	1,000
		FRACC39	-3,0951700*	,5018334	,013
		FRACC41	-3,0416100*	,5018334	,016
		FRACC43	-2,5536100	,5018334	,096
		FRACC44-9	-8,8632100*	,5018334	,000
		FRACC46	-6,4931100*	,5018334	,000
		FRACC47	-8,8416100*	,5018334	,000
		FRACC48	-2,8168100*	,5018334	,038
		FRACC27	-3,4354100*	,5018334	,003
		FRACC28	-1,5680100	,5018334	,810
		FRACC29	2,6276700	,5018334	,075
	FRACC33	veneno	5,0095900*	,5018334	,000
		FRACC30	,5126300	,5018334	1,000
		FRACC31	-1,4581800	,5018334	,881
		FRACC32	2,2934800	,5018334	,210
		FRACC37	1,9484000	,5018334	,474
		FRACC39	-,8016900	,5018334	1,000
		FRACC41	-,7481300	,5018334	1,000
		FRACC43	-,2601300	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-6,5697300*	,5018334	,000
		FRACC46	-4,1996300*	,5018334	,000
		FRACC47	-6,5481300*	,5018334	,000
		FRACC48	-,5233300	,5018334	1,000
		FRACC27	-1,1419300	,5018334	,984
		FRACC28	,7254700	,5018334	1,000
		FRACC29	4,9211500*	,5018334	,000
	FRACC37	veneno	3,0611900*	,5018334	,015
		FRACC30	-1,4357700	,5018334	,893
		FRACC31	-3,4065800*	,5018334	,004
		FRACC32	,3450800	,5018334	1,000
		FRACC33	-1,9484000	,5018334	,474
		FRACC39	-2,7500900*	,5018334	,049

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC28	-,559495	4,926795
		FRACC29	3,636185	9,122475
	FRACC32	veneno	-,027035	5,459255
		FRACC30	-4,523995	,962295
		FRACC31	-6,494805	-1,008515
		FRACC33	-5,036625	,449665
		FRACC37	-3,088225	2,398065
		FRACC39	-5,838315	-,352025
		FRACC41	-5,784755	-,298465
		FRACC43	-5,296755	,189535
		FRACC44-9	-11,606355	-6,120065
		FRACC46	-9,236255	-3,749965
		FRACC47	-11,584755	-6,098465
		FRACC48	-5,559955	-,073665
		FRACC27	-6,178555	-,692265
		FRACC28	-4,311155	1,175135
		FRACC29	-,115475	5,370815
	FRACC33	veneno	2,266445	7,752735
		FRACC30	-2,230515	3,255775
		FRACC31	-4,201325	1,284965
		FRACC32	-,449665	5,036625
		FRACC37	-,794745	4,691545
		FRACC39	-3,544835	1,941455
		FRACC41	-3,491275	1,995015
		FRACC43	-3,003275	2,483015
		FRACC44-9	-9,312875	-3,826585
		FRACC46	-6,942775	-1,456485
		FRACC47	-9,291275	-3,804985
		FRACC48	-3,266475	2,219815
		FRACC27	-3,885075	1,601215
		FRACC28	-2,017675	3,468615
		FRACC29	2,178005	7,664295
	FRACC37	veneno	,318045	5,804335
		FRACC30	-4,178915	1,307375
		FRACC31	-6,149725	-,663435
		FRACC32	-2,398065	3,088225
		FRACC33	-4,691545	,794745
		FRACC39	-5,493235	-,006945

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC41	-2,6965300	,5018334	,059
		FRACC43	-2,2085300	,5018334	,263
		FRACC44-9	-8,5181300*	,5018334	,000
		FRACC46	-6,1480300*	,5018334	,000
		FRACC47	-8,4965300*	,5018334	,000
		FRACC48	-2,4717300	,5018334	,124
		FRACC27	-3,0903300*	,5018334	,014
		FRACC28	-1,2229300	,5018334	,970
		FRACC29	2,9727500*	,5018334	,021
	FRACC39	veneno	5,8112800*	,5018334	,000
		FRACC30	1,3143200	,5018334	,945
		FRACC31	-,6564900	,5018334	1,000
		FRACC32	3,0951700*	,5018334	,013
		FRACC33	,8016900	,5018334	1,000
		FRACC37	2,7500900*	,5018334	,049
		FRACC41	,0535600	,5018334	1,000
		FRACC43	,5415600	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-5,7680400*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,3979400*	,5018334	,004
		FRACC47	-5,7464400*	,5018334	,000
		FRACC48	,2783600	,5018334	1,000
		FRACC27	-,3402400	,5018334	1,000
		FRACC28	1,5271600	,5018334	,839
		FRACC29	5,7228400*	,5018334	,000
	FRACC41	veneno	5,7577200*	,5018334	,000
		FRACC30	1,2607600	,5018334	,961

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC41	-5,439675	,046615
		FRACC43	-4,951675	,534615
		FRACC44-9	-11,261275	-5,774985
		FRACC46	-8,891175	-3,404885
		FRACC47	-11,239675	-5,753385
		FRACC48	-5,214875	,271415
		FRACC27	-5,833475	-,347185
		FRACC28	-3,966075	1,520215
		FRACC29	,229605	5,715895
	FRACC39	veneno	3,068135	8,554425
		FRACC30	-1,428825	4,057465
		FRACC31	-3,399635	2,086655
		FRACC32	,352025	5,838315
		FRACC33	-1,941455	3,544835
		FRACC37	,006945	5,493235
		FRACC41	-2,689585	2,796705
		FRACC43	-2,201585	3,284705
		FRACC44-9	-8,511185	-3,024895
		FRACC46	-6,141085	-,654795
		FRACC47	-8,489585	-3,003295
		FRACC48	-2,464785	3,021505
		FRACC27	-3,083385	2,402905
		FRACC28	-1,215985	4,270305
		FRACC29	2,979695	8,465985
	FRACC41	veneno	3,014575	8,500865
		FRACC30	-1,482385	4,003905

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC31	-,7100500	,5018334	1,000
		FRACC32	3,0416100*	,5018334	,016
		FRACC33	,7481300	,5018334	1,000
		FRACC37	2,6965300	,5018334	,059
		FRACC39	-,0535600	,5018334	1,000
		FRACC43	,4880000	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-5,8216000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,4515000*	,5018334	,003
		FRACC47	-5,8000000*	,5018334	,000
		FRACC48	,2248000	,5018334	1,000
		FRACC27	-,3938000	,5018334	1,000
		FRACC28	1,4736000	,5018334	,872
		FRACC29	5,6692800*	,5018334	,000
	FRACC43	veneno	5,2697200*	,5018334	,000
		FRACC30	,7727600	,5018334	1,000
		FRACC31	-1,1980500	,5018334	,975
		FRACC32	2,5536100	,5018334	,096
		FRACC33	,2601300	,5018334	1,000
		FRACC37	2,2085300	,5018334	,263
		FRACC39	-,5415600	,5018334	1,000
		FRACC41	-,4880000	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-6,3096000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,9395000*	,5018334	,000
		FRACC47	-6,2880000*	,5018334	,000
		FRACC48	-,2632000	,5018334	1,000
		FRACC27	-,8818000	,5018334	,999
		FRACC28	,9856000	,5018334	,996
		FRACC29	5,1812800*	,5018334	,000
	FRACC44-9	veneno	11,5793200*	,5018334	,000
		FRACC30	7,0823600*	,5018334	,000
		FRACC31	5,1115500*	,5018334	,000
		FRACC32	8,8632100*	,5018334	,000
		FRACC33	6,5697300*	,5018334	,000
		FRACC37	8,5181300*	,5018334	,000
		FRACC39	5,7680400*	,5018334	,000
		FRACC41	5,8216000*	,5018334	,000
		FRACC43	6,3096000*	,5018334	,000
		FRACC46	2,3701000	,5018334	,169

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC31	-3,453195	2,033095
		FRACC32	,298465	5,784755
		FRACC33	-1,995015	3,491275
		FRACC37	-,046615	5,439675
		FRACC39	-2,796705	2,689585
		FRACC43	-2,255145	3,231145
		FRACC44-9	-8,564745	-3,078455
		FRACC46	-6,194645	-,708355
		FRACC47	-8,543145	-3,056855
		FRACC48	-2,518345	2,967945
		FRACC27	-3,136945	2,349345
		FRACC28	-1,269545	4,216745
		FRACC29	2,926135	8,412425
	FRACC43	veneno	2,526575	8,012865
		FRACC30	-1,970385	3,515905
		FRACC31	-3,941195	1,545095
		FRACC32	-,189535	5,296755
		FRACC33	-2,483015	3,003275
		FRACC37	-,534615	4,951675
		FRACC39	-3,284705	2,201585
		FRACC41	-3,231145	2,255145
		FRACC44-9	-9,052745	-3,566455
		FRACC46	-6,682645	-1,196355
		FRACC47	-9,031145	-3,544855
		FRACC48	-3,006345	2,479945
		FRACC27	-3,624945	1,861345
		FRACC28	-1,757545	3,728745
		FRACC29	2,438135	7,924425
	FRACC44-9	veneno	8,836175	14,322465
		FRACC30	4,339215	9,825505
		FRACC31	2,368405	7,854695
		FRACC32	6,120065	11,606355
		FRACC33	3,826585	9,312875
		FRACC37	5,774985	11,261275
		FRACC39	3,024895	8,511185
		FRACC41	3,078455	8,564745
		FRACC43	3,566455	9,052745
		FRACC46	-,373045	5,113245

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC47	,0216000	,5018334	1,000
		FRACC48	6,0464000*	,5018334	,000
		FRACC27	5,4278000*	,5018334	,000
		FRACC28	7,2952000*	,5018334	,000
		FRACC29	11,4908800*	,5018334	,000
	FRACC46	veneno	9,2092200*	,5018334	,000
		FRACC30	4,7122600*	,5018334	,000
		FRACC31	2,7414500	,5018334	,050
		FRACC32	6,4931100*	,5018334	,000
		FRACC33	4,1996300*	,5018334	,000
		FRACC37	6,1480300*	,5018334	,000
		FRACC39	3,3979400*	,5018334	,004
		FRACC41	3,4515000*	,5018334	,003
		FRACC43	3,9395000*	,5018334	,000
		FRACC44-9	-2,3701000	,5018334	,169
		FRACC47	-2,3485000	,5018334	,180
		FRACC48	3,6763000*	,5018334	,001
		FRACC27	3,0577000*	,5018334	,015
		FRACC28	4,9251000*	,5018334	,000
		FRACC29	9,1207800*	,5018334	,000
	FRACC47	veneno	11,5577200*	,5018334	,000
		FRACC30	7,0607600*	,5018334	,000
		FRACC31	5,0899500*	,5018334	,000
		FRACC32	8,8416100*	,5018334	,000
		FRACC33	6,5481300*	,5018334	,000
		FRACC37	8,4965300*	,5018334	,000
		FRACC39	5,7464400*	,5018334	,000
		FRACC41	5,8000000*	,5018334	,000
		FRACC43	6,2880000*	,5018334	,000
		FRACC44-9	-,0216000	,5018334	1,000
		FRACC46	2,3485000	,5018334	,180
		FRACC48	6,0248000*	,5018334	,000
		FRACC27	5,4062000*	,5018334	,000
		FRACC28	7,2736000*	,5018334	,000
		FRACC29	11,4692800*	,5018334	,000
	FRACC48	veneno	5,5329200*	,5018334	,000
		FRACC30	1,0359600	,5018334	,994
		FRACC31	-,9348500	,5018334	,998

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC47	-2,721545	2,764745
		FRACC48	3,303255	8,789545
		FRACC27	2,684655	8,170945
		FRACC28	4,552055	10,038345
		FRACC29	8,747735	14,234025
	FRACC46	veneno	6,466075	11,952365
		FRACC30	1,969115	7,455405
		FRACC31	-,001695	5,484595
		FRACC32	3,749965	9,236255
		FRACC33	1,456485	6,942775
		FRACC37	3,404885	8,891175
		FRACC39	,654795	6,141085
		FRACC41	,708355	6,194645
		FRACC43	1,196355	6,682645
		FRACC44-9	-5,113245	,373045
		FRACC47	-5,091645	,394645
		FRACC48	,933155	6,419445
		FRACC27	,314555	5,800845
		FRACC28	2,181955	7,668245
		FRACC29	6,377635	11,863925
	FRACC47	veneno	8,814575	14,300865
		FRACC30	4,317615	9,803905
		FRACC31	2,346805	7,833095
		FRACC32	6,098465	11,584755
		FRACC33	3,804985	9,291275
		FRACC37	5,753385	11,239675
		FRACC39	3,003295	8,489585
		FRACC41	3,056855	8,543145
		FRACC43	3,544855	9,031145
		FRACC44-9	-2,764745	2,721545
		FRACC46	-,394645	5,091645
		FRACC48	3,281655	8,767945
		FRACC27	2,663055	8,149345
		FRACC28	4,530455	10,016745
		FRACC29	8,726135	14,212425
	FRACC48	veneno	2,789775	8,276065
		FRACC30	-1,707185	3,779105
		FRACC31	-3,677995	1,808295

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC32	2,8168100*	,5018334	,038
		FRACC33	,5233300	,5018334	1,000
		FRACC37	2,4717300	,5018334	,124
		FRACC39	-,2783600	,5018334	1,000
		FRACC41	-,2248000	,5018334	1,000
		FRACC43	,2632000	,5018334	1,000
		FRACC44-9	-6,0464000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,6763000*	,5018334	,001
		FRACC47	-6,0248000*	,5018334	,000
		FRACC27	-,6186000	,5018334	1,000
		FRACC28	1,2488000	,5018334	,964
		FRACC29	5,4444800*	,5018334	,000
	FRACC27	veneno	6,1515200*	,5018334	,000
		FRACC30	1,6545600	,5018334	,742
		FRACC31	-,3162500	,5018334	1,000
		FRACC32	3,4354100*	,5018334	,003
		FRACC33	1,1419300	,5018334	,984
		FRACC37	3,0903300*	,5018334	,014
		FRACC39	,3402400	,5018334	1,000
		FRACC41	,3938000	,5018334	1,000
		FRACC43	,8818000	,5018334	,999
		FRACC44-9	-5,4278000*	,5018334	,000
		FRACC46	-3,0577000*	,5018334	,015
		FRACC47	-5,4062000*	,5018334	,000
		FRACC48	,6186000	,5018334	1,000
		FRACC28	1,8674000	,5018334	,549
		FRACC29	6,0630800*	,5018334	,000
	FRACC28	veneno	4,2841200*	,5018334	,000
		FRACC30	-,2128400	,5018334	1,000
		FRACC31	-2,1836500	,5018334	,281
		FRACC32	1,5680100	,5018334	,810
		FRACC33	-,7254700	,5018334	1,000
		FRACC37	1,2229300	,5018334	,970
		FRACC39	-1,5271600	,5018334	,839
		FRACC41	-1,4736000	,5018334	,872
		FRACC43	-,9856000	,5018334	,996
		FRACC44-9	-7,2952000*	,5018334	,000
		FRACC46	-4,9251000*	,5018334	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC32	,073665	5,559955
		FRACC33	-2,219815	3,266475
		FRACC37	-,271415	5,214875
		FRACC39	-3,021505	2,464785
		FRACC41	-2,967945	2,518345
		FRACC43	-2,479945	3,006345
		FRACC44-9	-8,789545	-3,303255
		FRACC46	-6,419445	-,933155
		FRACC47	-8,767945	-3,281655
		FRACC27	-3,361745	2,124545
		FRACC28	-1,494345	3,991945
		FRACC29	2,701335	8,187625
	FRACC27	veneno	3,408375	8,894665
		FRACC30	-1,088585	4,397705
		FRACC31	-3,059395	2,426895
		FRACC32	,692265	6,178555
		FRACC33	-1,601215	3,885075
		FRACC37	,347185	5,833475
		FRACC39	-2,402905	3,083385
		FRACC41	-2,349345	3,136945
		FRACC43	-1,861345	3,624945
		FRACC44-9	-8,170945	-2,684655
		FRACC46	-5,800845	-,314555
		FRACC47	-8,149345	-2,663055
		FRACC48	-2,124545	3,361745
		FRACC28	-,875745	4,610545
		FRACC29	3,319935	8,806225
	FRACC28	veneno	1,540975	7,027265
		FRACC30	-2,955985	2,530305
		FRACC31	-4,926795	,559495
		FRACC32	-1,175135	4,311155
		FRACC33	-3,468615	2,017675
		FRACC37	-1,520215	3,966075
		FRACC39	-4,270305	1,215985
		FRACC41	-4,216745	1,269545
		FRACC43	-3,728745	1,757545
		FRACC44-9	-10,038345	-4,552055
		FRACC46	-7,668245	-2,181955

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	
		FRACC47	-7,2736000*	,5018334	,000	
		FRACC48	-1,2488000	,5018334	,964	
		FRACC27	-1,8674000	,5018334	,549	
		FRACC29	4,1956800*	,5018334	,000	
	FRACC29	veneno	,0884400	,5018334	1,000	
		FRACC30	-4,4085200*	,5018334	,000	
		FRACC31	-6,3793300*	,5018334	,000	
		FRACC32	-2,6276700	,5018334	,075	
		FRACC33	-4,9211500*	,5018334	,000	
		FRACC37	-2,9727500*	,5018334	,021	
		FRACC39	-5,7228400*	,5018334	,000	
		FRACC41	-5,6692800*	,5018334	,000	
		FRACC43	-5,1812800*	,5018334	,000	
		FRACC44-9	-11,4908800*	,5018334	,000	
		FRACC46	-9,1207800*	,5018334	,000	
		FRACC47	-11,4692800*	,5018334	,000	
		FRACC48	-5,4444800*	,5018334	,000	
		FRACC27	-6,0630800*	,5018334	,000	
		FRACC28	-4,1956800*	,5018334	,000	
HeLa	HSD Tukey	veneno	FRACC30	,5275000	,6341960	1,000
			FRACC31	1,4717000	,6341960	,613
			FRACC32	,6199000	,6341960	1,000
			FRACC33	1,2901000	,6341960	,790
			FRACC37	,5230000	,6341960	1,000
			FRACC39	,9361000	,6341960	,978
			FRACC41	-19,6896000*	,6341960	,000
			FRACC43	-3,5983000*	,6341960	,000
			FRACC44-9	-7,2456000*	,6341960	,000
			FRACC46	-6,0700000*	,6341960	,000
			FRACC47	-4,9692000*	,6341960	,000
			FRACC48	-6,4721000*	,6341960	,000
			FRACC27	1,0615000	,6341960	,939
			FRACC28	-13,1897000*	,6341960	,000
			FRACC29	-7,2920000*	,6341960	,000
	FRACC30	veneno	-5,275000	,6341960	1,000	
		FRACC31	,9442000	,6341960	,976	
		FRACC32	,0924000	,6341960	1,000	
		FRACC33	,7626000	,6341960	,997	

Comparaciones múltiples

			95% de intervalo de confianza		
Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Límite inferior	Límite superior	
		FRACC47	-10,016745	-4,530455	
		FRACC48	-3,991945	1,494345	
		FRACC27	-4,610545	,875745	
		FRACC29	1,452535	6,938825	
	FRACC29	veneno	-2,654705	2,831585	
		FRACC30	-7,151665	-1,665375	
		FRACC31	-9,122475	-3,636185	
		FRACC32	-5,370815	,115475	
		FRACC33	-7,664295	-2,178005	
		FRACC37	-5,715895	-,229605	
		FRACC39	-8,465985	-2,979695	
		FRACC41	-8,412425	-2,926135	
		FRACC43	-7,924425	-2,438135	
		FRACC44-9	-14,234025	-8,747735	
		FRACC46	-11,863925	-6,377635	
		FRACC47	-14,212425	-8,726135	
		FRACC48	-8,187625	-2,701335	
		FRACC27	-8,806225	-3,319935	
		FRACC28	-6,938825	-1,452535	
HeLa	HSD Tukey	veneno	FRACC30	-1,824153	2,879153
			FRACC31	-,879953	3,823353
			FRACC32	-1,731753	2,971553
			FRACC33	-1,061553	3,641753
			FRACC37	-1,828653	2,874653
			FRACC39	-1,415553	3,287753
			FRACC41	-22,041253	-17,337947
			FRACC43	-5,949953	-1,246647
			FRACC44-9	-9,597253	-4,893947
			FRACC46	-8,421653	-3,718347
			FRACC47	-7,320853	-2,617547
			FRACC48	-8,823753	-4,120447
			FRACC27	-1,290153	3,413153
			FRACC28	-15,541353	-10,838047
			FRACC29	-9,643653	-4,940347
		FRACC30	veneno	-2,879153	1,824153
			FRACC31	-1,407453	3,295853
			FRACC32	-2,259253	2,444053
			FRACC33	-1,589053	3,114253

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC37	-,0045000	,6341960	1,000
		FRACC39	,4086000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,2171000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,1258000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-7,7731000*	,6341960	,000
		FRACC46	-6,5975000*	,6341960	,000
		FRACC47	-5,4967000*	,6341960	,000
		FRACC48	-6,9996000*	,6341960	,000
		FRACC27	,5340000	,6341960	1,000
		FRACC28	-13,7172000*	,6341960	,000
		FRACC29	-7,8195000*	,6341960	,000
	FRACC31	veneno	-1,4717000	,6341960	,613
		FRACC30	-,9442000	,6341960	,976
		FRACC32	-,8518000	,6341960	,990
		FRACC33	-,1816000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,9487000	,6341960	,975
		FRACC39	-,5356000	,6341960	1,000
		FRACC41	-21,1613000*	,6341960	,000
		FRACC43	-5,0700000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-8,7173000*	,6341960	,000
		FRACC46	-7,5417000*	,6341960	,000
		FRACC47	-6,4409000*	,6341960	,000
		FRACC48	-7,9438000*	,6341960	,000
		FRACC27	-,4102000	,6341960	1,000
		FRACC28	-14,6614000*	,6341960	,000
		FRACC29	-8,7637000*	,6341960	,000
	FRACC32	veneno	-,6199000	,6341960	1,000
		FRACC30	-,0924000	,6341960	1,000
		FRACC31	,8518000	,6341960	,990
		FRACC33	,6702000	,6341960	,999
		FRACC37	-,0969000	,6341960	1,000
		FRACC39	,3162000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,3095000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,2182000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-7,8655000*	,6341960	,000
		FRACC46	-6,6899000*	,6341960	,000
		FRACC47	-5,5891000*	,6341960	,000
		FRACC48	-7,0920000*	,6341960	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC37	-2,356153	2,347153
		FRACC39	-1,943053	2,760253
		FRACC41	-22,568753	-17,865447
		FRACC43	-6,477453	-1,774147
		FRACC44-9	-10,124753	-5,421447
		FRACC46	-8,949153	-4,245847
		FRACC47	-7,848353	-3,145047
		FRACC48	-9,351253	-4,647947
		FRACC27	-1,817653	2,885653
		FRACC28	-16,068853	-11,365547
		FRACC29	-10,171153	-5,467847
	FRACC31	veneno	-3,823353	,879953
		FRACC30	-3,295853	1,407453
		FRACC32	-3,203453	1,499853
		FRACC33	-2,533253	2,170053
		FRACC37	-3,300353	1,402953
		FRACC39	-2,887253	1,816053
		FRACC41	-23,512953	-18,809647
		FRACC43	-7,421653	-2,718347
		FRACC44-9	-11,068953	-6,365647
		FRACC46	-9,893353	-5,190047
		FRACC47	-8,792553	-4,089247
		FRACC48	-10,295453	-5,592147
		FRACC27	-2,761853	1,941453
		FRACC28	-17,013053	-12,309747
		FRACC29	-11,115353	-6,412047
	FRACC32	veneno	-2,971553	1,731753
		FRACC30	-2,444053	2,259253
		FRACC31	-1,499853	3,203453
		FRACC33	-1,681453	3,021853
		FRACC37	-2,448553	2,254753
		FRACC39	-2,035453	2,667853
		FRACC41	-22,661153	-17,957847
		FRACC43	-6,569853	-1,866547
		FRACC44-9	-10,217153	-5,513847
		FRACC46	-9,041553	-4,338247
		FRACC47	-7,940753	-3,237447
		FRACC48	-9,443653	-4,740347

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC27	,4416000	,6341960	1,000
		FRACC28	-13,8096000*	,6341960	,000
		FRACC29	-7,9119000*	,6341960	,000
	FRACC33	veneno	-1,2901000	,6341960	,790
		FRACC30	-,7626000	,6341960	,997
		FRACC31	,1816000	,6341960	1,000
		FRACC32	-,6702000	,6341960	,999
		FRACC37	-,7671000	,6341960	,997
		FRACC39	-,3540000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,9797000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,8884000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-8,5357000*	,6341960	,000
		FRACC46	-7,3601000*	,6341960	,000
		FRACC47	-6,2593000*	,6341960	,000
		FRACC48	-7,7622000*	,6341960	,000
		FRACC27	-,2286000	,6341960	1,000
		FRACC28	-14,4798000*	,6341960	,000
		FRACC29	-8,5821000*	,6341960	,000
	FRACC37	veneno	-,5230000	,6341960	1,000
		FRACC30	,0045000	,6341960	1,000
		FRACC31	,9487000	,6341960	,975
		FRACC32	,0969000	,6341960	1,000
		FRACC33	,7671000	,6341960	,997
		FRACC39	,4131000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,2126000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,1213000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-7,7686000*	,6341960	,000
		FRACC46	-6,5930000*	,6341960	,000
		FRACC47	-5,4922000*	,6341960	,000
		FRACC48	-6,9951000*	,6341960	,000
		FRACC27	,5385000	,6341960	1,000
		FRACC28	-13,7127000*	,6341960	,000
		FRACC29	-7,8150000*	,6341960	,000
	FRACC39	veneno	-,9361000	,6341960	,978
		FRACC30	-,4086000	,6341960	1,000
		FRACC31	,5356000	,6341960	1,000
		FRACC32	-,3162000	,6341960	1,000
		FRACC33	,3540000	,6341960	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC27	-1,910053	2,793253
		FRACC28	-16,161253	-11,457947
		FRACC29	-10,263553	-5,560247
	FRACC33	veneno	-3,641753	1,061553
		FRACC30	-3,114253	1,589053
		FRACC31	-2,170053	2,533253
		FRACC32	-3,021853	1,681453
		FRACC37	-3,118753	1,584553
		FRACC39	-2,705653	1,997653
		FRACC41	-23,331353	-18,628047
		FRACC43	-7,240053	-2,536747
		FRACC44-9	-10,887353	-6,184047
		FRACC46	-9,711753	-5,008447
		FRACC47	-8,610953	-3,907647
		FRACC48	-10,113853	-5,410547
		FRACC27	-2,580253	2,123053
		FRACC28	-16,831453	-12,128147
		FRACC29	-10,933753	-6,230447
	FRACC37	veneno	-2,874653	1,828653
		FRACC30	-2,347153	2,356153
		FRACC31	-1,402953	3,300353
		FRACC32	-2,254753	2,448553
		FRACC33	-1,584553	3,118753
		FRACC39	-1,938553	2,764753
		FRACC41	-22,564253	-17,860947
		FRACC43	-6,472953	-1,769647
		FRACC44-9	-10,120253	-5,416947
		FRACC46	-8,944653	-4,241347
		FRACC47	-7,843853	-3,140547
		FRACC48	-9,346753	-4,643447
		FRACC27	-1,813153	2,890153
		FRACC28	-16,064353	-11,361047
		FRACC29	-10,166653	-5,463347
	FRACC39	veneno	-3,287753	1,415553
		FRACC30	-2,760253	1,943053
		FRACC31	-1,816053	2,887253
		FRACC32	-2,667853	2,035453
		FRACC33	-1,997653	2,705653

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC37	-,4131000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,6257000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,5344000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-8,1817000*	,6341960	,000
		FRACC46	-7,0061000*	,6341960	,000
		FRACC47	-5,9053000*	,6341960	,000
		FRACC48	-7,4082000*	,6341960	,000
		FRACC27	,1254000	,6341960	1,000
		FRACC28	-14,1258000*	,6341960	,000
		FRACC29	-8,2281000*	,6341960	,000
	FRACC41	veneno	19,6896000*	,6341960	,000
		FRACC30	20,2171000*	,6341960	,000
		FRACC31	21,1613000*	,6341960	,000
		FRACC32	20,3095000*	,6341960	,000
		FRACC33	20,9797000*	,6341960	,000
		FRACC37	20,2126000*	,6341960	,000
		FRACC39	20,6257000*	,6341960	,000
		FRACC43	16,0913000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	12,4440000*	,6341960	,000
		FRACC46	13,6196000*	,6341960	,000
		FRACC47	14,7204000*	,6341960	,000
		FRACC48	13,2175000*	,6341960	,000
		FRACC27	20,7511000*	,6341960	,000
		FRACC28	6,4999000*	,6341960	,000
		FRACC29	12,3976000*	,6341960	,000
	FRACC43	veneno	3,5983000*	,6341960	,000
		FRACC30	4,1258000*	,6341960	,000
		FRACC31	5,0700000*	,6341960	,000
		FRACC32	4,2182000*	,6341960	,000
		FRACC33	4,8884000*	,6341960	,000
		FRACC37	4,1213000*	,6341960	,000
		FRACC39	4,5344000*	,6341960	,000
		FRACC41	-16,0913000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-3,6473000*	,6341960	,000
		FRACC46	-2,4717000*	,6341960	,032
		FRACC47	-1,3709000	,6341960	,715
		FRACC48	-2,8738000*	,6341960	,006
		FRACC27	4,6598000*	,6341960	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC37	-2,764753	1,938553
		FRACC41	-22,977353	-18,274047
		FRACC43	-6,886053	-2,182747
		FRACC44-9	-10,533353	-5,830047
		FRACC46	-9,357753	-4,654447
		FRACC47	-8,256953	-3,553647
		FRACC48	-9,759853	-5,056547
		FRACC27	-2,226253	2,477053
		FRACC28	-16,477453	-11,774147
		FRACC29	-10,579753	-5,876447
	FRACC41	veneno	17,337947	22,041253
		FRACC30	17,865447	22,568753
		FRACC31	18,809647	23,512953
		FRACC32	17,957847	22,661153
		FRACC33	18,628047	23,331353
		FRACC37	17,860947	22,564253
		FRACC39	18,274047	22,977353
		FRACC43	13,739647	18,442953
		FRACC44-9	10,092347	14,795653
		FRACC46	11,267947	15,971253
		FRACC47	12,368747	17,072053
		FRACC48	10,865847	15,569153
		FRACC27	18,399447	23,102753
		FRACC28	4,148247	8,851553
		FRACC29	10,045947	14,749253
	FRACC43	veneno	1,246647	5,949953
		FRACC30	1,774147	6,477453
		FRACC31	2,718347	7,421653
		FRACC32	1,866547	6,569853
		FRACC33	2,536747	7,240053
		FRACC37	1,769647	6,472953
		FRACC39	2,182747	6,886053
		FRACC41	-18,442953	-13,739647
		FRACC44-9	-5,998953	-1,295647
		FRACC46	-4,823353	-,120047
		FRACC47	-3,722553	,980753
		FRACC48	-5,225453	-,522147
		FRACC27	2,308147	7,011453

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC28	-9,5914000*	,6341960	,000
		FRACC29	-3,6937000*	,6341960	,000
	FRACC44-9	veneno	7,2456000*	,6341960	,000
		FRACC30	7,7731000*	,6341960	,000
		FRACC31	8,7173000*	,6341960	,000
		FRACC32	7,8655000*	,6341960	,000
		FRACC33	8,5357000*	,6341960	,000
		FRACC37	7,7686000*	,6341960	,000
		FRACC39	8,1817000*	,6341960	,000
		FRACC41	-12,4440000*	,6341960	,000
		FRACC43	3,6473000*	,6341960	,000
		FRACC46	1,1756000	,6341960	,878
		FRACC47	2,2764000	,6341960	,066
		FRACC48	,7735000	,6341960	,996
		FRACC27	8,3071000*	,6341960	,000
		FRACC28	-5,9441000*	,6341960	,000
		FRACC29	-,0464000	,6341960	1,000
	FRACC46	veneno	6,0700000*	,6341960	,000
		FRACC30	6,5975000*	,6341960	,000
		FRACC31	7,5417000*	,6341960	,000
		FRACC32	6,6899000*	,6341960	,000
		FRACC33	7,3601000*	,6341960	,000
		FRACC37	6,5930000*	,6341960	,000
		FRACC39	7,0061000*	,6341960	,000
		FRACC41	-13,6196000*	,6341960	,000
		FRACC43	2,4717000*	,6341960	,032
		FRACC44-9	-1,1756000	,6341960	,878
		FRACC47	1,1008000	,6341960	,921
		FRACC48	-,4021000	,6341960	1,000
		FRACC27	7,1315000*	,6341960	,000
		FRACC28	-7,1197000*	,6341960	,000
		FRACC29	-1,2220000	,6341960	,845
	FRACC47	veneno	4,9692000*	,6341960	,000
		FRACC30	5,4967000*	,6341960	,000
		FRACC31	6,4409000*	,6341960	,000
		FRACC32	5,5891000*	,6341960	,000
		FRACC33	6,2593000*	,6341960	,000
		FRACC37	5,4922000*	,6341960	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC28	-11,943053	-7,239747
		FRACC29	-6,045353	-1,342047
	FRACC44-9	veneno	4,893947	9,597253
		FRACC30	5,421447	10,124753
		FRACC31	6,365647	11,068953
		FRACC32	5,513847	10,217153
		FRACC33	6,184047	10,887353
		FRACC37	5,416947	10,120253
		FRACC39	5,830047	10,533353
		FRACC41	-14,795653	-10,092347
		FRACC43	1,295647	5,998953
		FRACC46	-1,176053	3,527253
		FRACC47	-,075253	4,628053
		FRACC48	-1,578153	3,125153
		FRACC27	5,955447	10,658753
		FRACC28	-8,295753	-3,592447
		FRACC29	-2,398053	2,305253
	FRACC46	veneno	3,718347	8,421653
		FRACC30	4,245847	8,949153
		FRACC31	5,190047	9,893353
		FRACC32	4,338247	9,041553
		FRACC33	5,008447	9,711753
		FRACC37	4,241347	8,944653
		FRACC39	4,654447	9,357753
		FRACC41	-15,971253	-11,267947
		FRACC43	,120047	4,823353
		FRACC44-9	-3,527253	1,176053
		FRACC47	-1,250853	3,452453
		FRACC48	-2,753753	1,949553
		FRACC27	4,779847	9,483153
		FRACC28	-9,471353	-4,768047
		FRACC29	-3,573653	1,129653
	FRACC47	veneno	2,617547	7,320853
		FRACC30	3,145047	7,848353
		FRACC31	4,089247	8,792553
		FRACC32	3,237447	7,940753
		FRACC33	3,907647	8,610953
		FRACC37	3,140547	7,843853

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC39	5,9053000*	,6341960	,000
		FRACC41	-14,7204000*	,6341960	,000
		FRACC43	1,3709000	,6341960	,715
		FRACC44-9	-2,2764000	,6341960	,066
		FRACC46	-1,1008000	,6341960	,921
		FRACC48	-1,5029000	,6341960	,580
		FRACC27	6,0307000*	,6341960	,000
		FRACC28	-8,2205000*	,6341960	,000
		FRACC29	-2,3228000	,6341960	,056
	FRACC48	veneno	6,4721000*	,6341960	,000
		FRACC30	6,9996000*	,6341960	,000
		FRACC31	7,9438000*	,6341960	,000
		FRACC32	7,0920000*	,6341960	,000
		FRACC33	7,7622000*	,6341960	,000
		FRACC37	6,9951000*	,6341960	,000
		FRACC39	7,4082000*	,6341960	,000
		FRACC41	-13,2175000*	,6341960	,000
		FRACC43	2,8738000*	,6341960	,006
		FRACC44-9	-,7735000	,6341960	,996
		FRACC46	,4021000	,6341960	1,000
		FRACC47	1,5029000	,6341960	,580
		FRACC27	7,5336000*	,6341960	,000
		FRACC28	-6,7176000*	,6341960	,000
		FRACC29	-,8199000	,6341960	,993
	FRACC27	veneno	-1,0615000	,6341960	,939
		FRACC30	-,5340000	,6341960	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC39	3,553647	8,256953
		FRACC41	-17,072053	-12,368747
		FRACC43	-,980753	3,722553
		FRACC44-9	-4,628053	,075253
		FRACC46	-3,452453	1,250853
		FRACC48	-3,854553	,848753
		FRACC27	3,679047	8,382353
		FRACC28	-10,572153	-5,868847
		FRACC29	-4,674453	,028853
	FRACC48	veneno	4,120447	8,823753
		FRACC30	4,647947	9,351253
		FRACC31	5,592147	10,295453
		FRACC32	4,740347	9,443653
		FRACC33	5,410547	10,113853
		FRACC37	4,643447	9,346753
		FRACC39	5,056547	9,759853
		FRACC41	-15,569153	-10,865847
		FRACC43	,522147	5,225453
		FRACC44-9	-3,125153	1,578153
		FRACC46	-1,949553	2,753753
		FRACC47	-,848753	3,854553
		FRACC27	5,181947	9,885253
		FRACC28	-9,069253	-4,365947
		FRACC29	-3,171553	1,531753
	FRACC27	veneno	-3,413153	1,290153
		FRACC30	-2,885653	1,817653

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC31	,4102000	,6341960	1,000
		FRACC32	-,4416000	,6341960	1,000
		FRACC33	,2286000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,5385000	,6341960	1,000
		FRACC39	-,1254000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,7511000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,6598000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-8,3071000*	,6341960	,000
		FRACC46	-7,1315000*	,6341960	,000
		FRACC47	-6,0307000*	,6341960	,000
		FRACC48	-7,5336000*	,6341960	,000
		FRACC28	-14,2512000*	,6341960	,000
		FRACC29	-8,3535000*	,6341960	,000
	FRACC28	veneno	13,1897000*	,6341960	,000
		FRACC30	13,7172000*	,6341960	,000
		FRACC31	14,6614000*	,6341960	,000
		FRACC32	13,8096000*	,6341960	,000
		FRACC33	14,4798000*	,6341960	,000
		FRACC37	13,7127000*	,6341960	,000
		FRACC39	14,1258000*	,6341960	,000
		FRACC41	-6,4999000*	,6341960	,000
		FRACC43	9,5914000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	5,9441000*	,6341960	,000
		FRACC46	7,1197000*	,6341960	,000
		FRACC47	8,2205000*	,6341960	,000
		FRACC48	6,7176000*	,6341960	,000
		FRACC27	14,2512000*	,6341960	,000
		FRACC29	5,8977000*	,6341960	,000
	FRACC29	veneno	7,2920000*	,6341960	,000
		FRACC30	7,8195000*	,6341960	,000
		FRACC31	8,7637000*	,6341960	,000
		FRACC32	7,9119000*	,6341960	,000
		FRACC33	8,5821000*	,6341960	,000
		FRACC37	7,8150000*	,6341960	,000
		FRACC39	8,2281000*	,6341960	,000
		FRACC41	-12,3976000*	,6341960	,000
		FRACC43	3,6937000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	,0464000	,6341960	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC31	-1,941453	2,761853
		FRACC32	-2,793253	1,910053
		FRACC33	-2,123053	2,580253
		FRACC37	-2,890153	1,813153
		FRACC39	-2,477053	2,226253
		FRACC41	-23,102753	-18,399447
		FRACC43	-7,011453	-2,308147
		FRACC44-9	-10,658753	-5,955447
		FRACC46	-9,483153	-4,779847
		FRACC47	-8,382353	-3,679047
		FRACC48	-9,885253	-5,181947
		FRACC28	-16,602853	-11,899547
		FRACC29	-10,705153	-6,001847
	FRACC28	veneno	10,838047	15,541353
		FRACC30	11,365547	16,068853
		FRACC31	12,309747	17,013053
		FRACC32	11,457947	16,161253
		FRACC33	12,128147	16,831453
		FRACC37	11,361047	16,064353
		FRACC39	11,774147	16,477453
		FRACC41	-8,851553	-4,148247
		FRACC43	7,239747	11,943053
		FRACC44-9	3,592447	8,295753
		FRACC46	4,768047	9,471353
		FRACC47	5,868847	10,572153
		FRACC48	4,365947	9,069253
		FRACC27	11,899547	16,602853
		FRACC29	3,546047	8,249353
	FRACC29	veneno	4,940347	9,643653
		FRACC30	5,467847	10,171153
		FRACC31	6,412047	11,115353
		FRACC32	5,560247	10,263553
		FRACC33	6,230447	10,933753
		FRACC37	5,463347	10,166653
		FRACC39	5,876447	10,579753
		FRACC41	-14,749253	-10,045947
		FRACC43	1,342047	6,045353
		FRACC44-9	-2,305253	2,398053

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC46	1,2220000	,6341960	,845
		FRACC47	2,3228000	,6341960	,056
		FRACC48	,8199000	,6341960	,993
		FRACC27	8,3535000 *	,6341960	,000
		FRACC28	-5,8977000 *	,6341960	,000
Scheffe	veneno	FRACC30	,5275000	,6341960	1,000
		FRACC31	1,4717000	,6341960	,981
		FRACC32	,6199000	,6341960	1,000
		FRACC33	1,2901000	,6341960	,995
		FRACC37	,5230000	,6341960	1,000
		FRACC39	,9361000	,6341960	1,000
		FRACC41	-19,6896000 *	,6341960	,000
		FRACC43	-3,5983000 *	,6341960	,034
		FRACC44-9	-7,2456000 *	,6341960	,000
		FRACC46	-6,0700000 *	,6341960	,000
		FRACC47	-4,9692000 *	,6341960	,000
		FRACC48	-6,4721000 *	,6341960	,000
		FRACC27	1,0615000	,6341960	,999
		FRACC28	-13,1897000 *	,6341960	,000
		FRACC29	-7,2920000 *	,6341960	,000
	FRACC30	veneno	-,5275000	,6341960	1,000
		FRACC31	,9442000	,6341960	1,000
		FRACC32	,0924000	,6341960	1,000
		FRACC33	,7626000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,0045000	,6341960	1,000
		FRACC39	,4086000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,2171000 *	,6341960	,000
		FRACC43	-4,1258000 *	,6341960	,007
		FRACC44-9	-7,7731000 *	,6341960	,000
		FRACC46	-6,5975000 *	,6341960	,000
		FRACC47	-5,4967000 *	,6341960	,000
		FRACC48	-6,9996000 *	,6341960	,000
		FRACC27	,5340000	,6341960	1,000
		FRACC28	-13,7172000 *	,6341960	,000
		FRACC29	-7,8195000 *	,6341960	,000
	FRACC31	veneno	-1,4717000	,6341960	,981
		FRACC30	-,9442000	,6341960	1,000
		FRACC32	-,8518000	,6341960	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC46	-1,129653	3,573653
		FRACC47	-,028853	4,674453
		FRACC48	-1,531753	3,171553
		FRACC27	6,001847	10,705153
		FRACC28	-8,249353	-3,546047
Scheffe	veneno	FRACC30	-2,939171	3,994171
		FRACC31	-1,994971	4,938371
		FRACC32	-2,846771	4,086571
		FRACC33	-2,176571	4,756771
		FRACC37	-2,943671	3,989671
		FRACC39	-2,530571	4,402771
		FRACC41	-23,156271	-16,222929
		FRACC43	-7,064971	-,131629
		FRACC44-9	-10,712271	-3,778929
		FRACC46	-9,536671	-2,603329
		FRACC47	-8,435871	-1,502529
		FRACC48	-9,938771	-3,005429
		FRACC27	-2,405171	4,528171
		FRACC28	-16,656371	-9,723029
		FRACC29	-10,758671	-3,825329
	FRACC30	veneno	-3,994171	2,939171
		FRACC31	-2,522471	4,410871
		FRACC32	-3,374271	3,559071
		FRACC33	-2,704071	4,229271
		FRACC37	-3,471171	3,462171
		FRACC39	-3,058071	3,875271
		FRACC41	-23,683771	-16,750429
		FRACC43	-7,592471	-,659129
		FRACC44-9	-11,239771	-4,306429
		FRACC46	-10,064171	-3,130829
		FRACC47	-8,963371	-2,030029
		FRACC48	-10,466271	-3,532929
		FRACC27	-2,932671	4,000671
		FRACC28	-17,183871	-10,250529
		FRACC29	-11,286171	-4,352829
	FRACC31	veneno	-4,938371	1,994971
		FRACC30	-4,410871	2,522471
		FRACC32	-4,318471	2,614871

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC33	-,1816000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,9487000	,6341960	1,000
		FRACC39	-,5356000	,6341960	1,000
		FRACC41	-21,1613000 *	,6341960	,000
		FRACC43	-5,0700000 *	,6341960	,000
		FRACC44-9	-8,7173000 *	,6341960	,000
		FRACC46	-7,5417000 *	,6341960	,000
		FRACC47	-6,4409000 *	,6341960	,000
		FRACC48	-7,9438000 *	,6341960	,000
		FRACC27	-,4102000	,6341960	1,000
		FRACC28	-14,6614000 *	,6341960	,000
		FRACC29	-8,7637000 *	,6341960	,000
	FRACC32	veneno	-,6199000	,6341960	1,000
		FRACC30	-,0924000	,6341960	1,000
		FRACC31	,8518000	,6341960	1,000
		FRACC33	,6702000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,0969000	,6341960	1,000
		FRACC39	,3162000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,3095000 *	,6341960	,000
		FRACC43	-4,2182000 *	,6341960	,005
		FRACC44-9	-7,8655000 *	,6341960	,000
		FRACC46	-6,6899000 *	,6341960	,000
		FRACC47	-5,5891000 *	,6341960	,000
		FRACC48	-7,0920000 *	,6341960	,000
		FRACC27	,4416000	,6341960	1,000
		FRACC28	-13,8096000 *	,6341960	,000
		FRACC29	-7,9119000 *	,6341960	,000
	FRACC33	veneno	-1,2901000	,6341960	,995
		FRACC30	-,7626000	,6341960	1,000
		FRACC31	,1816000	,6341960	1,000
		FRACC32	-,6702000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,7671000	,6341960	1,000
		FRACC39	-,3540000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,9797000 *	,6341960	,000
		FRACC43	-4,8884000 *	,6341960	,001
		FRACC44-9	-8,5357000 *	,6341960	,000
		FRACC46	-7,3601000 *	,6341960	,000
		FRACC47	-6,2593000 *	,6341960	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC33	-3,648271	3,285071
		FRACC37	-4,415371	2,517971
		FRACC39	-4,002271	2,931071
		FRACC41	-24,627971	-17,694629
		FRACC43	-8,536671	-1,603329
		FRACC44-9	-12,183971	-5,250629
		FRACC46	-11,008371	-4,075029
		FRACC47	-9,907571	-2,974229
		FRACC48	-11,410471	-4,477129
		FRACC27	-3,876871	3,056471
		FRACC28	-18,128071	-11,194729
		FRACC29	-12,230371	-5,297029
	FRACC32	veneno	-4,086571	2,846771
		FRACC30	-3,559071	3,374271
		FRACC31	-2,614871	4,318471
		FRACC33	-2,796471	4,136871
		FRACC37	-3,563571	3,369771
		FRACC39	-3,150471	3,782871
		FRACC41	-23,776171	-16,842829
		FRACC43	-7,684871	-,751529
		FRACC44-9	-11,332171	-4,398829
		FRACC46	-10,156571	-3,223229
		FRACC47	-9,055771	-2,122429
		FRACC48	-10,558671	-3,625329
		FRACC27	-3,025071	3,908271
		FRACC28	-17,276271	-10,342929
		FRACC29	-11,378571	-4,445229
	FRACC33	veneno	-4,756771	2,176571
		FRACC30	-4,229271	2,704071
		FRACC31	-3,285071	3,648271
		FRACC32	-4,136871	2,796471
		FRACC37	-4,233771	2,699571
		FRACC39	-3,820671	3,112671
		FRACC41	-24,446371	-17,513029
		FRACC43	-8,355071	-1,421729
		FRACC44-9	-12,002371	-5,069029
		FRACC46	-10,826771	-3,893429
		FRACC47	-9,725971	-2,792629

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC48	-7,7622000*	,6341960	,000
		FRACC27	-,2286000	,6341960	1,000
		FRACC28	-14,4798000*	,6341960	,000
		FRACC29	-8,5821000*	,6341960	,000
	FRACC37	veneno	-,5230000	,6341960	1,000
		FRACC30	,0045000	,6341960	1,000
		FRACC31	,9487000	,6341960	1,000
		FRACC32	,0969000	,6341960	1,000
		FRACC33	,7671000	,6341960	1,000
		FRACC39	,4131000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,2126000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,1213000*	,6341960	,007
		FRACC44-9	-7,7686000*	,6341960	,000
		FRACC46	-6,5930000*	,6341960	,000
		FRACC47	-5,4922000*	,6341960	,000
		FRACC48	-6,9951000*	,6341960	,000
		FRACC27	,5385000	,6341960	1,000
		FRACC28	-13,7127000*	,6341960	,000
		FRACC29	-7,8150000*	,6341960	,000
	FRACC39	veneno	-,9361000	,6341960	1,000
		FRACC30	-,4086000	,6341960	1,000
		FRACC31	,5356000	,6341960	1,000
		FRACC32	-,3162000	,6341960	1,000
		FRACC33	,3540000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,4131000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,6257000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,5344000*	,6341960	,002
		FRACC44-9	-8,1817000*	,6341960	,000
		FRACC46	-7,0061000*	,6341960	,000
		FRACC47	-5,9053000*	,6341960	,000
		FRACC48	-7,4082000*	,6341960	,000
		FRACC27	,1254000	,6341960	1,000
		FRACC28	-14,1258000*	,6341960	,000
		FRACC29	-8,2281000*	,6341960	,000
	FRACC41	veneno	19,6896000*	,6341960	,000
		FRACC30	20,2171000*	,6341960	,000
		FRACC31	21,1613000*	,6341960	,000
		FRACC32	20,3095000*	,6341960	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC48	-11,228871	-4,295529
		FRACC27	-3,695271	3,238071
		FRACC28	-17,946471	-11,013129
		FRACC29	-12,048771	-5,115429
	FRACC37	veneno	-3,989671	2,943671
		FRACC30	-3,462171	3,471171
		FRACC31	-2,517971	4,415371
		FRACC32	-3,369771	3,563571
		FRACC33	-2,699571	4,233771
		FRACC39	-3,053571	3,879771
		FRACC41	-23,679271	-16,745929
		FRACC43	-7,587971	-,654629
		FRACC44-9	-11,235271	-4,301929
		FRACC46	-10,059671	-3,126329
		FRACC47	-8,958871	-2,025529
		FRACC48	-10,461771	-3,528429
		FRACC27	-2,928171	4,005171
		FRACC28	-17,179371	-10,246029
		FRACC29	-11,281671	-4,348329
	FRACC39	veneno	-4,402771	2,530571
		FRACC30	-3,875271	3,058071
		FRACC31	-2,931071	4,002271
		FRACC32	-3,782871	3,150471
		FRACC33	-3,112671	3,820671
		FRACC37	-3,879771	3,053571
		FRACC41	-24,092371	-17,159029
		FRACC43	-8,001071	-1,067729
		FRACC44-9	-11,648371	-4,715029
		FRACC46	-10,472771	-3,539429
		FRACC47	-9,371971	-2,438629
		FRACC48	-10,874871	-3,941529
		FRACC27	-3,341271	3,592071
		FRACC28	-17,592471	-10,659129
		FRACC29	-11,694771	-4,761429
	FRACC41	veneno	16,222929	23,156271
		FRACC30	16,750429	23,683771
		FRACC31	17,694629	24,627971
		FRACC32	16,842829	23,776171

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC33	20,9797000*	,6341960	,000
		FRACC37	20,2126000*	,6341960	,000
		FRACC39	20,6257000*	,6341960	,000
		FRACC43	16,0913000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	12,4440000*	,6341960	,000
		FRACC46	13,6196000*	,6341960	,000
		FRACC47	14,7204000*	,6341960	,000
		FRACC48	13,2175000*	,6341960	,000
		FRACC27	20,7511000*	,6341960	,000
		FRACC28	6,4999000*	,6341960	,000
		FRACC29	12,3976000*	,6341960	,000
	FRACC43	veneno	3,5983000*	,6341960	,034
		FRACC30	4,1258000*	,6341960	,007
		FRACC31	5,0700000*	,6341960	,000
		FRACC32	4,2182000*	,6341960	,005
		FRACC33	4,8884000*	,6341960	,001
		FRACC37	4,1213000*	,6341960	,007
		FRACC39	4,5344000*	,6341960	,002
		FRACC41	-16,0913000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	-3,6473000*	,6341960	,030
		FRACC46	-2,4717000	,6341960	,467
		FRACC47	-1,3709000	,6341960	,990
		FRACC48	-2,8738000	,6341960	,221
		FRACC27	4,6598000*	,6341960	,001
		FRACC28	-9,5914000*	,6341960	,000
		FRACC29	-3,6937000*	,6341960	,026
	FRACC44-9	veneno	7,2456000*	,6341960	,000
		FRACC30	7,7731000*	,6341960	,000
		FRACC31	8,7173000*	,6341960	,000
		FRACC32	7,8655000*	,6341960	,000
		FRACC33	8,5357000*	,6341960	,000
		FRACC37	7,7686000*	,6341960	,000
		FRACC39	8,1817000*	,6341960	,000
		FRACC41	-12,4440000*	,6341960	,000
		FRACC43	3,6473000*	,6341960	,030
		FRACC46	1,1756000	,6341960	,998
		FRACC47	2,2764000	,6341960	,611
		FRACC48	,7735000	,6341960	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC33	17,513029	24,446371
		FRACC37	16,745929	23,679271
		FRACC39	17,159029	24,092371
		FRACC43	12,624629	19,557971
		FRACC44-9	8,977329	15,910671
		FRACC46	10,152929	17,086271
		FRACC47	11,253729	18,187071
		FRACC48	9,750829	16,684171
		FRACC27	17,284429	24,217771
		FRACC28	3,033229	9,966571
		FRACC29	8,930929	15,864271
	FRACC43	veneno	,131629	7,064971
		FRACC30	,659129	7,592471
		FRACC31	1,603329	8,536671
		FRACC32	,751529	7,684871
		FRACC33	1,421729	8,355071
		FRACC37	,654629	7,587971
		FRACC39	1,067729	8,001071
		FRACC41	-19,557971	-12,624629
		FRACC44-9	-7,113971	-,180629
		FRACC46	-5,938371	,994971
		FRACC47	-4,837571	2,095771
		FRACC48	-6,340471	,592871
		FRACC27	1,193129	8,126471
		FRACC28	-13,058071	-6,124729
		FRACC29	-7,160371	-,227029
	FRACC44-9	veneno	3,778929	10,712271
		FRACC30	4,306429	11,239771
		FRACC31	5,250629	12,183971
		FRACC32	4,398829	11,332171
		FRACC33	5,069029	12,002371
		FRACC37	4,301929	11,235271
		FRACC39	4,715029	11,648371
		FRACC41	-15,910671	-8,977329
		FRACC43	,180629	7,113971
		FRACC46	-2,291071	4,642271
		FRACC47	-1,190271	5,743071
		FRACC48	-2,693171	4,240171

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC27	8,3071000*	,6341960	,000
		FRACC28	-5,9441000*	,6341960	,000
		FRACC29	-,0464000	,6341960	1,000
	FRACC46	veneno	6,0700000*	,6341960	,000
		FRACC30	6,5975000*	,6341960	,000
		FRACC31	7,5417000*	,6341960	,000
		FRACC32	6,6899000*	,6341960	,000
		FRACC33	7,3601000*	,6341960	,000
		FRACC37	6,5930000*	,6341960	,000
		FRACC39	7,0061000*	,6341960	,000
		FRACC41	-13,6196000*	,6341960	,000
		FRACC43	2,4717000	,6341960	,467
		FRACC44-9	-1,1756000	,6341960	,998
		FRACC47	1,1008000	,6341960	,999
		FRACC48	-,4021000	,6341960	1,000
		FRACC27	7,1315000*	,6341960	,000
		FRACC28	-7,1197000*	,6341960	,000
		FRACC29	-1,2220000	,6341960	,997
	FRACC47	veneno	4,9692000*	,6341960	,000
		FRACC30	5,4967000*	,6341960	,000
		FRACC31	6,4409000*	,6341960	,000
		FRACC32	5,5891000*	,6341960	,000
		FRACC33	6,2593000*	,6341960	,000
		FRACC37	5,4922000*	,6341960	,000
		FRACC39	5,9053000*	,6341960	,000
		FRACC41	-14,7204000*	,6341960	,000
		FRACC43	1,3709000	,6341960	,990
		FRACC44-9	-2,2764000	,6341960	,611
		FRACC46	-1,1008000	,6341960	,999
		FRACC48	-1,5029000	,6341960	,977
		FRACC27	6,0307000*	,6341960	,000
		FRACC28	-8,2205000*	,6341960	,000
		FRACC29	-2,3228000	,6341960	,577
	FRACC48	veneno	6,4721000*	,6341960	,000
		FRACC30	6,9996000*	,6341960	,000
		FRACC31	7,9438000*	,6341960	,000
		FRACC32	7,0920000*	,6341960	,000
		FRACC33	7,7622000*	,6341960	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC27	4,840429	11,773771
		FRACC28	-9,410771	-2,477429
		FRACC29	-3,513071	3,420271
	FRACC46	veneno	2,603329	9,536671
		FRACC30	3,130829	10,064171
		FRACC31	4,075029	11,008371
		FRACC32	3,223229	10,156571
		FRACC33	3,893429	10,826771
		FRACC37	3,126329	10,059671
		FRACC39	3,539429	10,472771
		FRACC41	-17,086271	-10,152929
		FRACC43	-,994971	5,938371
		FRACC44-9	-4,642271	2,291071
		FRACC47	-2,365871	4,567471
		FRACC48	-3,868771	3,064571
		FRACC27	3,664829	10,598171
		FRACC28	-10,586371	-3,653029
		FRACC29	-4,688671	2,244671
	FRACC47	veneno	1,502529	8,435871
		FRACC30	2,030029	8,963371
		FRACC31	2,974229	9,907571
		FRACC32	2,122429	9,055771
		FRACC33	2,792629	9,725971
		FRACC37	2,025529	8,958871
		FRACC39	2,438629	9,371971
		FRACC41	-18,187071	-11,253729
		FRACC43	-2,095771	4,837571
		FRACC44-9	-5,743071	1,190271
		FRACC46	-4,567471	2,365871
		FRACC48	-4,969571	1,963771
		FRACC27	2,564029	9,497371
		FRACC28	-11,687171	-4,753829
		FRACC29	-5,789471	1,143871
	FRACC48	veneno	3,005429	9,938771
		FRACC30	3,532929	10,466271
		FRACC31	4,477129	11,410471
		FRACC32	3,625329	10,558671
		FRACC33	4,295529	11,228871

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC37	6,9951000*	,6341960	,000
		FRACC39	7,4082000*	,6341960	,000
		FRACC41	-13,2175000*	,6341960	,000
		FRACC43	2,8738000	,6341960	,221
		FRACC44-9	-,7735000	,6341960	1,000
		FRACC46	,4021000	,6341960	1,000
		FRACC47	1,5029000	,6341960	,977
		FRACC27	7,5336000*	,6341960	,000
		FRACC28	-6,7176000*	,6341960	,000
		FRACC29	-,8199000	,6341960	1,000
	FRACC27	veneno	-1,0615000	,6341960	,999
		FRACC30	-,5340000	,6341960	1,000
		FRACC31	,4102000	,6341960	1,000
		FRACC32	-,4416000	,6341960	1,000
		FRACC33	,2286000	,6341960	1,000
		FRACC37	-,5385000	,6341960	1,000
		FRACC39	-,1254000	,6341960	1,000
		FRACC41	-20,7511000*	,6341960	,000
		FRACC43	-4,6598000*	,6341960	,001
		FRACC44-9	-8,3071000*	,6341960	,000
		FRACC46	-7,1315000*	,6341960	,000
		FRACC47	-6,0307000*	,6341960	,000
		FRACC48	-7,5336000*	,6341960	,000
		FRACC28	-14,2512000*	,6341960	,000
		FRACC29	-8,3535000*	,6341960	,000
	FRACC28	veneno	13,1897000*	,6341960	,000
		FRACC30	13,7172000*	,6341960	,000
		FRACC31	14,6614000*	,6341960	,000
		FRACC32	13,8096000*	,6341960	,000
		FRACC33	14,4798000*	,6341960	,000
		FRACC37	13,7127000*	,6341960	,000
		FRACC39	14,1258000*	,6341960	,000
		FRACC41	-6,4999000*	,6341960	,000
		FRACC43	9,5914000*	,6341960	,000
		FRACC44-9	5,9441000*	,6341960	,000
		FRACC46	7,1197000*	,6341960	,000
		FRACC47	8,2205000*	,6341960	,000
		FRACC48	6,7176000*	,6341960	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC37	3,528429	10,461771
		FRACC39	3,941529	10,874871
		FRACC41	-16,684171	-9,750829
		FRACC43	-,592871	6,340471
		FRACC44-9	-4,240171	2,693171
		FRACC46	-3,064571	3,868771
		FRACC47	-1,963771	4,969571
		FRACC27	4,066929	11,000271
		FRACC28	-10,184271	-3,250929
		FRACC29	-4,286571	2,646771
	FRACC27	veneno	-4,528171	2,405171
		FRACC30	-4,000671	2,932671
		FRACC31	-3,056471	3,876871
		FRACC32	-3,908271	3,025071
		FRACC33	-3,238071	3,695271
		FRACC37	-4,005171	2,928171
		FRACC39	-3,592071	3,341271
		FRACC41	-24,217771	-17,284429
		FRACC43	-8,126471	-1,193129
		FRACC44-9	-11,773771	-4,840429
		FRACC46	-10,598171	-3,664829
		FRACC47	-9,497371	-2,564029
		FRACC48	-11,000271	-4,066929
		FRACC28	-17,717871	-10,784529
		FRACC29	-11,820171	-4,886829
	FRACC28	veneno	9,723029	16,656371
		FRACC30	10,250529	17,183871
		FRACC31	11,194729	18,128071
		FRACC32	10,342929	17,276271
		FRACC33	11,013129	17,946471
		FRACC37	10,246029	17,179371
		FRACC39	10,659129	17,592471
		FRACC41	-9,966571	-3,033229
		FRACC43	6,124729	13,058071
		FRACC44-9	2,477429	9,410771
		FRACC46	3,653029	10,586371
		FRACC47	4,753829	11,687171
		FRACC48	3,250929	10,184271

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	
		FRACC27	14,2512000*	,6341960	,000	
		FRACC29	5,8977000*	,6341960	,000	
	FRACC29	veneno	7,2920000*	,6341960	,000	
		FRACC30	7,8195000*	,6341960	,000	
		FRACC31	8,7637000*	,6341960	,000	
		FRACC32	7,9119000*	,6341960	,000	
		FRACC33	8,5821000*	,6341960	,000	
		FRACC37	7,8150000*	,6341960	,000	
		FRACC39	8,2281000*	,6341960	,000	
		FRACC41	-12,3976000*	,6341960	,000	
		FRACC43	3,6937000*	,6341960	,026	
		FRACC44-9	,0464000	,6341960	1,000	
		FRACC46	1,2220000	,6341960	,997	
		FRACC47	2,3228000	,6341960	,577	
		FRACC48	,8199000	,6341960	1,000	
		FRACC27	8,3535000*	,6341960	,000	
		FRACC28	-5,8977000*	,6341960	,000	
raizhbt6	HSD Tukey	veneno	FRACC30	-,5963175*	,1306842	,006
			FRACC31	-,7186734*	,1306842	,000
			FRACC32	-1,7667820*	,1306842	,000
			FRACC33	-2,6584118*	,1306842	,000
			FRACC37	-,0336996	,1306842	1,000
			FRACC39	-1,8214920*	,1306842	,000
			FRACC41	-2,0449499*	,1306842	,000
			FRACC43	-3,7979566*	,1306842	,000
			FRACC44-9	-1,3108172*	,1306842	,000
			FRACC46	-1,1824513*	,1306842	,000
			FRACC47	-,2881554	,1306842	,688
			FRACC48	,1857039	,1306842	,984
			FRACC27	-,3401821	,1306842	,430
			FRACC28	-3,9532223*	,1306842	,000
			FRACC29	-11,0823366*	,1306842	,000
		FRACC30	veneno	,5963175*	,1306842	,006
			FRACC31	-,1223559	,1306842	1,000
			FRACC32	-1,1704645*	,1306842	,000
			FRACC33	-2,0620943*	,1306842	,000
			FRACC37	,5626179*	,1306842	,011
			FRACC39	-1,2251745*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza			
			Límite inferior	Límite superior		
		FRACC27	10,784529	17,717871		
		FRACC29	2,431029	9,364371		
	FRACC29	veneno	3,825329	10,758671		
		FRACC30	4,352829	11,286171		
		FRACC31	5,297029	12,230371		
		FRACC32	4,445229	11,378571		
		FRACC33	5,115429	12,048771		
		FRACC37	4,348329	11,281671		
		FRACC39	4,761429	11,694771		
		FRACC41	-15,864271	-8,930929		
		FRACC43	,227029	7,160371		
		FRACC44-9	-3,420271	3,513071		
		FRACC46	-2,244671	4,688671		
		FRACC47	-1,143871	5,789471		
		FRACC48	-2,646771	4,286571		
		FRACC27	4,886829	11,820171		
		FRACC28	-9,364371	-2,431029		
	raizhbt26	HSD Tukey	veneno	FRACC30	-1,080906	-,111729
FRACC31				-1,203261	-,234085	
FRACC32				-2,251370	-1,282194	
FRACC33				-3,143000	-2,173824	
FRACC37				-,518288	,450888	
FRACC39				-2,306080	-1,336904	
FRACC41				-2,529538	-1,560362	
FRACC43				-4,282545	-3,313369	
FRACC44-9				-1,795405	-,826229	
FRACC46				-1,667039	-,697863	
FRACC47				-,772743	,196433	
FRACC48				-,298884	,670292	
FRACC27				-,824770	,144406	
FRACC28				-4,437810	-3,468634	
FRACC29				-11,566925	-10,597749	
FRACC30				veneno	,111729	1,080906
				FRACC31	-,606944	,362232
				FRACC32	-1,655053	-,685876
	FRACC33	-2,546682	-1,577506			
	FRACC37	,078030	1,047206			
	FRACC39	-1,709763	-,740586			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC41	-1,4486324*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,2016391*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,7144997*	,1306842	,000
		FRACC46	-,5861338*	,1306842	,007
		FRACC47	,3081621	,1306842	,588
		FRACC48	,7820214*	,1306842	,000
		FRACC27	,2561354	,1306842	,829
		FRACC28	-3,3569049*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,4860191*	,1306842	,000
	FRACC31	veneno	,7186734*	,1306842	,000
		FRACC30	,1223559	,1306842	1,000
		FRACC32	-1,0481086*	,1306842	,000
		FRACC33	-1,9397384*	,1306842	,000
		FRACC37	,6849738*	,1306842	,001
		FRACC39	-1,1028186*	,1306842	,000
		FRACC41	-1,3262765*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,0792832*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,5921438*	,1306842	,006
		FRACC46	-,4637779	,1306842	,072
		FRACC47	,4305180	,1306842	,126
		FRACC48	,9043773*	,1306842	,000
		FRACC27	,3784913	,1306842	,270
		FRACC28	-3,2345489*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,3636632*	,1306842	,000
	FRACC32	veneno	1,7667820*	,1306842	,000
		FRACC30	1,1704645*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC41	-1,933220	-,964044
		FRACC43	-3,686227	-2,717051
		FRACC44-9	-1,199088	-,229912
		FRACC46	-1,070722	-,101546
		FRACC47	-,176426	,792750
		FRACC48	,297433	1,266609
		FRACC27	-,228453	,740723
		FRACC28	-3,841493	-2,872317
		FRACC29	-10,970607	-10,001431
	FRACC31	veneno	,234085	1,203261
		FRACC30	-,362232	,606944
		FRACC32	-1,532697	-,563521
		FRACC33	-2,424326	-1,455150
		FRACC37	,200386	1,169562
		FRACC39	-1,587407	-,618231
		FRACC41	-1,810865	-,841688
		FRACC43	-3,563871	-2,594695
		FRACC44-9	-1,076732	-,107556
		FRACC46	-,948366	,020810
		FRACC47	-,054070	,915106
		FRACC48	,419789	1,388965
		FRACC27	-,106097	,863079
		FRACC28	-3,719137	-2,749961
		FRACC29	-10,848251	-9,879075
	FRACC32	veneno	1,282194	2,251370
		FRACC30	,685876	1,655053

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC31	1,0481086*	,1306842	,000
		FRACC33	-,8916298*	,1306842	,000
		FRACC37	1,7330825*	,1306842	,000
		FRACC39	-,0547100	,1306842	1,000
		FRACC41	-,2781679	,1306842	,735
		FRACC43	-2,0311746*	,1306842	,000
		FRACC44-9	,4559648	,1306842	,083
		FRACC46	,5843307*	,1306842	,007
		FRACC47	1,4786266*	,1306842	,000
		FRACC48	1,9524859*	,1306842	,000
		FRACC27	1,4266000*	,1306842	,000
		FRACC28	-2,1864403*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,3155545*	,1306842	,000
	FRACC33	veneno	2,6584118*	,1306842	,000
		FRACC30	2,0620943*	,1306842	,000
		FRACC31	1,9397384*	,1306842	,000
		FRACC32	,8916298*	,1306842	,000
		FRACC37	2,6247123*	,1306842	,000
		FRACC39	,8369198*	,1306842	,000
		FRACC41	,6134619*	,1306842	,004
		FRACC43	-1,1395448*	,1306842	,000
		FRACC44-9	1,3475946*	,1306842	,000
		FRACC46	1,4759605*	,1306842	,000
		FRACC47	2,3702564*	,1306842	,000
		FRACC48	2,8441157*	,1306842	,000
		FRACC27	2,3182298*	,1306842	,000
		FRACC28	-1,2948105*	,1306842	,000
		FRACC29	-8,4239247*	,1306842	,000
	FRACC37	veneno	,0336996	,1306842	1,000
		FRACC30	-,5626179*	,1306842	,011
		FRACC31	-,6849738*	,1306842	,001
		FRACC32	-1,7330825*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,6247123*	,1306842	,000
		FRACC39	-1,7877924*	,1306842	,000
		FRACC41	-2,0112503*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,7642570*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-1,2771177*	,1306842	,000
		FRACC46	-1,1487517*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC31	,563521	1,532697
		FRACC33	-1,376218	-,407042
		FRACC37	1,248494	2,217670
		FRACC39	-,539298	,429878
		FRACC41	-,762756	,206420
		FRACC43	-2,515763	-1,546587
		FRACC44-9	-,028623	,940553
		FRACC46	,099743	1,068919
		FRACC47	,994039	1,963215
		FRACC48	1,467898	2,437074
		FRACC27	,942012	1,911188
		FRACC28	-2,671028	-1,701852
		FRACC29	-9,800143	-8,830966
	FRACC33	veneno	2,173824	3,143000
		FRACC30	1,577506	2,546682
		FRACC31	1,455150	2,424326
		FRACC32	,407042	1,376218
		FRACC37	2,140124	3,109300
		FRACC39	,352332	1,321508
		FRACC41	,128874	1,098050
		FRACC43	-1,624133	-,654957
		FRACC44-9	,863007	1,832183
		FRACC46	,991372	1,960549
		FRACC47	1,885668	2,854844
		FRACC48	2,359528	3,328704
		FRACC27	1,833642	2,802818
		FRACC28	-1,779399	-,810222
		FRACC29	-8,908513	-7,939337
	FRACC37	veneno	-,450888	,518288
		FRACC30	-1,047206	-,078030
		FRACC31	-1,169562	-,200386
		FRACC32	-2,217670	-1,248494
		FRACC33	-3,109300	-2,140124
		FRACC39	-2,272380	-1,303204
		FRACC41	-2,495838	-1,526662
		FRACC43	-4,248845	-3,279669
		FRACC44-9	-1,761706	-,792530
		FRACC46	-1,633340	-,664164

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC47	-,2544559	,1306842	,835
		FRACC48	,2194035	,1306842	,938
		FRACC27	-,3064825	,1306842	,597
		FRACC28	-3,9195228 *	,1306842	,000
		FRACC29	-11,0486370 *	,1306842	,000
	FRACC39	veneno	1,8214920 *	,1306842	,000
		FRACC30	1,2251745 *	,1306842	,000
		FRACC31	1,1028186 *	,1306842	,000
		FRACC32	,0547100	,1306842	1,000
		FRACC33	-,8369198 *	,1306842	,000
		FRACC37	1,7877924 *	,1306842	,000
		FRACC41	-,2234579	,1306842	,929
		FRACC43	-1,9764646 *	,1306842	,000
		FRACC44-9	,5106748 *	,1306842	,031
		FRACC46	,6390407 *	,1306842	,002
		FRACC47	1,5333366 *	,1306842	,000
		FRACC48	2,0071959 *	,1306842	,000
		FRACC27	1,4813099 *	,1306842	,000
		FRACC28	-2,1317303 *	,1306842	,000
		FRACC29	-9,2608446 *	,1306842	,000
	FRACC41	veneno	2,0449499 *	,1306842	,000
		FRACC30	1,4486324 *	,1306842	,000
		FRACC31	1,3262765 *	,1306842	,000
		FRACC32	,2781679	,1306842	,735
		FRACC33	-,6134619 *	,1306842	,004
		FRACC37	2,0112503 *	,1306842	,000
		FRACC39	,2234579	,1306842	,929
		FRACC43	-1,7530067 *	,1306842	,000
		FRACC44-9	,7341327 *	,1306842	,000
		FRACC46	,8624986 *	,1306842	,000
		FRACC47	1,7567944 *	,1306842	,000
		FRACC48	2,2306538 *	,1306842	,000
		FRACC27	1,7047678 *	,1306842	,000
		FRACC28	-1,9082725 *	,1306842	,000
		FRACC29	-9,0373867 *	,1306842	,000
	FRACC43	veneno	3,7979566 *	,1306842	,000
		FRACC30	3,2016391 *	,1306842	,000
		FRACC31	3,0792832 *	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC47	-,739044	,230132
		FRACC48	-,265185	,703992
		FRACC27	-,791071	,178106
		FRACC28	-4,404111	-3,434935
		FRACC29	-11,533225	-10,564049
	FRACC39	veneno	1,336904	2,306080
		FRACC30	,740586	1,709763
		FRACC31	,618231	1,587407
		FRACC32	-,429878	,539298
		FRACC33	-1,321508	-,352332
		FRACC37	1,303204	2,272380
		FRACC41	-,708046	,261130
		FRACC43	-2,461053	-1,491877
		FRACC44-9	,026087	,995263
		FRACC46	,154453	1,123629
		FRACC47	1,048749	2,017925
		FRACC48	1,522608	2,491784
		FRACC27	,996722	1,965898
		FRACC28	-2,616318	-1,647142
		FRACC29	-9,745433	-8,776257
	FRACC41	veneno	1,560362	2,529538
		FRACC30	,964044	1,933220
		FRACC31	,841688	1,810865
		FRACC32	-,206420	,762756
		FRACC33	-1,098050	-,128874
		FRACC37	1,526662	2,495838
		FRACC39	-,261130	,708046
		FRACC43	-2,237595	-1,268419
		FRACC44-9	,249545	1,218721
		FRACC46	,377911	1,347087
		FRACC47	1,272206	2,241382
		FRACC48	1,746066	2,715242
		FRACC27	1,220180	2,189356
		FRACC28	-2,392861	-1,423684
		FRACC29	-9,521975	-8,552799
	FRACC43	veneno	3,313369	4,282545
		FRACC30	2,717051	3,686227
		FRACC31	2,594695	3,563871

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC32	2,0311746*	,1306842	,000
		FRACC33	1,1395448*	,1306842	,000
		FRACC37	3,7642570*	,1306842	,000
		FRACC39	1,9764646*	,1306842	,000
		FRACC41	1,7530067*	,1306842	,000
		FRACC44-9	2,4871394*	,1306842	,000
		FRACC46	2,6155053*	,1306842	,000
		FRACC47	3,5098012*	,1306842	,000
		FRACC48	3,9836605*	,1306842	,000
		FRACC27	3,4577745*	,1306842	,000
		FRACC28	-,1552658	,1306842	,997
		FRACC29	-7,2843800*	,1306842	,000
	FRACC44-9	veneno	1,3108172*	,1306842	,000
		FRACC30	,7144997*	,1306842	,000
		FRACC31	,5921438*	,1306842	,006
		FRACC32	-,4559648	,1306842	,083
		FRACC33	-1,3475946*	,1306842	,000
		FRACC37	1,2771177*	,1306842	,000
		FRACC39	-,5106748*	,1306842	,031
		FRACC41	-,7341327*	,1306842	,000
		FRACC43	-2,4871394*	,1306842	,000
		FRACC46	,1283659	,1306842	1,000
		FRACC47	1,0226618*	,1306842	,000
		FRACC48	1,4965211*	,1306842	,000
		FRACC27	,9706352*	,1306842	,000
		FRACC28	-2,6424051*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,7715193*	,1306842	,000
	FRACC46	veneno	1,1824513*	,1306842	,000
		FRACC30	,5861338*	,1306842	,007
		FRACC31	,4637779	,1306842	,072
		FRACC32	-,5843307*	,1306842	,007
		FRACC33	-1,4759605*	,1306842	,000
		FRACC37	1,1487517*	,1306842	,000
		FRACC39	-,6390407*	,1306842	,002
		FRACC41	-,8624986*	,1306842	,000
		FRACC43	-2,6155053*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,1283659	,1306842	1,000
		FRACC47	,8942959*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC32	1,546587	2,515763
		FRACC33	,654957	1,624133
		FRACC37	3,279669	4,248845
		FRACC39	1,491877	2,461053
		FRACC41	1,268419	2,237595
		FRACC44-9	2,002551	2,971727
		FRACC46	2,130917	3,100093
		FRACC47	3,025213	3,994389
		FRACC48	3,499072	4,468249
		FRACC27	2,973186	3,942363
		FRACC28	-,639854	,329322
		FRACC29	-7,768968	-6,799792
	FRACC44-9	veneno	,826229	1,795405
		FRACC30	,229912	1,199088
		FRACC31	,107556	1,076732
		FRACC32	-,940553	,028623
		FRACC33	-1,832183	-,863007
		FRACC37	,792530	1,761706
		FRACC39	-,995263	-,026087
		FRACC41	-1,218721	-,249545
		FRACC43	-2,971727	-2,002551
		FRACC46	-,356222	,612954
		FRACC47	,538074	1,507250
		FRACC48	1,011933	1,981109
		FRACC27	,486047	1,455223
		FRACC28	-3,126993	-2,157817
		FRACC29	-10,256107	-9,286931
	FRACC46	veneno	,697863	1,667039
		FRACC30	,101546	1,070722
		FRACC31	-,020810	,948366
		FRACC32	-1,068919	-,099743
		FRACC33	-1,960549	-,991372
		FRACC37	,664164	1,633340
		FRACC39	-1,123629	-,154453
		FRACC41	-1,347087	-,377911
		FRACC43	-3,100093	-2,130917
		FRACC44-9	-,612954	,356222
		FRACC47	,409708	1,378884

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC48	1,3681552*	,1306842	,000
		FRACC27	,8422692*	,1306842	,000
		FRACC28	-2,7707710*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,8998852*	,1306842	,000
	FRACC47	veneno	,2881554	,1306842	,688
		FRACC30	-,3081621	,1306842	,588
		FRACC31	-,4305180	,1306842	,126
		FRACC32	-1,4786266*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,3702564*	,1306842	,000
		FRACC37	,2544559	,1306842	,835
		FRACC39	-1,5333366*	,1306842	,000
		FRACC41	-1,7567944*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,5098012*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-1,0226618*	,1306842	,000
		FRACC46	-,8942959*	,1306842	,000
		FRACC48	,4738593	,1306842	,061
		FRACC27	-,0520266	,1306842	1,000
		FRACC28	-3,6650669*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,7941811*	,1306842	,000
	FRACC48	veneno	-,1857039	,1306842	,984
		FRACC30	-,7820214*	,1306842	,000
		FRACC31	-,9043773*	,1306842	,000
		FRACC32	-1,9524859*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,8441157*	,1306842	,000
		FRACC37	-,2194035	,1306842	,938
		FRACC39	-2,0071959*	,1306842	,000
		FRACC41	-2,2306538*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,9836605*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-1,4965211*	,1306842	,000
		FRACC46	-1,3681552*	,1306842	,000
		FRACC47	-,4738593	,1306842	,061
		FRACC27	-,5258860*	,1306842	,023
		FRACC28	-4,1389262*	,1306842	,000
		FRACC29	-11,2680405*	,1306842	,000
	FRACC27	veneno	,3401821	,1306842	,430
		FRACC30	-,2561354	,1306842	,829
		FRACC31	-,3784913	,1306842	,270
		FRACC32	-1,4266000*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC48	,883567	1,852743
		FRACC27	,357681	1,326857
		FRACC28	-3,255359	-2,286183
		FRACC29	-10,384473	-9,415297
	FRACC47	veneno	-,196433	,772743
		FRACC30	-,792750	,176426
		FRACC31	-,915106	,054070
		FRACC32	-1,963215	-,994039
		FRACC33	-2,854844	-1,885668
		FRACC37	-,230132	,739044
		FRACC39	-2,017925	-1,048749
		FRACC41	-2,241382	-1,272206
		FRACC43	-3,994389	-3,025213
		FRACC44-9	-1,507250	-,538074
		FRACC46	-1,378884	-,409708
		FRACC48	-,010729	,958447
		FRACC27	-,536615	,432561
		FRACC28	-4,149655	-3,180479
		FRACC29	-11,278769	-10,309593
	FRACC48	veneno	-,670292	,298884
		FRACC30	-1,266609	-,297433
		FRACC31	-1,388965	-,419789
		FRACC32	-2,437074	-1,467898
		FRACC33	-3,328704	-2,359528
		FRACC37	-,703992	,265185
		FRACC39	-2,491784	-1,522608
		FRACC41	-2,715242	-1,746066
		FRACC43	-4,468249	-3,499072
		FRACC44-9	-1,981109	-1,011933
		FRACC46	-1,852743	-,883567
		FRACC47	-,958447	,010729
		FRACC27	-1,010474	-,041298
		FRACC28	-4,623514	-3,654338
		FRACC29	-11,752629	-10,783452
	FRACC27	veneno	-,144406	,824770
		FRACC30	-,740723	,228453
		FRACC31	-,863079	,106097
		FRACC32	-1,911188	-,942012

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC33	-2,3182298*	,1306842	,000
		FRACC37	,3064825	,1306842	,597
		FRACC39	-1,4813099*	,1306842	,000
		FRACC41	-1,7047678*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,4577745*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,9706352*	,1306842	,000
		FRACC46	-,8422692*	,1306842	,000
		FRACC47	,0520266	,1306842	1,000
		FRACC48	,5258860*	,1306842	,023
		FRACC28	-3,6130403*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,7421545*	,1306842	,000
	FRACC28	veneno	3,9532223*	,1306842	,000
		FRACC30	3,3569049*	,1306842	,000
		FRACC31	3,2345489*	,1306842	,000
		FRACC32	2,1864403*	,1306842	,000
		FRACC33	1,2948105*	,1306842	,000
		FRACC37	3,9195228*	,1306842	,000
		FRACC39	2,1317303*	,1306842	,000
		FRACC41	1,9082725*	,1306842	,000
		FRACC43	,1552658	,1306842	,997
		FRACC44-9	2,6424051*	,1306842	,000
		FRACC46	2,7707710*	,1306842	,000
		FRACC47	3,6650669*	,1306842	,000
		FRACC48	4,1389262*	,1306842	,000
		FRACC27	3,6130403*	,1306842	,000
		FRACC29	-7,1291142*	,1306842	,000
	FRACC29	veneno	11,0823366*	,1306842	,000
		FRACC30	10,4860191*	,1306842	,000
		FRACC31	10,3636632*	,1306842	,000
		FRACC32	9,3155545*	,1306842	,000
		FRACC33	8,4239247*	,1306842	,000
		FRACC37	11,0486370*	,1306842	,000
		FRACC39	9,2608446*	,1306842	,000
		FRACC41	9,0373867*	,1306842	,000
		FRACC43	7,2843800*	,1306842	,000
		FRACC44-9	9,7715193*	,1306842	,000
		FRACC46	9,8998852*	,1306842	,000
		FRACC47	10,7941811*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC33	-2,802818	-1,833642
		FRACC37	-,178106	,791071
		FRACC39	-1,965898	-,996722
		FRACC41	-2,189356	-1,220180
		FRACC43	-3,942363	-2,973186
		FRACC44-9	-1,455223	-,486047
		FRACC46	-1,326857	-,357681
		FRACC47	-,432561	,536615
		FRACC48	,041298	1,010474
		FRACC28	-4,097628	-3,128452
		FRACC29	-11,226743	-10,257566
	FRACC28	veneno	3,468634	4,437810
		FRACC30	2,872317	3,841493
		FRACC31	2,749961	3,719137
		FRACC32	1,701852	2,671028
		FRACC33	,810222	1,779399
		FRACC37	3,434935	4,404111
		FRACC39	1,647142	2,616318
		FRACC41	1,423684	2,392861
		FRACC43	-,329322	,639854
		FRACC44-9	2,157817	3,126993
		FRACC46	2,286183	3,255359
		FRACC47	3,180479	4,149655
		FRACC48	3,654338	4,623514
		FRACC27	3,128452	4,097628
		FRACC29	-7,613702	-6,644526
	FRACC29	veneno	10,597749	11,566925
		FRACC30	10,001431	10,970607
		FRACC31	9,879075	10,848251
		FRACC32	8,830966	9,800143
		FRACC33	7,939337	8,908513
		FRACC37	10,564049	11,533225
		FRACC39	8,776257	9,745433
		FRACC41	8,552799	9,521975
		FRACC43	6,799792	7,768968
		FRACC44-9	9,286931	10,256107
		FRACC46	9,415297	10,384473
		FRACC47	10,309593	11,278769

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC48	11,2680405*	,1306842	,000
		FRACC27	10,7421545*	,1306842	,000
		FRACC28	7,1291142*	,1306842	,000
Scheffe	veneno	FRACC30	-,5963175	,1306842	,212
		FRACC31	-,7186734*	,1306842	,047
		FRACC32	-1,7667820*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,6584118*	,1306842	,000
		FRACC37	-,0336996	,1306842	1,000
		FRACC39	-1,8214920*	,1306842	,000
		FRACC41	-2,0449499*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,7979566*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-1,3108172*	,1306842	,000
		FRACC46	-1,1824513*	,1306842	,000
		FRACC47	-,2881554	,1306842	,988
		FRACC48	,1857039	,1306842	1,000
		FRACC27	-,3401821	,1306842	,948
		FRACC28	-3,9532223*	,1306842	,000
		FRACC29	-11,0823366*	,1306842	,000
	FRACC30	veneno	,5963175	,1306842	,212
		FRACC31	-,1223559	,1306842	1,000
		FRACC32	-1,1704645*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,0620943*	,1306842	,000
		FRACC37	,5626179	,1306842	,297
		FRACC39	-1,2251745*	,1306842	,000
		FRACC41	-1,4486324*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,2016391*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,7144997*	,1306842	,050
		FRACC46	-,5861338	,1306842	,236
		FRACC47	,3081621	,1306842	,978
		FRACC48	,7820214*	,1306842	,019
		FRACC27	,2561354	,1306842	,996
		FRACC28	-3,3569049*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,4860191*	,1306842	,000
	FRACC31	veneno	,7186734*	,1306842	,047
		FRACC30	,1223559	,1306842	1,000
		FRACC32	-1,0481086*	,1306842	,000
		FRACC33	-1,9397384*	,1306842	,000
		FRACC37	,6849738	,1306842	,074

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC48	10,783452	11,752629
		FRACC27	10,257566	11,226743
		FRACC28	6,644526	7,613702
Scheffe	veneno	FRACC30	-1,310669	,118034
		FRACC31	-1,433025	-,004322
		FRACC32	-2,481134	-1,052430
		FRACC33	-3,372764	-1,944060
		FRACC37	-,748051	,680652
		FRACC39	-2,535844	-1,107140
		FRACC41	-2,759302	-1,330598
		FRACC43	-4,512308	-3,083605
		FRACC44-9	-2,025169	-,596465
		FRACC46	-1,896803	-,468099
		FRACC47	-1,002507	,426196
		FRACC48	-,528648	,900056
		FRACC27	-1,054534	,374170
		FRACC28	-4,667574	-3,238871
		FRACC29	-11,796688	-10,367985
	FRACC30	veneno	-,118034	1,310669
		FRACC31	-,836708	,591996
		FRACC32	-1,884816	-,456113
		FRACC33	-2,776446	-1,347743
		FRACC37	-,151734	1,276970
		FRACC39	-1,939526	-,510823
		FRACC41	-2,162984	-,734281
		FRACC43	-3,915991	-2,487287
		FRACC44-9	-1,428852	-,000148
		FRACC46	-1,300486	,128218
		FRACC47	-,406190	1,022514
		FRACC48	,067670	1,496373
		FRACC27	-,458216	,970487
		FRACC28	-4,071257	-2,642553
		FRACC29	-11,200371	-9,771667
	FRACC31	veneno	,004322	1,433025
		FRACC30	-,591996	,836708
		FRACC32	-1,762460	-,333757
		FRACC33	-2,654090	-1,225387
		FRACC37	-,029378	1,399326

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC39	-1,1028186*	,1306842	,000
		FRACC41	-1,3262765*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,0792832*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,5921438	,1306842	,221
		FRACC46	-,4637779	,1306842	,630
		FRACC47	,4305180	,1306842	,744
		FRACC48	,9043773*	,1306842	,003
		FRACC27	,3784913	,1306842	,884
		FRACC28	-3,2345489*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,3636632*	,1306842	,000
	FRACC32	veneno	1,7667820*	,1306842	,000
		FRACC30	1,1704645*	,1306842	,000
		FRACC31	1,0481086*	,1306842	,000
		FRACC33	-,8916298*	,1306842	,003
		FRACC37	1,7330825*	,1306842	,000
		FRACC39	-,0547100	,1306842	1,000
		FRACC41	-,2781679	,1306842	,992
		FRACC43	-2,0311746*	,1306842	,000
		FRACC44-9	,4559648	,1306842	,658
		FRACC46	,5843307	,1306842	,240
		FRACC47	1,4786266*	,1306842	,000
		FRACC48	1,9524859*	,1306842	,000
		FRACC27	1,4266000*	,1306842	,000
		FRACC28	-2,1864403*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,3155545*	,1306842	,000
	FRACC33	veneno	2,6584118*	,1306842	,000
		FRACC30	2,0620943*	,1306842	,000
		FRACC31	1,9397384*	,1306842	,000
		FRACC32	,8916298*	,1306842	,003
		FRACC37	2,6247123*	,1306842	,000
		FRACC39	,8369198*	,1306842	,008
		FRACC41	,6134619	,1306842	,176
		FRACC43	-1,1395448*	,1306842	,000
		FRACC44-9	1,3475946*	,1306842	,000
		FRACC46	1,4759605*	,1306842	,000
		FRACC47	2,3702564*	,1306842	,000
		FRACC48	2,8441157*	,1306842	,000
		FRACC27	2,3182298*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC39	-1,817170	-,388467
		FRACC41	-2,040628	-,611925
		FRACC43	-3,793635	-2,364931
		FRACC44-9	-1,306496	,122208
		FRACC46	-1,178130	,250574
		FRACC47	-,283834	1,144870
		FRACC48	,190025	1,618729
		FRACC27	-,335861	1,092843
		FRACC28	-3,948901	-2,520197
		FRACC29	-11,078015	-9,649311
	FRACC32	veneno	1,052430	2,481134
		FRACC30	,456113	1,884816
		FRACC31	,333757	1,762460
		FRACC33	-1,605982	-,177278
		FRACC37	1,018731	2,447434
		FRACC39	-,769062	,659642
		FRACC41	-,992520	,436184
		FRACC43	-2,745526	-1,316823
		FRACC44-9	-,258387	1,170317
		FRACC46	-,130021	1,298683
		FRACC47	,764275	2,192978
		FRACC48	1,238134	2,666838
		FRACC27	,712248	2,140952
		FRACC28	-2,900792	-1,472088
		FRACC29	-10,029906	-8,601203
	FRACC33	veneno	1,944060	3,372764
		FRACC30	1,347743	2,776446
		FRACC31	1,225387	2,654090
		FRACC32	,177278	1,605982
		FRACC37	1,910360	3,339064
		FRACC39	,122568	1,551272
		FRACC41	-,100890	1,327814
		FRACC43	-1,853897	-,425193
		FRACC44-9	,633243	2,061946
		FRACC46	,761609	2,190312
		FRACC47	1,655905	3,084608
		FRACC48	2,129764	3,558468
		FRACC27	1,603878	3,032582

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC28	-1,2948105*	,1306842	,000
		FRACC29	-8,4239247*	,1306842	,000
	FRACC37	veneno	,0336996	,1306842	1,000
		FRACC30	-,5626179	,1306842	,297
		FRACC31	-,6849738	,1306842	,074
		FRACC32	-1,7330825*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,6247123*	,1306842	,000
		FRACC39	-1,7877924*	,1306842	,000
		FRACC41	-2,0112503*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,7642570*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-1,2771177*	,1306842	,000
		FRACC46	-1,1487517*	,1306842	,000
		FRACC47	-,2544559	,1306842	,997
		FRACC48	,2194035	,1306842	,999
		FRACC27	-,3064825	,1306842	,979
		FRACC28	-3,9195228*	,1306842	,000
		FRACC29	-11,0486370*	,1306842	,000
	FRACC39	veneno	1,8214920*	,1306842	,000
		FRACC30	1,2251745*	,1306842	,000
		FRACC31	1,1028186*	,1306842	,000
		FRACC32	,0547100	,1306842	1,000
		FRACC33	-,8369198*	,1306842	,008
		FRACC37	1,7877924*	,1306842	,000
		FRACC41	-,2234579	,1306842	,999
		FRACC43	-1,9764646*	,1306842	,000
		FRACC44-9	,5106748	,1306842	,463
		FRACC46	,6390407	,1306842	,131
		FRACC47	1,5333366*	,1306842	,000
		FRACC48	2,0071959*	,1306842	,000
		FRACC27	1,4813099*	,1306842	,000
		FRACC28	-2,1317303*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,2608446*	,1306842	,000
	FRACC41	veneno	2,0449499*	,1306842	,000
		FRACC30	1,4486324*	,1306842	,000
		FRACC31	1,3262765*	,1306842	,000
		FRACC32	,2781679	,1306842	,992
		FRACC33	-,6134619	,1306842	,176
		FRACC37	2,0112503*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC28	-2,009162	-,580459
		FRACC29	-9,138277	-7,709573
	FRACC37	veneno	-,680652	,748051
		FRACC30	-1,276970	,151734
		FRACC31	-1,399326	,029378
		FRACC32	-2,447434	-1,018731
		FRACC33	-3,339064	-1,910360
		FRACC39	-2,502144	-1,073441
		FRACC41	-2,725602	-1,296898
		FRACC43	-4,478609	-3,049905
		FRACC44-9	-1,991469	-,562766
		FRACC46	-1,863104	-,434400
		FRACC47	-,968808	,459896
		FRACC48	-,494948	,933755
		FRACC27	-1,020834	,407869
		FRACC28	-4,633875	-3,205171
		FRACC29	-11,762989	-10,334285
	FRACC39	veneno	1,107140	2,535844
		FRACC30	,510823	1,939526
		FRACC31	,388467	1,817170
		FRACC32	-,659642	,769062
		FRACC33	-1,551272	-,122568
		FRACC37	1,073441	2,502144
		FRACC41	-,937810	,490894
		FRACC43	-2,690816	-1,262113
		FRACC44-9	-,203677	1,225027
		FRACC46	-,075311	1,353393
		FRACC47	,818985	2,247688
		FRACC48	1,292844	2,721548
		FRACC27	,766958	2,195662
		FRACC28	-2,846082	-1,417379
		FRACC29	-9,975196	-8,546493
	FRACC41	veneno	1,330598	2,759302
		FRACC30	,734281	2,162984
		FRACC31	,611925	2,040628
		FRACC32	-,436184	,992520
		FRACC33	-1,327814	,100890
		FRACC37	1,296898	2,725602

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC39	,2234579	,1306842	,999
		FRACC43	-1,7530067*	,1306842	,000
		FRACC44-9	,7341327*	,1306842	,038
		FRACC46	,8624986*	,1306842	,006
		FRACC47	1,7567944*	,1306842	,000
		FRACC48	2,2306538*	,1306842	,000
		FRACC27	1,7047678*	,1306842	,000
		FRACC28	-1,9082725*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,0373867*	,1306842	,000
	FRACC43	veneno	3,7979566*	,1306842	,000
		FRACC30	3,2016391*	,1306842	,000
		FRACC31	3,0792832*	,1306842	,000
		FRACC32	2,0311746*	,1306842	,000
		FRACC33	1,1395448*	,1306842	,000
		FRACC37	3,7642570*	,1306842	,000
		FRACC39	1,9764646*	,1306842	,000
		FRACC41	1,7530067*	,1306842	,000
		FRACC44-9	2,4871394*	,1306842	,000
		FRACC46	2,6155053*	,1306842	,000
		FRACC47	3,5098012*	,1306842	,000
		FRACC48	3,9836605*	,1306842	,000
		FRACC27	3,4577745*	,1306842	,000
		FRACC28	-,1552658	,1306842	1,000
		FRACC29	-7,2843800*	,1306842	,000
	FRACC44-9	veneno	1,3108172*	,1306842	,000
		FRACC30	,7144997*	,1306842	,050

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC39	-,490894	,937810
		FRACC43	-2,467359	-1,038655
		FRACC44-9	,019781	1,448484
		FRACC46	,148147	1,576850
		FRACC47	1,042443	2,471146
		FRACC48	1,516302	2,945006
		FRACC27	,990416	2,419120
		FRACC28	-2,622624	-1,193921
		FRACC29	-9,751739	-8,323035
	FRACC43	veneno	3,083605	4,512308
		FRACC30	2,487287	3,915991
		FRACC31	2,364931	3,793635
		FRACC32	1,316823	2,745526
		FRACC33	,425193	1,853897
		FRACC37	3,049905	4,478609
		FRACC39	1,262113	2,690816
		FRACC41	1,038655	2,467359
		FRACC44-9	1,772788	3,201491
		FRACC46	1,901153	3,329857
		FRACC47	2,795449	4,224153
		FRACC48	3,269309	4,698012
		FRACC27	2,743423	4,172126
		FRACC28	-,869618	,559086
		FRACC29	-7,998732	-6,570028
	FRACC44-9	veneno	,596465	2,025169
		FRACC30	,000148	1,428852

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC31	,5921438	,1306842	,221
		FRACC32	-,4559648	,1306842	,658
		FRACC33	-1,3475946*	,1306842	,000
		FRACC37	1,2771177*	,1306842	,000
		FRACC39	-,5106748	,1306842	,463
		FRACC41	-,7341327*	,1306842	,038
		FRACC43	-2,4871394*	,1306842	,000
		FRACC46	,1283659	,1306842	1,000
		FRACC47	1,0226618*	,1306842	,000
		FRACC48	1,4965211*	,1306842	,000
		FRACC27	,9706352*	,1306842	,001
		FRACC28	-2,6424051*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,7715193*	,1306842	,000
	FRACC46	veneno	1,1824513*	,1306842	,000
		FRACC30	,5861338	,1306842	,236
		FRACC31	,4637779	,1306842	,630
		FRACC32	-,5843307	,1306842	,240
		FRACC33	-1,4759605*	,1306842	,000
		FRACC37	1,1487517*	,1306842	,000
		FRACC39	-,6390407	,1306842	,131
		FRACC41	-,8624986*	,1306842	,006
		FRACC43	-2,6155053*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,1283659	,1306842	1,000
		FRACC47	,8942959*	,1306842	,003
		FRACC48	1,3681552*	,1306842	,000
		FRACC27	,8422692*	,1306842	,008
		FRACC28	-2,7707710*	,1306842	,000
		FRACC29	-9,8998852*	,1306842	,000
	FRACC47	veneno	,2881554	,1306842	,988
		FRACC30	-,3081621	,1306842	,978
		FRACC31	-,4305180	,1306842	,744
		FRACC32	-1,4786266*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,3702564*	,1306842	,000
		FRACC37	,2544559	,1306842	,997
		FRACC39	-1,5333366*	,1306842	,000
		FRACC41	-1,7567944*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,5098012*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-1,0226618*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC31	-,122208	1,306496
		FRACC32	-1,170317	,258387
		FRACC33	-2,061946	-,633243
		FRACC37	,562766	1,991469
		FRACC39	-1,225027	,203677
		FRACC41	-1,448484	-,019781
		FRACC43	-3,201491	-1,772788
		FRACC46	-,585986	,842718
		FRACC47	,308310	1,737014
		FRACC48	,782169	2,210873
		FRACC27	,256283	1,684987
		FRACC28	-3,356757	-1,928053
		FRACC29	-10,485871	-9,057168
	FRACC46	veneno	,468099	1,896803
		FRACC30	-,128218	1,300486
		FRACC31	-,250574	1,178130
		FRACC32	-1,298683	,130021
		FRACC33	-2,190312	-,761609
		FRACC37	,434400	1,863104
		FRACC39	-1,353393	,075311
		FRACC41	-1,576850	-,148147
		FRACC43	-3,329857	-1,901153
		FRACC44-9	-,842718	,585986
		FRACC47	,179944	1,608648
		FRACC48	,653803	2,082507
		FRACC27	,127917	1,556621
		FRACC28	-3,485123	-2,056419
		FRACC29	-10,614237	-9,185533
	FRACC47	veneno	-,426196	1,002507
		FRACC30	-1,022514	,406190
		FRACC31	-1,144870	,283834
		FRACC32	-2,192978	-,764275
		FRACC33	-3,084608	-1,655905
		FRACC37	-,459896	,968808
		FRACC39	-2,247688	-,818985
		FRACC41	-2,471146	-1,042443
		FRACC43	-4,224153	-2,795449
		FRACC44-9	-1,737014	-,308310

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC46	-,8942959*	,1306842	,003
		FRACC48	,4738593	,1306842	,594
		FRACC27	-,0520266	,1306842	1,000
		FRACC28	-3,6650669*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,7941811*	,1306842	,000
	FRACC48	veneno	-,1857039	,1306842	1,000
		FRACC30	-,7820214*	,1306842	,019
		FRACC31	-,9043773*	,1306842	,003
		FRACC32	-1,9524859*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,8441157*	,1306842	,000
		FRACC37	-,2194035	,1306842	,999
		FRACC39	-2,0071959*	,1306842	,000
		FRACC41	-2,2306538*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,9836605*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-1,4965211*	,1306842	,000
		FRACC46	-1,3681552*	,1306842	,000
		FRACC47	-,4738593	,1306842	,594
		FRACC27	-,5258860	,1306842	,411
		FRACC28	-4,1389262*	,1306842	,000
		FRACC29	-11,2680405*	,1306842	,000
	FRACC27	veneno	,3401821	,1306842	,948
		FRACC30	-,2561354	,1306842	,996
		FRACC31	-,3784913	,1306842	,884
		FRACC32	-1,4266000*	,1306842	,000
		FRACC33	-2,3182298*	,1306842	,000
		FRACC37	,3064825	,1306842	,979
		FRACC39	-1,4813099*	,1306842	,000
		FRACC41	-1,7047678*	,1306842	,000
		FRACC43	-3,4577745*	,1306842	,000
		FRACC44-9	-,9706352*	,1306842	,001
		FRACC46	-,8422692*	,1306842	,008
		FRACC47	,0520266	,1306842	1,000
		FRACC48	,5258860	,1306842	,411
		FRACC28	-3,6130403*	,1306842	,000
		FRACC29	-10,7421545*	,1306842	,000
	FRACC28	veneno	3,9532223*	,1306842	,000
		FRACC30	3,3569049*	,1306842	,000
		FRACC31	3,2345489*	,1306842	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC46	-1,608648	-,179944
		FRACC48	-,240492	1,188211
		FRACC27	-,766378	,662325
		FRACC28	-4,379419	-2,950715
		FRACC29	-11,508533	-10,079829
	FRACC48	veneno	-,900056	,528648
		FRACC30	-1,496373	-,067670
		FRACC31	-1,618729	-,190025
		FRACC32	-2,666838	-1,238134
		FRACC33	-3,558468	-2,129764
		FRACC37	-,933755	,494948
		FRACC39	-2,721548	-1,292844
		FRACC41	-2,945006	-1,516302
		FRACC43	-4,698012	-3,269309
		FRACC44-9	-2,210873	-,782169
		FRACC46	-2,082507	-,653803
		FRACC47	-1,188211	,240492
		FRACC27	-1,240238	,188466
		FRACC28	-4,853278	-3,424574
		FRACC29	-11,982392	-10,553689
	FRACC27	veneno	-,374170	1,054534
		FRACC30	-,970487	,458216
		FRACC31	-1,092843	,335861
		FRACC32	-2,140952	-,712248
		FRACC33	-3,032582	-1,603878
		FRACC37	-,407869	1,020834
		FRACC39	-2,195662	-,766958
		FRACC41	-2,419120	-,990416
		FRACC43	-4,172126	-2,743423
		FRACC44-9	-1,684987	-,256283
		FRACC46	-1,556621	-,127917
		FRACC47	-,662325	,766378
		FRACC48	-,188466	1,240238
		FRACC28	-4,327392	-2,898688
		FRACC29	-11,456506	-10,027803
	FRACC28	veneno	3,238871	4,667574
		FRACC30	2,642553	4,071257
		FRACC31	2,520197	3,948901

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	
		FRACC32	2,1864403*	,1306842	,000	
		FRACC33	1,2948105*	,1306842	,000	
		FRACC37	3,9195228*	,1306842	,000	
		FRACC39	2,1317303*	,1306842	,000	
		FRACC41	1,9082725*	,1306842	,000	
		FRACC43	,1552658	,1306842	1,000	
		FRACC44-9	2,6424051*	,1306842	,000	
		FRACC46	2,7707710*	,1306842	,000	
		FRACC47	3,6650669*	,1306842	,000	
		FRACC48	4,1389262*	,1306842	,000	
		FRACC27	3,6130403*	,1306842	,000	
		FRACC29	-7,1291142*	,1306842	,000	
	FRACC29	veneno	11,0823366*	,1306842	,000	
		FRACC30	10,4860191*	,1306842	,000	
		FRACC31	10,3636632*	,1306842	,000	
		FRACC32	9,3155545*	,1306842	,000	
		FRACC33	8,4239247*	,1306842	,000	
		FRACC37	11,0486370*	,1306842	,000	
		FRACC39	9,2608446*	,1306842	,000	
		FRACC41	9,0373867*	,1306842	,000	
		FRACC43	7,2843800*	,1306842	,000	
		FRACC44-9	9,7715193*	,1306842	,000	
		FRACC46	9,8998852*	,1306842	,000	
		FRACC47	10,7941811*	,1306842	,000	
		FRACC48	11,2680405*	,1306842	,000	
		FRACC27	10,7421545*	,1306842	,000	
		FRACC28	7,1291142*	,1306842	,000	
raizneurona	HSD Tukey	veneno	FRACC30	-3,2686841*	,1801594	,000
			FRACC31	-1,0367798*	,1801594	,000
			FRACC32	-6,9254104*	,1801594	,000
			FRACC33	-,9370894*	,1801594	,001
			FRACC37	-,6844525*	,1801594	,040
			FRACC39	-1,5330822*	,1801594	,000
			FRACC41	-2,0053829*	,1801594	,000
			FRACC43	-1,9676702*	,1801594	,000
			FRACC44-9	-4,7739047*	,1801594	,000
			FRACC46	-5,9056939*	,1801594	,000
			FRACC47	-20,4787346*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente			95% de intervalo de confianza		
			Límite inferior	Límite superior	
	(I) fraccion	(J) fraccion			
		FRACC32	1,472088	2,900792	
		FRACC33	,580459	2,009162	
		FRACC37	3,205171	4,633875	
		FRACC39	1,417379	2,846082	
		FRACC41	1,193921	2,622624	
		FRACC43	-,559086	,869618	
		FRACC44-9	1,928053	3,356757	
		FRACC46	2,056419	3,485123	
		FRACC47	2,950715	4,379419	
		FRACC48	3,424574	4,853278	
		FRACC27	2,898688	4,327392	
		FRACC29	-7,843466	-6,414762	
	FRACC29	veneno	10,367985	11,796688	
		FRACC30	9,771667	11,200371	
		FRACC31	9,649311	11,078015	
		FRACC32	8,601203	10,029906	
		FRACC33	7,709573	9,138277	
		FRACC37	10,334285	11,762989	
		FRACC39	8,546493	9,975196	
		FRACC41	8,323035	9,751739	
		FRACC43	6,570028	7,998732	
		FRACC44-9	9,057168	10,485871	
		FRACC46	9,185533	10,614237	
		FRACC47	10,079829	11,508533	
		FRACC48	10,553689	11,982392	
		FRACC27	10,027803	11,456506	
		FRACC28	6,414762	7,843466	
raizneurona	HSD Tukey	veneno	FRACC30	-3,936731	-2,600638
			FRACC31	-1,704826	-,368733
			FRACC32	-7,593457	-6,257364
			FRACC33	-1,605136	-,269043
			FRACC37	-1,352499	-,016406
			FRACC39	-2,201129	-,865036
			FRACC41	-2,673429	-1,337336
			FRACC43	-2,635717	-1,299624
			FRACC44-9	-5,441951	-4,105858
			FRACC46	-6,573740	-5,237647
			FRACC47	-21,146781	-19,810688

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC48	-2,8850946*	,1801594	,000
		FRACC27	-20,0864941*	,1801594	,000
		FRACC28	-3,0982134*	,1801594	,000
		FRACC29	-2,7999935*	,1801594	,000
	FRACC30	veneno	3,2686841*	,1801594	,000
		FRACC31	2,2319044*	,1801594	,000
		FRACC32	-3,6567263*	,1801594	,000
		FRACC33	2,3315947*	,1801594	,000
		FRACC37	2,5842316*	,1801594	,000
		FRACC39	1,7356019*	,1801594	,000
		FRACC41	1,2633013*	,1801594	,000
		FRACC43	1,3010139*	,1801594	,000
		FRACC44-9	-1,5052206*	,1801594	,000
		FRACC46	-2,6370098*	,1801594	,000
		FRACC47	-17,2100505*	,1801594	,000
		FRACC48	,3835895	,1801594	,735
		FRACC27	-16,8178100*	,1801594	,000
		FRACC28	,1704707	,1801594	1,000
		FRACC29	,4686906	,1801594	,431
	FRACC31	veneno	1,0367798*	,1801594	,000
		FRACC30	-2,2319044*	,1801594	,000
		FRACC32	-5,8886306*	,1801594	,000
		FRACC33	,0996904	,1801594	1,000
		FRACC37	,3523272	,1801594	,831
		FRACC39	-,4963024	,1801594	,342
		FRACC41	-,9686031*	,1801594	,001
		FRACC43	-,9308904*	,1801594	,001
		FRACC44-9	-3,7371250*	,1801594	,000
		FRACC46	-4,8689141*	,1801594	,000
		FRACC47	-19,4419548*	,1801594	,000
		FRACC48	-1,8483148*	,1801594	,000
		FRACC27	-19,0497143*	,1801594	,000
		FRACC28	-2,0614337*	,1801594	,000
		FRACC29	-1,7632137*	,1801594	,000
	FRACC32	veneno	6,9254104*	,1801594	,000
		FRACC30	3,6567263*	,1801594	,000
		FRACC31	5,8886306*	,1801594	,000
		FRACC33	5,9883210*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC48	-3,553141	-2,217048
		FRACC27	-20,754541	-19,418448
		FRACC28	-3,766260	-2,430167
		FRACC29	-3,468040	-2,131947
	FRACC30	veneno	2,600638	3,936731
		FRACC31	1,563858	2,899951
		FRACC32	-4,324773	-2,988680
		FRACC33	1,663548	2,999641
		FRACC37	1,916185	3,252278
		FRACC39	1,067555	2,403648
		FRACC41	,595255	1,931348
		FRACC43	,632967	1,969060
		FRACC44-9	-2,173267	-,837174
		FRACC46	-3,305056	-1,968963
		FRACC47	-17,878097	-16,542004
		FRACC48	-,284457	1,051636
		FRACC27	-17,485856	-16,149763
		FRACC28	-,497576	,838517
		FRACC29	-,199356	1,136737
	FRACC31	veneno	,368733	1,704826
		FRACC30	-2,899951	-1,563858
		FRACC32	-6,556677	-5,220584
		FRACC33	-,568356	,767737
		FRACC37	-,315719	1,020374
		FRACC39	-1,164349	,171744
		FRACC41	-1,636650	-,300557
		FRACC43	-1,598937	-,262844
		FRACC44-9	-4,405171	-3,069078
		FRACC46	-5,536961	-4,200868
		FRACC47	-20,110001	-18,773908
		FRACC48	-2,516361	-1,180268
		FRACC27	-19,717761	-18,381668
		FRACC28	-2,729480	-1,393387
		FRACC29	-2,431260	-1,095167
	FRACC32	veneno	6,257364	7,593457
		FRACC30	2,988680	4,324773
		FRACC31	5,220584	6,556677
		FRACC33	5,320274	6,656367

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC37	6,2409579*	,1801594	,000
		FRACC39	5,3923282*	,1801594	,000
		FRACC41	4,9200275*	,1801594	,000
		FRACC43	4,9577402*	,1801594	,000
		FRACC44-9	2,1515057*	,1801594	,000
		FRACC46	1,0197165*	,1801594	,000
		FRACC47	-13,5533242*	,1801594	,000
		FRACC48	4,0403158*	,1801594	,000
		FRACC27	-13,1610837*	,1801594	,000
		FRACC28	3,8271970*	,1801594	,000
		FRACC29	4,1254169*	,1801594	,000
	FRACC33	veneno	,9370894*	,1801594	,001
		FRACC30	-2,3315947*	,1801594	,000
		FRACC31	-,0996904	,1801594	1,000
		FRACC32	-5,9883210*	,1801594	,000
		FRACC37	,2526369	,1801594	,986
		FRACC39	-,5959928	,1801594	,122
		FRACC41	-1,0682935*	,1801594	,000
		FRACC43	-1,0305808*	,1801594	,000
		FRACC44-9	-3,8368153*	,1801594	,000
		FRACC46	-4,9686045*	,1801594	,000
		FRACC47	-19,5416452*	,1801594	,000
		FRACC48	-1,9480052*	,1801594	,000
		FRACC27	-19,1494047*	,1801594	,000
		FRACC28	-2,1611240*	,1801594	,000
		FRACC29	-1,8629041*	,1801594	,000
	FRACC37	veneno	,6844525*	,1801594	,040
		FRACC30	-2,5842316*	,1801594	,000
		FRACC31	-,3523272	,1801594	,831
		FRACC32	-6,2409579*	,1801594	,000
		FRACC33	-,2526369	,1801594	,986
		FRACC39	-,8486297*	,1801594	,004
		FRACC41	-1,3209304*	,1801594	,000
		FRACC43	-1,2832177*	,1801594	,000
		FRACC44-9	-4,0894522*	,1801594	,000
		FRACC46	-5,2212414*	,1801594	,000
		FRACC47	-19,7942821*	,1801594	,000
		FRACC48	-2,2006421*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC37	5,572911	6,909004
		FRACC39	4,724282	6,060375
		FRACC41	4,251981	5,588074
		FRACC43	4,289694	5,625787
		FRACC44-9	1,483459	2,819552
		FRACC46	,351670	1,687763
		FRACC47	-14,221371	-12,885278
		FRACC48	3,372269	4,708362
		FRACC27	-13,829130	-12,493037
		FRACC28	3,159150	4,495243
		FRACC29	3,457370	4,793463
	FRACC33	veneno	,269043	1,605136
		FRACC30	-2,999641	-1,663548
		FRACC31	-,767737	,568356
		FRACC32	-6,656367	-5,320274
		FRACC37	-,415410	,920683
		FRACC39	-1,264039	,072054
		FRACC41	-1,736340	-,400247
		FRACC43	-1,698627	-,362534
		FRACC44-9	-4,504862	-3,168769
		FRACC46	-5,636651	-4,300558
		FRACC47	-20,209692	-18,873599
		FRACC48	-2,616052	-1,279959
		FRACC27	-19,817451	-18,481358
		FRACC28	-2,829170	-1,493078
		FRACC29	-2,530951	-1,194858
	FRACC37	veneno	,016406	1,352499
		FRACC30	-3,252278	-1,916185
		FRACC31	-1,020374	,315719
		FRACC32	-6,909004	-5,572911
		FRACC33	-,920683	,415410
		FRACC39	-1,516676	-,180583
		FRACC41	-1,988977	-,652884
		FRACC43	-1,951264	-,615171
		FRACC44-9	-4,757499	-3,421406
		FRACC46	-5,889288	-4,553195
		FRACC47	-20,462329	-19,126236
		FRACC48	-2,868689	-1,532596

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC27	-19,4020416*	,1801594	,000
		FRACC28	-2,4137609*	,1801594	,000
		FRACC29	-2,1155410*	,1801594	,000
	FRACC39	veneno	1,5330822*	,1801594	,000
		FRACC30	-1,7356019*	,1801594	,000
		FRACC31	,4963024	,1801594	,342
		FRACC32	-5,3923282*	,1801594	,000
		FRACC33	,5959928	,1801594	,122
		FRACC37	,8486297*	,1801594	,004
		FRACC41	-,4723007	,1801594	,419
		FRACC43	-,4345880	,1801594	,552
		FRACC44-9	-3,2408225*	,1801594	,000
		FRACC46	-4,3726117*	,1801594	,000
		FRACC47	-18,9456524*	,1801594	,000
		FRACC48	-1,3520124*	,1801594	,000
		FRACC27	-18,5534119*	,1801594	,000
		FRACC28	-1,5651312*	,1801594	,000
		FRACC29	-1,2669113*	,1801594	,000
	FRACC41	veneno	2,0053829*	,1801594	,000
		FRACC30	-1,2633013*	,1801594	,000
		FRACC31	,9686031*	,1801594	,001
		FRACC32	-4,9200275*	,1801594	,000
		FRACC33	1,0682935*	,1801594	,000
		FRACC37	1,3209304*	,1801594	,000
		FRACC39	,4723007	,1801594	,419
		FRACC43	,0377127	,1801594	1,000
		FRACC44-9	-2,7685219*	,1801594	,000
		FRACC46	-3,9003110*	,1801594	,000
		FRACC47	-18,4733517*	,1801594	,000
		FRACC48	-,8797117*	,1801594	,002
		FRACC27	-18,0811112*	,1801594	,000
		FRACC28	-1,0928306*	,1801594	,000
		FRACC29	-,7946106*	,1801594	,009
	FRACC43	veneno	1,9676702*	,1801594	,000
		FRACC30	-1,3010139*	,1801594	,000
		FRACC31	,9308904*	,1801594	,001
		FRACC32	-4,9577402*	,1801594	,000
		FRACC33	1,0305808*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC27	-20,070088	-18,733995
		FRACC28	-3,081807	-1,745714
		FRACC29	-2,783587	-1,447494
	FRACC39	veneno	,865036	2,201129
		FRACC30	-2,403648	-1,067555
		FRACC31	-,171744	1,164349
		FRACC32	-6,060375	-4,724282
		FRACC33	-,072054	1,264039
		FRACC37	,180583	1,516676
		FRACC41	-1,140347	,195746
		FRACC43	-1,102634	,233458
		FRACC44-9	-3,908869	-2,572776
		FRACC46	-5,040658	-3,704565
		FRACC47	-19,613699	-18,277606
		FRACC48	-2,020059	-,683966
		FRACC27	-19,221458	-17,885365
		FRACC28	-2,233178	-,897085
		FRACC29	-1,934958	-,598865
	FRACC41	veneno	1,337336	2,673429
		FRACC30	-1,931348	-,595255
		FRACC31	,300557	1,636650
		FRACC32	-5,588074	-4,251981
		FRACC33	,400247	1,736340
		FRACC37	,652884	1,988977
		FRACC39	-,195746	1,140347
		FRACC43	-,630334	,705759
		FRACC44-9	-3,436568	-2,100475
		FRACC46	-4,568357	-3,232265
		FRACC47	-19,141398	-17,805305
		FRACC48	-1,547758	-,211665
		FRACC27	-18,749158	-17,413065
		FRACC28	-1,760877	-,424784
		FRACC29	-1,462657	-,126564
	FRACC43	veneno	1,299624	2,635717
		FRACC30	-1,969060	-,632967
		FRACC31	,262844	1,598937
		FRACC32	-5,625787	-4,289694
		FRACC33	,362534	1,698627

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC37	1,2832177*	,1801594	,000
		FRACC39	,4345880	,1801594	,552
		FRACC41	-,0377127	,1801594	1,000
		FRACC44-9	-2,8062345*	,1801594	,000
		FRACC46	-3,9380237*	,1801594	,000
		FRACC47	-18,5110644*	,1801594	,000
		FRACC48	-,9174244*	,1801594	,001
		FRACC27	-18,1188239*	,1801594	,000
		FRACC28	-1,1305432*	,1801594	,000
		FRACC29	-,8323233*	,1801594	,005
	FRACC44-9	veneno	4,7739047*	,1801594	,000
		FRACC30	1,5052206*	,1801594	,000
		FRACC31	3,7371250*	,1801594	,000
		FRACC32	-2,1515057*	,1801594	,000
		FRACC33	3,8368153*	,1801594	,000
		FRACC37	4,0894522*	,1801594	,000
		FRACC39	3,2408225*	,1801594	,000
		FRACC41	2,7685219*	,1801594	,000
		FRACC43	2,8062345*	,1801594	,000
		FRACC46	-1,1317892*	,1801594	,000
		FRACC47	-15,7048299*	,1801594	,000
		FRACC48	1,8888101*	,1801594	,000
		FRACC27	-15,3125894*	,1801594	,000
		FRACC28	1,6756913*	,1801594	,000
		FRACC29	1,9739112*	,1801594	,000
	FRACC46	veneno	5,9056939*	,1801594	,000
		FRACC30	2,6370098*	,1801594	,000
		FRACC31	4,8689141*	,1801594	,000
		FRACC32	-1,0197165*	,1801594	,000
		FRACC33	4,9686045*	,1801594	,000
		FRACC37	5,2212414*	,1801594	,000
		FRACC39	4,3726117*	,1801594	,000
		FRACC41	3,9003110*	,1801594	,000
		FRACC43	3,9380237*	,1801594	,000
		FRACC44-9	1,1317892*	,1801594	,000
		FRACC47	-14,5730407*	,1801594	,000
		FRACC48	3,0205993*	,1801594	,000
		FRACC27	-14,1808002*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC37	,615171	1,951264
		FRACC39	-,233458	1,102634
		FRACC41	-,705759	,630334
		FRACC44-9	-3,474281	-2,138188
		FRACC46	-4,606070	-3,269977
		FRACC47	-19,179111	-17,843018
		FRACC48	-1,585471	-,249378
		FRACC27	-18,786870	-17,450777
		FRACC28	-1,798590	-,462497
		FRACC29	-1,500370	-,164277
	FRACC44-9	veneno	4,105858	5,441951
		FRACC30	,837174	2,173267
		FRACC31	3,069078	4,405171
		FRACC32	-2,819552	-1,483459
		FRACC33	3,168769	4,504862
		FRACC37	3,421406	4,757499
		FRACC39	2,572776	3,908869
		FRACC41	2,100475	3,436568
		FRACC43	2,138188	3,474281
		FRACC46	-1,799836	-,463743
		FRACC47	-16,372876	-15,036783
		FRACC48	1,220764	2,556857
		FRACC27	-15,980636	-14,644543
		FRACC28	1,007645	2,343738
		FRACC29	1,305865	2,641958
	FRACC46	veneno	5,237647	6,573740
		FRACC30	1,968963	3,305056
		FRACC31	4,200868	5,536961
		FRACC32	-1,687763	-,351670
		FRACC33	4,300558	5,636651
		FRACC37	4,553195	5,889288
		FRACC39	3,704565	5,040658
		FRACC41	3,232265	4,568357
		FRACC43	3,269977	4,606070
		FRACC44-9	,463743	1,799836
		FRACC47	-15,241087	-13,904994
		FRACC48	2,352553	3,688646
		FRACC27	-14,848847	-13,512754

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC28	2,8074805*	,1801594	,000
		FRACC29	3,1057004*	,1801594	,000
	FRACC47	veneno	20,4787346*	,1801594	,000
		FRACC30	17,2100505*	,1801594	,000
		FRACC31	19,4419548*	,1801594	,000
		FRACC32	13,5533242*	,1801594	,000
		FRACC33	19,5416452*	,1801594	,000
		FRACC37	19,7942821*	,1801594	,000
		FRACC39	18,9456524*	,1801594	,000
		FRACC41	18,4733517*	,1801594	,000
		FRACC43	18,5110644*	,1801594	,000
		FRACC44-9	15,7048299*	,1801594	,000
		FRACC46	14,5730407*	,1801594	,000
		FRACC48	17,5936400*	,1801594	,000
		FRACC27	,3922405	,1801594	,705
		FRACC28	17,3805212*	,1801594	,000
		FRACC29	17,6787411*	,1801594	,000
	FRACC48	veneno	2,8850946*	,1801594	,000
		FRACC30	-,3835895	,1801594	,735
		FRACC31	1,8483148*	,1801594	,000
		FRACC32	-4,0403158*	,1801594	,000
		FRACC33	1,9480052*	,1801594	,000
		FRACC37	2,2006421*	,1801594	,000
		FRACC39	1,3520124*	,1801594	,000
		FRACC41	,8797117*	,1801594	,002
		FRACC43	,9174244*	,1801594	,001
		FRACC44-9	-1,8888101*	,1801594	,000
		FRACC46	-3,0205993*	,1801594	,000
		FRACC47	-17,5936400*	,1801594	,000
		FRACC27	-17,2013995*	,1801594	,000
		FRACC28	-,2131188	,1801594	,997
		FRACC29	,0851011	,1801594	1,000
	FRACC27	veneno	20,0864941*	,1801594	,000
		FRACC30	16,8178100*	,1801594	,000
		FRACC31	19,0497143*	,1801594	,000
		FRACC32	13,1610837*	,1801594	,000
		FRACC33	19,1494047*	,1801594	,000
		FRACC37	19,4020416*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC28	2,139434	3,475527
		FRACC29	2,437654	3,773747
	FRACC47	veneno	19,810688	21,146781
		FRACC30	16,542004	17,878097
		FRACC31	18,773908	20,110001
		FRACC32	12,885278	14,221371
		FRACC33	18,873599	20,209692
		FRACC37	19,126236	20,462329
		FRACC39	18,277606	19,613699
		FRACC41	17,805305	19,141398
		FRACC43	17,843018	19,179111
		FRACC44-9	15,036783	16,372876
		FRACC46	13,904994	15,241087
		FRACC48	16,925594	18,261686
		FRACC27	-,275806	1,060287
		FRACC28	16,712475	18,048568
		FRACC29	17,010695	18,346788
	FRACC48	veneno	2,217048	3,553141
		FRACC30	-1,051636	,284457
		FRACC31	1,180268	2,516361
		FRACC32	-4,708362	-3,372269
		FRACC33	1,279959	2,616052
		FRACC37	1,532596	2,868689
		FRACC39	,683966	2,020059
		FRACC41	,211665	1,547758
		FRACC43	,249378	1,585471
		FRACC44-9	-2,556857	-1,220764
		FRACC46	-3,688646	-2,352553
		FRACC47	-18,261686	-16,925594
		FRACC27	-17,869446	-16,533353
		FRACC28	-,881165	,454928
		FRACC29	-,582945	,753148
	FRACC27	veneno	19,418448	20,754541
		FRACC30	16,149763	17,485856
		FRACC31	18,381668	19,717761
		FRACC32	12,493037	13,829130
		FRACC33	18,481358	19,817451
		FRACC37	18,733995	20,070088

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC39	18,5534119*	,1801594	,000
		FRACC41	18,0811112*	,1801594	,000
		FRACC43	18,1188239*	,1801594	,000
		FRACC44-9	15,3125894*	,1801594	,000
		FRACC46	14,1808002*	,1801594	,000
		FRACC47	-,3922405	,1801594	,705
		FRACC48	17,2013995*	,1801594	,000
		FRACC28	16,9882807*	,1801594	,000
		FRACC29	17,2865006*	,1801594	,000
	FRACC28	veneno	3,0982134*	,1801594	,000
		FRACC30	-,1704707	,1801594	1,000
		FRACC31	2,0614337*	,1801594	,000
		FRACC32	-3,8271970*	,1801594	,000
		FRACC33	2,1611240*	,1801594	,000
		FRACC37	2,4137609*	,1801594	,000
		FRACC39	1,5651312*	,1801594	,000
		FRACC41	1,0928306*	,1801594	,000
		FRACC43	1,1305432*	,1801594	,000
		FRACC44-9	-1,6756913*	,1801594	,000
		FRACC46	-2,8074805*	,1801594	,000
		FRACC47	-17,3805212*	,1801594	,000
		FRACC48	,2131188	,1801594	,997
		FRACC27	-16,9882807*	,1801594	,000
		FRACC29	,2982199	,1801594	,944
	FRACC29	veneno	2,7999935*	,1801594	,000
		FRACC30	-,4686906	,1801594	,431

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC39	17,885365	19,221458
		FRACC41	17,413065	18,749158
		FRACC43	17,450777	18,786870
		FRACC44-9	14,644543	15,980636
		FRACC46	13,512754	14,848847
		FRACC47	-1,060287	,275806
		FRACC48	16,533353	17,869446
		FRACC28	16,320234	17,656327
		FRACC29	16,618454	17,954547
	FRACC28	veneno	2,430167	3,766260
		FRACC30	-,838517	,497576
		FRACC31	1,393387	2,729480
		FRACC32	-4,495243	-3,159150
		FRACC33	1,493078	2,829170
		FRACC37	1,745714	3,081807
		FRACC39	,897085	2,233178
		FRACC41	,424784	1,760877
		FRACC43	,462497	1,798590
		FRACC44-9	-2,343738	-1,007645
		FRACC46	-3,475527	-2,139434
		FRACC47	-18,048568	-16,712475
		FRACC48	-,454928	,881165
		FRACC27	-17,656327	-16,320234
		FRACC29	-,369827	,966266
	FRACC29	veneno	2,131947	3,468040
		FRACC30	-1,136737	,199356

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC31	1,7632137*	,1801594	,000
		FRACC32	-4,1254169*	,1801594	,000
		FRACC33	1,8629041*	,1801594	,000
		FRACC37	2,1155410*	,1801594	,000
		FRACC39	1,2669113*	,1801594	,000
		FRACC41	,7946106*	,1801594	,009
		FRACC43	,8323233*	,1801594	,005
		FRACC44-9	-1,9739112*	,1801594	,000
		FRACC46	-3,1057004*	,1801594	,000
		FRACC47	-17,6787411*	,1801594	,000
		FRACC48	-,0851011	,1801594	1,000
		FRACC27	-17,2865006*	,1801594	,000
		FRACC28	-,2982199	,1801594	,944
Scheffe	veneno	FRACC30	-3,2686841*	,1801594	,000
		FRACC31	-1,0367798*	,1801594	,029
		FRACC32	-6,9254104*	,1801594	,000
		FRACC33	-,9370894	,1801594	,079
		FRACC37	-,6844525	,1801594	,513
		FRACC39	-1,5330822*	,1801594	,000
		FRACC41	-2,0053829*	,1801594	,000
		FRACC43	-1,9676702*	,1801594	,000
		FRACC44-9	-4,7739047*	,1801594	,000
		FRACC46	-5,9056939*	,1801594	,000
		FRACC47	-20,4787346*	,1801594	,000
		FRACC48	-2,8850946*	,1801594	,000
		FRACC27	-20,0864941*	,1801594	,000
		FRACC28	-3,0982134*	,1801594	,000
		FRACC29	-2,7999935*	,1801594	,000
	FRACC30	veneno	3,2686841*	,1801594	,000
		FRACC31	2,2319044*	,1801594	,000
		FRACC32	-3,6567263*	,1801594	,000
		FRACC33	2,3315947*	,1801594	,000
		FRACC37	2,5842316*	,1801594	,000
		FRACC39	1,7356019*	,1801594	,000
		FRACC41	1,2633013*	,1801594	,002
		FRACC43	1,3010139*	,1801594	,002
		FRACC44-9	-1,5052206*	,1801594	,000
		FRACC46	-2,6370098*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC31	1,095167	2,431260
		FRACC32	-4,793463	-3,457370
		FRACC33	1,194858	2,530951
		FRACC37	1,447494	2,783587
		FRACC39	,598865	1,934958
		FRACC41	,126564	1,462657
		FRACC43	,164277	1,500370
		FRACC44-9	-2,641958	-1,305865
		FRACC46	-3,773747	-2,437654
		FRACC47	-18,346788	-17,010695
		FRACC48	-,753148	,582945
		FRACC27	-17,954547	-16,618454
		FRACC28	-,966266	,369827
Scheffe	veneno	FRACC30	-4,253480	-2,283888
		FRACC31	-2,021575	-,051984
		FRACC32	-7,910206	-5,940615
		FRACC33	-1,921885	,047706
		FRACC37	-1,669248	,300343
		FRACC39	-2,517878	-,548287
		FRACC41	-2,990179	-1,020587
		FRACC43	-2,952466	-,982875
		FRACC44-9	-5,758700	-3,789109
		FRACC46	-6,890490	-4,920898
		FRACC47	-21,463530	-19,493939
		FRACC48	-3,869890	-1,900299
		FRACC27	-21,071290	-19,101698
		FRACC28	-4,083009	-2,113418
		FRACC29	-3,784789	-1,815198
	FRACC30	veneno	2,283888	4,253480
		FRACC31	1,247109	3,216700
		FRACC32	-4,641522	-2,671931
		FRACC33	1,346799	3,316390
		FRACC37	1,599436	3,569027
		FRACC39	,750806	2,720398
		FRACC41	,278506	2,248097
		FRACC43	,316218	2,285810
		FRACC44-9	-2,490016	-,520425
		FRACC46	-3,621805	-1,652214

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC47	-17,2100505*	,1801594	,000
		FRACC48	,3835895	,1801594	,992
		FRACC27	-16,8178100*	,1801594	,000
		FRACC28	,1704707	,1801594	1,000
		FRACC29	,4686906	,1801594	,948
	FRACC31	veneno	1,0367798*	,1801594	,029
		FRACC30	-2,2319044*	,1801594	,000
		FRACC32	-5,8886306*	,1801594	,000
		FRACC33	,0996904	,1801594	1,000
		FRACC37	,3523272	,1801594	,997
		FRACC39	-,4963024	,1801594	,919
		FRACC41	-,9686031	,1801594	,059
		FRACC43	-,9308904	,1801594	,084
		FRACC44-9	-3,7371250*	,1801594	,000
		FRACC46	-4,8689141*	,1801594	,000
		FRACC47	-19,4419548*	,1801594	,000
		FRACC48	-1,8483148*	,1801594	,000
		FRACC27	-19,0497143*	,1801594	,000
		FRACC28	-2,0614337*	,1801594	,000
		FRACC29	-1,7632137*	,1801594	,000
	FRACC32	veneno	6,9254104*	,1801594	,000
		FRACC30	3,6567263*	,1801594	,000
		FRACC31	5,8886306*	,1801594	,000
		FRACC33	5,9883210*	,1801594	,000
		FRACC37	6,2409579*	,1801594	,000
		FRACC39	5,3923282*	,1801594	,000
		FRACC41	4,9200275*	,1801594	,000
		FRACC43	4,9577402*	,1801594	,000
		FRACC44-9	2,1515057*	,1801594	,000
		FRACC46	1,0197165*	,1801594	,035
		FRACC47	-13,5533242*	,1801594	,000
		FRACC48	4,0403158*	,1801594	,000
		FRACC27	-13,1610837*	,1801594	,000
		FRACC28	3,8271970*	,1801594	,000
		FRACC29	4,1254169*	,1801594	,000
	FRACC33	veneno	,9370894	,1801594	,079
		FRACC30	-2,3315947*	,1801594	,000
		FRACC31	-,0996904	,1801594	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC47	-18,194846	-16,225255
		FRACC48	-,601206	1,368385
		FRACC27	-17,802606	-15,833014
		FRACC28	-,814325	1,155266
		FRACC29	-,516105	1,453486
	FRACC31	veneno	,051984	2,021575
		FRACC30	-3,216700	-1,247109
		FRACC32	-6,873426	-4,903835
		FRACC33	-,885105	1,084486
		FRACC37	-,632468	1,337123
		FRACC39	-1,481098	,488493
		FRACC41	-1,953399	,016193
		FRACC43	-1,915686	,053905
		FRACC44-9	-4,721921	-2,752329
		FRACC46	-5,853710	-3,884118
		FRACC47	-20,426751	-18,457159
		FRACC48	-2,833111	-,863519
		FRACC27	-20,034510	-18,064919
		FRACC28	-3,046229	-1,076638
		FRACC29	-2,748009	-,778418
	FRACC32	veneno	5,940615	7,910206
		FRACC30	2,671931	4,641522
		FRACC31	4,903835	6,873426
		FRACC33	5,003525	6,973117
		FRACC37	5,256162	7,225754
		FRACC39	4,407532	6,377124
		FRACC41	3,935232	5,904823
		FRACC43	3,972944	5,942536
		FRACC44-9	1,166710	3,136301
		FRACC46	,034921	2,004512
		FRACC47	-14,538120	-12,568529
		FRACC48	3,055520	5,025111
		FRACC27	-14,145879	-12,176288
		FRACC28	2,842401	4,811993
		FRACC29	3,140621	5,110213
	FRACC33	veneno	-,047706	1,921885
		FRACC30	-3,316390	-1,346799
		FRACC31	-1,084486	,885105

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC32	-5,9883210*	,1801594	,000
		FRACC37	,2526369	,1801594	1,000
		FRACC39	-,5959928	,1801594	,738
		FRACC41	-1,0682935*	,1801594	,021
		FRACC43	-1,0305808*	,1801594	,031
		FRACC44-9	-3,8368153*	,1801594	,000
		FRACC46	-4,9686045*	,1801594	,000
		FRACC47	-19,5416452*	,1801594	,000
		FRACC48	-1,9480052*	,1801594	,000
		FRACC27	-19,1494047*	,1801594	,000
		FRACC28	-2,1611240*	,1801594	,000
		FRACC29	-1,8629041*	,1801594	,000
	FRACC37	veneno	,6844525	,1801594	,513
		FRACC30	-2,5842316*	,1801594	,000
		FRACC31	-,3523272	,1801594	,997
		FRACC32	-6,2409579*	,1801594	,000
		FRACC33	-,2526369	,1801594	1,000
		FRACC39	-,8486297	,1801594	,172
		FRACC41	-1,3209304*	,1801594	,001
		FRACC43	-1,2832177*	,1801594	,002
		FRACC44-9	-4,0894522*	,1801594	,000
		FRACC46	-5,2212414*	,1801594	,000
		FRACC47	-19,7942821*	,1801594	,000
		FRACC48	-2,2006421*	,1801594	,000
		FRACC27	-19,4020416*	,1801594	,000
		FRACC28	-2,4137609*	,1801594	,000
		FRACC29	-2,1155410*	,1801594	,000
	FRACC39	veneno	1,5330822*	,1801594	,000
		FRACC30	-1,7356019*	,1801594	,000
		FRACC31	,4963024	,1801594	,919
		FRACC32	-5,3923282*	,1801594	,000
		FRACC33	,5959928	,1801594	,738
		FRACC37	,8486297	,1801594	,172
		FRACC41	-,4723007	,1801594	,945
		FRACC43	-,4345880	,1801594	,973
		FRACC44-9	-3,2408225*	,1801594	,000
		FRACC46	-4,3726117*	,1801594	,000
		FRACC47	-18,9456524*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC32	-6,973117	-5,003525
		FRACC37	-,732159	1,237433
		FRACC39	-1,580789	,388803
		FRACC41	-2,053089	-,083498
		FRACC43	-2,015376	-,045785
		FRACC44-9	-4,821611	-2,852020
		FRACC46	-5,953400	-3,983809
		FRACC47	-20,526441	-18,556849
		FRACC48	-2,932801	-,963209
		FRACC27	-20,134200	-18,164609
		FRACC28	-3,145920	-1,176328
		FRACC29	-2,847700	-,878108
	FRACC37	veneno	-,300343	1,669248
		FRACC30	-3,569027	-1,599436
		FRACC31	-1,337123	,632468
		FRACC32	-7,225754	-5,256162
		FRACC33	-1,237433	,732159
		FRACC39	-1,833425	,136166
		FRACC41	-2,305726	-,336135
		FRACC43	-2,268013	-,298422
		FRACC44-9	-5,074248	-3,104657
		FRACC46	-6,206037	-4,236446
		FRACC47	-20,779078	-18,809486
		FRACC48	-3,185438	-1,215846
		FRACC27	-20,386837	-18,417246
		FRACC28	-3,398557	-1,428965
		FRACC29	-3,100337	-1,130745
	FRACC39	veneno	,548287	2,517878
		FRACC30	-2,720398	-,750806
		FRACC31	-,488493	1,481098
		FRACC32	-6,377124	-4,407532
		FRACC33	-,388803	1,580789
		FRACC37	-,136166	1,833425
		FRACC41	-1,457096	,512495
		FRACC43	-1,419384	,550208
		FRACC44-9	-4,225618	-2,256027
		FRACC46	-5,357407	-3,387816
		FRACC47	-19,930448	-17,960857

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC48	-1,3520124*	,1801594	,001
		FRACC27	-18,5534119*	,1801594	,000
		FRACC28	-1,5651312*	,1801594	,000
		FRACC29	-1,2669113*	,1801594	,002
	FRACC41	veneno	2,0053829*	,1801594	,000
		FRACC30	-1,2633013*	,1801594	,002
		FRACC31	,9686031	,1801594	,059
		FRACC32	-4,9200275*	,1801594	,000
		FRACC33	1,0682935*	,1801594	,021
		FRACC37	1,3209304*	,1801594	,001
		FRACC39	,4723007	,1801594	,945
		FRACC43	,0377127	,1801594	1,000
		FRACC44-9	-2,7685219*	,1801594	,000
		FRACC46	-3,9003110*	,1801594	,000
		FRACC47	-18,4733517*	,1801594	,000
		FRACC48	-,8797117	,1801594	,133
		FRACC27	-18,0811112*	,1801594	,000
		FRACC28	-1,0928306*	,1801594	,016
		FRACC29	-,7946106	,1801594	,260
	FRACC43	veneno	1,9676702*	,1801594	,000
		FRACC30	-1,3010139*	,1801594	,002
		FRACC31	,9308904	,1801594	,084
		FRACC32	-4,9577402*	,1801594	,000
		FRACC33	1,0305808*	,1801594	,031
		FRACC37	1,2832177*	,1801594	,002
		FRACC39	,4345880	,1801594	,973
		FRACC41	-,0377127	,1801594	1,000
		FRACC44-9	-2,8062345*	,1801594	,000
		FRACC46	-3,9380237*	,1801594	,000
		FRACC47	-18,5110644*	,1801594	,000
		FRACC48	-,9174244	,1801594	,095
		FRACC27	-18,1188239*	,1801594	,000
		FRACC28	-1,1305432*	,1801594	,011
		FRACC29	-,8323233	,1801594	,196
	FRACC44-9	veneno	4,7739047*	,1801594	,000
		FRACC30	1,5052206*	,1801594	,000
		FRACC31	3,7371250*	,1801594	,000
		FRACC32	-2,1515057*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC48	-2,336808	-,367217
		FRACC27	-19,538208	-17,568616
		FRACC28	-2,549927	-,580336
		FRACC29	-2,251707	-,282116
	FRACC41	veneno	1,020587	2,990179
		FRACC30	-2,248097	-,278506
		FRACC31	-,016193	1,953399
		FRACC32	-5,904823	-3,935232
		FRACC33	,083498	2,053089
		FRACC37	,336135	2,305726
		FRACC39	-,512495	1,457096
		FRACC43	-,947083	1,022508
		FRACC44-9	-3,753318	-1,783726
		FRACC46	-4,885107	-2,915515
		FRACC47	-19,458147	-17,488556
		FRACC48	-1,864507	,105084
		FRACC27	-19,065907	-17,096316
		FRACC28	-2,077626	-,108035
		FRACC29	-1,779406	,190185
	FRACC43	veneno	,982875	2,952466
		FRACC30	-2,285810	-,316218
		FRACC31	-,053905	1,915686
		FRACC32	-5,942536	-3,972944
		FRACC33	,045785	2,015376
		FRACC37	,298422	2,268013
		FRACC39	-,550208	1,419384
		FRACC41	-1,022508	,947083
		FRACC44-9	-3,791030	-1,821439
		FRACC46	-4,922819	-2,953228
		FRACC47	-19,495860	-17,526269
		FRACC48	-1,902220	,067371
		FRACC27	-19,103620	-17,134028
		FRACC28	-2,115339	-,145748
		FRACC29	-1,817119	,152472
	FRACC44-9	veneno	3,789109	5,758700
		FRACC30	,520425	2,490016
		FRACC31	2,752329	4,721921
		FRACC32	-3,136301	-1,166710

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC33	3,8368153*	,1801594	,000
		FRACC37	4,0894522*	,1801594	,000
		FRACC39	3,2408225*	,1801594	,000
		FRACC41	2,7685219*	,1801594	,000
		FRACC43	2,8062345*	,1801594	,000
		FRACC46	-1,1317892*	,1801594	,011
		FRACC47	-15,7048299*	,1801594	,000
		FRACC48	1,8888101*	,1801594	,000
		FRACC27	-15,3125894*	,1801594	,000
		FRACC28	1,6756913*	,1801594	,000
		FRACC29	1,9739112*	,1801594	,000
	FRACC46	veneno	5,9056939*	,1801594	,000
		FRACC30	2,6370098*	,1801594	,000
		FRACC31	4,8689141*	,1801594	,000
		FRACC32	-1,0197165*	,1801594	,035
		FRACC33	4,9686045*	,1801594	,000
		FRACC37	5,2212414*	,1801594	,000
		FRACC39	4,3726117*	,1801594	,000
		FRACC41	3,9003110*	,1801594	,000
		FRACC43	3,9380237*	,1801594	,000
		FRACC44-9	1,1317892*	,1801594	,011
		FRACC47	-14,5730407*	,1801594	,000
		FRACC48	3,0205993*	,1801594	,000
		FRACC27	-14,1808002*	,1801594	,000
		FRACC28	2,8074805*	,1801594	,000
		FRACC29	3,1057004*	,1801594	,000
	FRACC47	veneno	20,4787346*	,1801594	,000
		FRACC30	17,2100505*	,1801594	,000
		FRACC31	19,4419548*	,1801594	,000
		FRACC32	13,5533242*	,1801594	,000
		FRACC33	19,5416452*	,1801594	,000
		FRACC37	19,7942821*	,1801594	,000
		FRACC39	18,9456524*	,1801594	,000
		FRACC41	18,4733517*	,1801594	,000
		FRACC43	18,5110644*	,1801594	,000
		FRACC44-9	15,7048299*	,1801594	,000
		FRACC46	14,5730407*	,1801594	,000
		FRACC48	17,5936400*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC33	2,852020	4,821611
		FRACC37	3,104657	5,074248
		FRACC39	2,256027	4,225618
		FRACC41	1,783726	3,753318
		FRACC43	1,821439	3,791030
		FRACC46	-2,116585	-,146993
		FRACC47	-16,689626	-14,720034
		FRACC48	,904014	2,873606
		FRACC27	-16,297385	-14,327794
		FRACC28	,690896	2,660487
		FRACC29	,989116	2,958707
	FRACC46	veneno	4,920898	6,890490
		FRACC30	1,652214	3,621805
		FRACC31	3,884118	5,853710
		FRACC32	-2,004512	-,034921
		FRACC33	3,983809	5,953400
		FRACC37	4,236446	6,206037
		FRACC39	3,387816	5,357407
		FRACC41	2,915515	4,885107
		FRACC43	2,953228	4,922819
		FRACC44-9	,146993	2,116585
		FRACC47	-15,557836	-13,588245
		FRACC48	2,035804	4,005395
		FRACC27	-15,165596	-13,196005
		FRACC28	1,822685	3,792276
		FRACC29	2,120905	4,090496
	FRACC47	veneno	19,493939	21,463530
		FRACC30	16,225255	18,194846
		FRACC31	18,457159	20,426751
		FRACC32	12,568529	14,538120
		FRACC33	18,556849	20,526441
		FRACC37	18,809486	20,779078
		FRACC39	17,960857	19,930448
		FRACC41	17,488556	19,458147
		FRACC43	17,526269	19,495860
		FRACC44-9	14,720034	16,689626
		FRACC46	13,588245	15,557836
		FRACC48	16,608844	18,578436

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC27	,3922405	,1801594	,990
		FRACC28	17,3805212*	,1801594	,000
		FRACC29	17,6787411*	,1801594	,000
	FRACC48	veneno	2,8850946*	,1801594	,000
		FRACC30	-,3835895	,1801594	,992
		FRACC31	1,8483148*	,1801594	,000
		FRACC32	-4,0403158*	,1801594	,000
		FRACC33	1,9480052*	,1801594	,000
		FRACC37	2,2006421*	,1801594	,000
		FRACC39	1,3520124*	,1801594	,001
		FRACC41	,8797117	,1801594	,133
		FRACC43	,9174244	,1801594	,095
		FRACC44-9	-1,8888101*	,1801594	,000
		FRACC46	-3,0205993*	,1801594	,000
		FRACC47	-17,5936400*	,1801594	,000
		FRACC27	-17,2013995*	,1801594	,000
		FRACC28	-,2131188	,1801594	1,000
		FRACC29	,0851011	,1801594	1,000
	FRACC27	veneno	20,0864941*	,1801594	,000
		FRACC30	16,8178100*	,1801594	,000
		FRACC31	19,0497143*	,1801594	,000
		FRACC32	13,1610837*	,1801594	,000
		FRACC33	19,1494047*	,1801594	,000
		FRACC37	19,4020416*	,1801594	,000
		FRACC39	18,5534119*	,1801594	,000
		FRACC41	18,0811112*	,1801594	,000
		FRACC43	18,1188239*	,1801594	,000
		FRACC44-9	15,3125894*	,1801594	,000
		FRACC46	14,1808002*	,1801594	,000
		FRACC47	-,3922405	,1801594	,990
		FRACC48	17,2013995*	,1801594	,000
		FRACC28	16,9882807*	,1801594	,000
		FRACC29	17,2865006*	,1801594	,000
	FRACC28	veneno	3,0982134*	,1801594	,000
		FRACC30	-,1704707	,1801594	1,000
		FRACC31	2,0614337*	,1801594	,000
		FRACC32	-3,8271970*	,1801594	,000
		FRACC33	2,1611240*	,1801594	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC27	-,592555	1,377036
		FRACC28	16,395725	18,365317
		FRACC29	16,693945	18,663537
	FRACC48	veneno	1,900299	3,869890
		FRACC30	-1,368385	,601206
		FRACC31	,863519	2,833111
		FRACC32	-5,025111	-3,055520
		FRACC33	,963209	2,932801
		FRACC37	1,215846	3,185438
		FRACC39	,367217	2,336808
		FRACC41	-,105084	1,864507
		FRACC43	-,067371	1,902220
		FRACC44-9	-2,873606	-,904014
		FRACC46	-4,005395	-2,035804
		FRACC47	-18,578436	-16,608844
		FRACC27	-18,186195	-16,216604
		FRACC28	-1,197915	,771677
		FRACC29	-,899695	1,069897
	FRACC27	veneno	19,101698	21,071290
		FRACC30	15,833014	17,802606
		FRACC31	18,064919	20,034510
		FRACC32	12,176288	14,145879
		FRACC33	18,164609	20,134200
		FRACC37	18,417246	20,386837
		FRACC39	17,568616	19,538208
		FRACC41	17,096316	19,065907
		FRACC43	17,134028	19,103620
		FRACC44-9	14,327794	16,297385
		FRACC46	13,196005	15,165596
		FRACC47	-1,377036	,592555
		FRACC48	16,216604	18,186195
		FRACC28	16,003485	17,973076
		FRACC29	16,301705	18,271296
	FRACC28	veneno	2,113418	4,083009
		FRACC30	-1,155266	,814325
		FRACC31	1,076638	3,046229
		FRACC32	-4,811993	-2,842401
		FRACC33	1,176328	3,145920

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	
		FRACC37	2,4137609*	,1801594	,000	
		FRACC39	1,5651312*	,1801594	,000	
		FRACC41	1,0928306*	,1801594	,016	
		FRACC43	1,1305432*	,1801594	,011	
		FRACC44-9	-1,6756913*	,1801594	,000	
		FRACC46	-2,8074805*	,1801594	,000	
		FRACC47	-17,3805212*	,1801594	,000	
		FRACC48	,2131188	,1801594	1,000	
		FRACC27	-16,9882807*	,1801594	,000	
		FRACC29	,2982199	,1801594	,999	
	FRACC29	veneno	2,7999935*	,1801594	,000	
		FRACC30	-,4686906	,1801594	,948	
		FRACC31	1,7632137*	,1801594	,000	
		FRACC32	-4,1254169*	,1801594	,000	
		FRACC33	1,8629041*	,1801594	,000	
		FRACC37	2,1155410*	,1801594	,000	
		FRACC39	1,2669113*	,1801594	,002	
		FRACC41	,7946106	,1801594	,260	
		FRACC43	,8323233	,1801594	,196	
		FRACC44-9	-1,9739112*	,1801594	,000	
		FRACC46	-3,1057004*	,1801594	,000	
		FRACC47	-17,6787411*	,1801594	,000	
		FRACC48	-,0851011	,1801594	1,000	
		FRACC27	-17,2865006*	,1801594	,000	
		FRACC28	-,2982199	,1801594	,999	
logpc3	HSD Tukey	veneno	FRACC30	,0904841*	,0177466	,001
			FRACC31	,0572278	,0177466	,145
			FRACC32	-2,0621360*	,0177466	,000
			FRACC33	,0601536	,0177466	,103
			FRACC37	,0527514	,0177466	,236
			FRACC39	,0208272	,0177466	,998
			FRACC41	-,3899741*	,0177466	,000
			FRACC43	-,0430164	,0177466	,545
			FRACC44-9	,0692147*	,0177466	,032
			FRACC46	-,1655071*	,0177466	,000
			FRACC47	-,1040975*	,0177466	,000
			FRACC48	-,6553546*	,0177466	,000
			FRACC27	-1,2584382*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

			95% de intervalo de confianza		
Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Límite inferior	Límite superior	
		FRACC37	1,428965	3,398557	
		FRACC39	,580336	2,549927	
		FRACC41	,108035	2,077626	
		FRACC43	,145748	2,115339	
		FRACC44-9	-2,660487	-,690896	
		FRACC46	-3,792276	-1,822685	
		FRACC47	-18,365317	-16,395725	
		FRACC48	-,771677	1,197915	
		FRACC27	-17,973076	-16,003485	
		FRACC29	-,686576	1,283016	
	FRACC29	veneno	1,815198	3,784789	
		FRACC30	-1,453486	,516105	
		FRACC31	,778418	2,748009	
		FRACC32	-5,110213	-3,140621	
		FRACC33	,878108	2,847700	
		FRACC37	1,130745	3,100337	
		FRACC39	,282116	2,251707	
		FRACC41	-,190185	1,779406	
		FRACC43	-,152472	1,817119	
		FRACC44-9	-2,958707	-,989116	
		FRACC46	-4,090496	-2,120905	
		FRACC47	-18,663537	-16,693945	
		FRACC48	-1,069897	,899695	
		FRACC27	-18,271296	-16,301705	
		FRACC28	-1,283016	,686576	
logpc3	HSD Tukey	veneno	FRACC30	,024678	,156290
			FRACC31	-,008578	,123034
			FRACC32	-2,127942	-1,996330
			FRACC33	-,005652	,125960
			FRACC37	-,013055	,118558
			FRACC39	-,044979	,086633
			FRACC41	-,455780	-,324168
			FRACC43	-,108822	,022790
			FRACC44-9	,003409	,135021
			FRACC46	-,231313	-,099701
			FRACC47	-,169904	-,038291
			FRACC48	-,721161	-,589549
			FRACC27	-1,324244	-1,192632

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC28	,0760574*	,0177466	,012
		FRACC29	-,2671375*	,0177466	,000
	FRACC30	veneno	-,0904841*	,0177466	,001
		FRACC31	-,0332563	,0177466	,869
		FRACC32	-2,1526201*	,0177466	,000
		FRACC33	-,0303304	,0177466	,929
		FRACC37	-,0377326	,0177466	,737
		FRACC39	-,0696569*	,0177466	,030
		FRACC41	-,4804581*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1335005*	,0177466	,000
		FRACC44-9	-,0212694	,0177466	,997
		FRACC46	-,2559912*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1945815*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7458387*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3489222*	,0177466	,000
		FRACC28	-,0144267	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3576215*	,0177466	,000
	FRACC31	veneno	-,0572278	,0177466	,145
		FRACC30	,0332563	,0177466	,869
		FRACC32	-2,1193638*	,0177466	,000
		FRACC33	,0029259	,0177466	1,000
		FRACC37	-,0044763	,0177466	1,000
		FRACC39	-,0364006	,0177466	,780
		FRACC41	-,4472018*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1002442*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,0119869	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2227349*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1613252*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7125824*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3156659*	,0177466	,000
		FRACC28	,0188296	,0177466	,999
		FRACC29	-,3243652*	,0177466	,000
	FRACC32	veneno	2,0621360*	,0177466	,000
		FRACC30	2,1526201*	,0177466	,000
		FRACC31	2,1193638*	,0177466	,000
		FRACC33	2,1222896*	,0177466	,000
		FRACC37	2,1148875*	,0177466	,000
		FRACC39	2,0829632*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC28	,010251	,141863
		FRACC29	-,332944	-,201331
	FRACC30	veneno	-,156290	-,024678
		FRACC31	-,099062	,032550
		FRACC32	-2,218426	-2,086814
		FRACC33	-,096137	,035476
		FRACC37	-,103539	,028073
		FRACC39	-,135463	-,003851
		FRACC41	-,546264	-,414652
		FRACC43	-,199307	-,067694
		FRACC44-9	-,087075	,044537
		FRACC46	-,321797	-,190185
		FRACC47	-,260388	-,128775
		FRACC48	-,811645	-,680033
		FRACC27	-1,414728	-1,283116
		FRACC28	-,080233	,051379
		FRACC29	-,423428	-,291815
	FRACC31	veneno	-,123034	,008578
		FRACC30	-,032550	,099062
		FRACC32	-2,185170	-2,053558
		FRACC33	-,062880	,068732
		FRACC37	-,070282	,061330
		FRACC39	-,102207	,029405
		FRACC41	-,513008	-,381396
		FRACC43	-,166050	-,034438
		FRACC44-9	-,053819	,077793
		FRACC46	-,288541	-,156929
		FRACC47	-,227131	-,095519
		FRACC48	-,778388	-,646776
		FRACC27	-1,381472	-1,249860
		FRACC28	-,046976	,084636
		FRACC29	-,390171	-,258559
	FRACC32	veneno	1,996330	2,127942
		FRACC30	2,086814	2,218426
		FRACC31	2,053558	2,185170
		FRACC33	2,056484	2,188096
		FRACC37	2,049081	2,180694
		FRACC39	2,017157	2,148769

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC41	1,6721619*	,0177466	,000
		FRACC43	2,0191196*	,0177466	,000
		FRACC44-9	2,1313507*	,0177466	,000
		FRACC46	1,8966289*	,0177466	,000
		FRACC47	1,9580386*	,0177466	,000
		FRACC48	1,4067814*	,0177466	,000
		FRACC27	,8036978*	,0177466	,000
		FRACC28	2,1381934*	,0177466	,000
		FRACC29	1,7949986*	,0177466	,000
	FRACC33	veneno	-,0601536	,0177466	,103
		FRACC30	,0303304	,0177466	,929
		FRACC31	-,0029259	,0177466	1,000
		FRACC32	-2,1222896*	,0177466	,000
		FRACC37	-,0074022	,0177466	1,000
		FRACC39	-,0393264	,0177466	,681
		FRACC41	-,4501277*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1031700*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,0090610	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2256608*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1642511*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7155082*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3185918*	,0177466	,000
		FRACC28	,0159037	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3272911*	,0177466	,000
	FRACC37	veneno	-,0527514	,0177466	,236
		FRACC30	,0377326	,0177466	,737

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC41	1,606356	1,737968
		FRACC43	1,953314	2,084926
		FRACC44-9	2,065545	2,197157
		FRACC46	1,830823	1,962435
		FRACC47	1,892232	2,023845
		FRACC48	1,340975	1,472587
		FRACC27	,737892	,869504
		FRACC28	2,072387	2,203999
		FRACC29	1,729192	1,860805
	FRACC33	veneno	-,125960	,005652
		FRACC30	-,035476	,096137
		FRACC31	-,068732	,062880
		FRACC32	-2,188096	-2,056484
		FRACC37	-,073208	,058404
		FRACC39	-,105133	,026480
		FRACC41	-,515934	-,384322
		FRACC43	-,168976	-,037364
		FRACC44-9	-,056745	,074867
		FRACC46	-,291467	-,159855
		FRACC47	-,230057	-,098445
		FRACC48	-,781314	-,649702
		FRACC27	-1,384398	-1,252786
		FRACC28	-,049902	,081710
		FRACC29	-,393097	-,261485
	FRACC37	veneno	-,118558	,013055
		FRACC30	-,028073	,103539

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC31	,0044763	,0177466	1,000
		FRACC32	-2,1148875*	,0177466	,000
		FRACC33	,0074022	,0177466	1,000
		FRACC39	-,0319243	,0177466	,899
		FRACC41	-,4427255*	,0177466	,000
		FRACC43	-,0957679*	,0177466	,001
		FRACC44-9	,0164632	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2182586*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1568489*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7081060*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3111896*	,0177466	,000
		FRACC28	,0233059	,0177466	,992
		FRACC29	-,3198889*	,0177466	,000
	FRACC39	veneno	-,0208272	,0177466	,998
		FRACC30	,0696569*	,0177466	,030
		FRACC31	,0364006	,0177466	,780
		FRACC32	-2,0829632*	,0177466	,000
		FRACC33	,0393264	,0177466	,681
		FRACC37	,0319243	,0177466	,899
		FRACC41	-,4108013*	,0177466	,000
		FRACC43	-,0638436	,0177466	,065
		FRACC44-9	,0483875	,0177466	,358
		FRACC46	-,1863343*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1249246*	,0177466	,000
		FRACC48	-,6761818*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,2792654*	,0177466	,000
		FRACC28	,0552302	,0177466	,181
		FRACC29	-,2879646*	,0177466	,000
	FRACC41	veneno	,3899741*	,0177466	,000
		FRACC30	,4804581*	,0177466	,000
		FRACC31	,4472018*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,6721619*	,0177466	,000
		FRACC33	,4501277*	,0177466	,000
		FRACC37	,4427255*	,0177466	,000
		FRACC39	,4108013*	,0177466	,000
		FRACC43	,3469576*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,4591887*	,0177466	,000
		FRACC46	,2244669*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC31	-,061330	,070282
		FRACC32	-2,180694	-2,049081
		FRACC33	-,058404	,073208
		FRACC39	-,097730	,033882
		FRACC41	-,508532	-,376919
		FRACC43	-,161574	-,029962
		FRACC44-9	-,049343	,082269
		FRACC46	-,284065	-,152453
		FRACC47	-,222655	-,091043
		FRACC48	-,773912	-,642300
		FRACC27	-1,376996	-1,245384
		FRACC28	-,042500	,089112
		FRACC29	-,385695	-,254083
	FRACC39	veneno	-,086633	,044979
		FRACC30	,003851	,135463
		FRACC31	-,029405	,102207
		FRACC32	-2,148769	-2,017157
		FRACC33	-,026480	,105133
		FRACC37	-,033882	,097730
		FRACC41	-,476607	-,344995
		FRACC43	-,129650	,001962
		FRACC44-9	-,017419	,114194
		FRACC46	-,252140	-,120528
		FRACC47	-,190731	-,059119
		FRACC48	-,741988	-,610376
		FRACC27	-1,345071	-1,213459
		FRACC28	-,010576	,121036
		FRACC29	-,353771	-,222159
	FRACC41	veneno	,324168	,455780
		FRACC30	,414652	,546264
		FRACC31	,381396	,513008
		FRACC32	-1,737968	-1,606356
		FRACC33	,384322	,515934
		FRACC37	,376919	,508532
		FRACC39	,344995	,476607
		FRACC43	,281152	,412764
		FRACC44-9	,393383	,524995
		FRACC46	,158661	,290273

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC47	,2858766*	,0177466	,000
		FRACC48	-,2653805*	,0177466	,000
		FRACC27	-,8684641*	,0177466	,000
		FRACC28	,4660314*	,0177466	,000
		FRACC29	,1228366*	,0177466	,000
	FRACC43	veneno	,0430164	,0177466	,545
		FRACC30	,1335005*	,0177466	,000
		FRACC31	,1002442*	,0177466	,000
		FRACC32	-2,0191196*	,0177466	,000
		FRACC33	,1031700*	,0177466	,000
		FRACC37	,0957679*	,0177466	,001
		FRACC39	,0638436	,0177466	,065
		FRACC41	-,3469576*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,1122311*	,0177466	,000
		FRACC46	-,1224907*	,0177466	,000
		FRACC47	-,0610810	,0177466	,092
		FRACC48	-,6123382*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,2154217*	,0177466	,000
		FRACC28	,1190738*	,0177466	,000
		FRACC29	-,2241210*	,0177466	,000
	FRACC44-9	veneno	-,0692147*	,0177466	,032
		FRACC30	,0212694	,0177466	,997
		FRACC31	-,0119869	,0177466	1,000
		FRACC32	-2,1313507*	,0177466	,000
		FRACC33	-,0090610	,0177466	1,000
		FRACC37	-,0164632	,0177466	1,000
		FRACC39	-,0483875	,0177466	,358
		FRACC41	-,4591887*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1122311*	,0177466	,000
		FRACC46	-,2347218*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1733121*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7245693*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3276528*	,0177466	,000
		FRACC28	,0068427	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3363521*	,0177466	,000
	FRACC46	veneno	,1655071*	,0177466	,000
		FRACC30	,2559912*	,0177466	,000
		FRACC31	,2227349*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC47	,220071	,351683
		FRACC48	-,331187	-,199574
		FRACC27	-,934270	-,802658
		FRACC28	,400225	,531837
		FRACC29	,057031	,188643
	FRACC43	veneno	-,022790	,108822
		FRACC30	,067694	,199307
		FRACC31	,034438	,166050
		FRACC32	-2,084926	-1,953314
		FRACC33	,037364	,168976
		FRACC37	,029962	,161574
		FRACC39	-,001962	,129650
		FRACC41	-,412764	-,281152
		FRACC44-9	,046425	,178037
		FRACC46	-,188297	-,056685
		FRACC47	-,126887	,004725
		FRACC48	-,678144	-,546532
		FRACC27	-1,281228	-1,149616
		FRACC28	,053268	,184880
		FRACC29	-,289927	-,158315
	FRACC44-9	veneno	-,135021	-,003409
		FRACC30	-,044537	,087075
		FRACC31	-,077793	,053819
		FRACC32	-2,197157	-2,065545
		FRACC33	-,074867	,056745
		FRACC37	-,082269	,049343
		FRACC39	-,114194	,017419
		FRACC41	-,524995	-,393383
		FRACC43	-,178037	-,046425
		FRACC46	-,300528	-,168916
		FRACC47	-,239118	-,107506
		FRACC48	-,790375	-,658763
		FRACC27	-1,393459	-1,261847
		FRACC28	-,058963	,072649
		FRACC29	-,402158	-,270546
	FRACC46	veneno	,099701	,231313
		FRACC30	,190185	,321797
		FRACC31	,156929	,288541

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC32	-1,8966289*	,0177466	,000
		FRACC33	,2256608*	,0177466	,000
		FRACC37	,2182586*	,0177466	,000
		FRACC39	,1863343*	,0177466	,000
		FRACC41	-,2244669*	,0177466	,000
		FRACC43	,1224907*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,2347218*	,0177466	,000
		FRACC47	,0614097	,0177466	,088
		FRACC48	-,4898475*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,0929310*	,0177466	,000
		FRACC28	,2415645*	,0177466	,000
		FRACC29	-,1016303*	,0177466	,000
	FRACC47	veneno	,1040975*	,0177466	,000
		FRACC30	,1945815*	,0177466	,000
		FRACC31	,1613252*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,9580386*	,0177466	,000
		FRACC33	,1642511*	,0177466	,000
		FRACC37	,1568489*	,0177466	,000
		FRACC39	,1249246*	,0177466	,000
		FRACC41	-,2858766*	,0177466	,000
		FRACC43	,0610810	,0177466	,092
		FRACC44-9	,1733121*	,0177466	,000
		FRACC46	-,0614097	,0177466	,088
		FRACC48	-,5512572*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,1543407*	,0177466	,000
		FRACC28	,1801548*	,0177466	,000
		FRACC29	-,1630400*	,0177466	,000
	FRACC48	veneno	,6553546*	,0177466	,000
		FRACC30	,7458387*	,0177466	,000
		FRACC31	,7125824*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,4067814*	,0177466	,000
		FRACC33	,7155082*	,0177466	,000
		FRACC37	,7081060*	,0177466	,000
		FRACC39	,6761818*	,0177466	,000
		FRACC41	,2653805*	,0177466	,000
		FRACC43	,6123382*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,7245693*	,0177466	,000
		FRACC46	,4898475*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC32	-1,962435	-1,830823
		FRACC33	,159855	,291467
		FRACC37	,152453	,284065
		FRACC39	,120528	,252140
		FRACC41	-,290273	-,158661
		FRACC43	,056685	,188297
		FRACC44-9	,168916	,300528
		FRACC47	-,004396	,127216
		FRACC48	-,555654	-,424041
		FRACC27	-1,158737	-1,027125
		FRACC28	,175758	,307371
		FRACC29	-,167436	-,035824
	FRACC47	veneno	,038291	,169904
		FRACC30	,128775	,260388
		FRACC31	,095519	,227131
		FRACC32	-2,023845	-1,892232
		FRACC33	,098445	,230057
		FRACC37	,091043	,222655
		FRACC39	,059119	,190731
		FRACC41	-,351683	-,220071
		FRACC43	-,004725	,126887
		FRACC44-9	,107506	,239118
		FRACC46	-,127216	,004396
		FRACC48	-,617063	-,485451
		FRACC27	-1,220147	-1,088535
		FRACC28	,114349	,245961
		FRACC29	-,228846	-,097234
	FRACC48	veneno	,589549	,721161
		FRACC30	,680033	,811645
		FRACC31	,646776	,778388
		FRACC32	-1,472587	-1,340975
		FRACC33	,649702	,781314
		FRACC37	,642300	,773912
		FRACC39	,610376	,741988
		FRACC41	,199574	,331187
		FRACC43	,546532	,678144
		FRACC44-9	,658763	,790375
		FRACC46	,424041	,555654

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC47	,5512572*	,0177466	,000
		FRACC27	-,6030836*	,0177466	,000
		FRACC28	,7314120*	,0177466	,000
		FRACC29	,3882172*	,0177466	,000
	FRACC27	veneno	1,2584382*	,0177466	,000
		FRACC30	1,3489222*	,0177466	,000
		FRACC31	1,3156659*	,0177466	,000
		FRACC32	-,8036978*	,0177466	,000
		FRACC33	1,3185918*	,0177466	,000
		FRACC37	1,3111896*	,0177466	,000
		FRACC39	1,2792654*	,0177466	,000
		FRACC41	,8684641*	,0177466	,000
		FRACC43	1,2154217*	,0177466	,000
		FRACC44-9	1,3276528*	,0177466	,000
		FRACC46	1,0929310*	,0177466	,000
		FRACC47	1,1543407*	,0177466	,000
		FRACC48	,6030836*	,0177466	,000
		FRACC28	1,3344955*	,0177466	,000
		FRACC29	,9913007*	,0177466	,000
	FRACC28	veneno	-,0760574*	,0177466	,012
		FRACC30	,0144267	,0177466	1,000
		FRACC31	-,0188296	,0177466	,999
		FRACC32	-2,1381934*	,0177466	,000
		FRACC33	-,0159037	,0177466	1,000
		FRACC37	-,0233059	,0177466	,992
		FRACC39	-,0552302	,0177466	,181
		FRACC41	-,4660314*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1190738*	,0177466	,000
		FRACC44-9	-,0068427	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2415645*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1801548*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7314120*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3344955*	,0177466	,000
		FRACC29	-,3431948*	,0177466	,000
	FRACC29	veneno	,2671375*	,0177466	,000
		FRACC30	,3576215*	,0177466	,000
		FRACC31	,3243652*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,7949986*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC47	,485451	,617063
		FRACC27	-,668890	-,537277
		FRACC28	,665606	,797218
		FRACC29	,322411	,454023
	FRACC27	veneno	1,192632	1,324244
		FRACC30	1,283116	1,414728
		FRACC31	1,249860	1,381472
		FRACC32	-,869504	-,737892
		FRACC33	1,252786	1,384398
		FRACC37	1,245384	1,376996
		FRACC39	1,213459	1,345071
		FRACC41	,802658	,934270
		FRACC43	1,149616	1,281228
		FRACC44-9	1,261847	1,393459
		FRACC46	1,027125	1,158737
		FRACC47	1,088535	1,220147
		FRACC48	,537277	,668890
		FRACC28	1,268689	1,400302
		FRACC29	,925495	1,057107
	FRACC28	veneno	-,141863	-,010251
		FRACC30	-,051379	,080233
		FRACC31	-,084636	,046976
		FRACC32	-2,203999	-2,072387
		FRACC33	-,081710	,049902
		FRACC37	-,089112	,042500
		FRACC39	-,121036	,010576
		FRACC41	-,531837	-,400225
		FRACC43	-,184880	-,053268
		FRACC44-9	-,072649	,058963
		FRACC46	-,307371	-,175758
		FRACC47	-,245961	-,114349
		FRACC48	-,797218	-,665606
		FRACC27	-1,400302	-1,268689
		FRACC29	-,409001	-,277389
	FRACC29	veneno	,201331	,332944
		FRACC30	,291815	,423428
		FRACC31	,258559	,390171
		FRACC32	-1,860805	-1,729192

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC33	,3272911*	,0177466	,000
		FRACC37	,3198889*	,0177466	,000
		FRACC39	,2879646*	,0177466	,000
		FRACC41	-,1228366*	,0177466	,000
		FRACC43	,2241210*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,3363521*	,0177466	,000
		FRACC46	,1016303*	,0177466	,000
		FRACC47	,1630400*	,0177466	,000
		FRACC48	-,3882172*	,0177466	,000
		FRACC27	-,9913007*	,0177466	,000
		FRACC28	,3431948*	,0177466	,000
Scheffe	veneno	FRACC30	,0904841	,0177466	,094
		FRACC31	,0572278	,0177466	,772
		FRACC32	-2,0621360*	,0177466	,000
		FRACC33	,0601536	,0177466	,703
		FRACC37	,0527514	,0177466	,862
		FRACC39	,0208272	,0177466	1,000
		FRACC41	-,3899741*	,0177466	,000
		FRACC43	-,0430164	,0177466	,972
		FRACC44-9	,0692147	,0177466	,466
		FRACC46	-,1655071*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1040975*	,0177466	,024
		FRACC48	-,6553546*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,2584382*	,0177466	,000
		FRACC28	,0760574	,0177466	,305
		FRACC29	-,2671375*	,0177466	,000
	FRACC30	veneno	-,0904841	,0177466	,094
		FRACC31	-,0332563	,0177466	,998
		FRACC32	-2,1526201*	,0177466	,000
		FRACC33	-,0303304	,0177466	,999
		FRACC37	-,0377326	,0177466	,992
		FRACC39	-,0696569	,0177466	,455
		FRACC41	-,4804581*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1335005*	,0177466	,001
		FRACC44-9	-,0212694	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2559912*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1945815*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7458387*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC33	,261485	,393097
		FRACC37	,254083	,385695
		FRACC39	,222159	,353771
		FRACC41	-,188643	-,057031
		FRACC43	,158315	,289927
		FRACC44-9	,270546	,402158
		FRACC46	,035824	,167436
		FRACC47	,097234	,228846
		FRACC48	-,454023	-,322411
		FRACC27	-1,057107	-,925495
		FRACC28	,277389	,409001
Scheffe	veneno	FRACC30	-,006523	,187492
		FRACC31	-,039780	,154235
		FRACC32	-2,159144	-1,965128
		FRACC33	-,036854	,157161
		FRACC37	-,044256	,149759
		FRACC39	-,076180	,117835
		FRACC41	-,486982	-,292967
		FRACC43	-,140024	,053991
		FRACC44-9	-,027793	,166222
		FRACC46	-,262515	-,068500
		FRACC47	-,201105	-,007090
		FRACC48	-,752362	-,558347
		FRACC27	-1,355446	-1,161431
		FRACC28	-,020950	,173065
		FRACC29	-,364145	-,170130
	FRACC30	veneno	-,187492	,006523
		FRACC31	-,130264	,063751
		FRACC32	-2,249628	-2,055613
		FRACC33	-,127338	,066677
		FRACC37	-,134740	,059275
		FRACC39	-,166664	,027351
		FRACC41	-,577466	-,383451
		FRACC43	-,230508	-,036493
		FRACC44-9	-,118277	,075738
		FRACC46	-,352999	-,158984
		FRACC47	-,291589	-,097574
		FRACC48	-,842846	-,648831

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC27	-1,3489222*	,0177466	,000
		FRACC28	-,0144267	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3576215*	,0177466	,000
	FRACC31	veneno	-,0572278	,0177466	,772
		FRACC30	,0332563	,0177466	,998
		FRACC32	-2,1193638*	,0177466	,000
		FRACC33	,0029259	,0177466	1,000
		FRACC37	-,0044763	,0177466	1,000
		FRACC39	-,0364006	,0177466	,994
		FRACC41	-,4472018*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1002442*	,0177466	,036
		FRACC44-9	,0119869	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2227349*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1613252*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7125824*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3156659*	,0177466	,000
		FRACC28	,0188296	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3243652*	,0177466	,000
	FRACC32	veneno	2,0621360*	,0177466	,000
		FRACC30	2,1526201*	,0177466	,000
		FRACC31	2,1193638*	,0177466	,000
		FRACC33	2,1222896*	,0177466	,000
		FRACC37	2,1148875*	,0177466	,000
		FRACC39	2,0829632*	,0177466	,000
		FRACC41	1,6721619*	,0177466	,000
		FRACC43	2,0191196*	,0177466	,000
		FRACC44-9	2,1313507*	,0177466	,000
		FRACC46	1,8966289*	,0177466	,000
		FRACC47	1,9580386*	,0177466	,000
		FRACC48	1,4067814*	,0177466	,000
		FRACC27	,8036978*	,0177466	,000
		FRACC28	2,1381934*	,0177466	,000
		FRACC29	1,7949986*	,0177466	,000
	FRACC33	veneno	-,0601536	,0177466	,703
		FRACC30	,0303304	,0177466	,999
		FRACC31	-,0029259	,0177466	1,000
		FRACC32	-2,1222896*	,0177466	,000
		FRACC37	-,0074022	,0177466	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC27	-1,445930	-1,251915
		FRACC28	-,111434	,082581
		FRACC29	-,454629	-,260614
	FRACC31	veneno	-,154235	,039780
		FRACC30	-,063751	,130264
		FRACC32	-2,216371	-2,022356
		FRACC33	-,094082	,099933
		FRACC37	-,101484	,092531
		FRACC39	-,133408	,060607
		FRACC41	-,544209	-,350194
		FRACC43	-,197252	-,003237
		FRACC44-9	-,085021	,108994
		FRACC46	-,319742	-,125727
		FRACC47	-,258333	-,064318
		FRACC48	-,809590	-,615575
		FRACC27	-1,412673	-1,218658
		FRACC28	-,078178	,115837
		FRACC29	-,421373	-,227358
	FRACC32	veneno	1,965128	2,159144
		FRACC30	2,055613	2,249628
		FRACC31	2,022356	2,216371
		FRACC33	2,025282	2,219297
		FRACC37	2,017880	2,211895
		FRACC39	1,985956	2,179971
		FRACC41	1,575154	1,769169
		FRACC43	1,922112	2,116127
		FRACC44-9	2,034343	2,228358
		FRACC46	1,799621	1,993636
		FRACC47	1,861031	2,055046
		FRACC48	1,309774	1,503789
		FRACC27	,706690	,900705
		FRACC28	2,041186	2,235201
		FRACC29	1,697991	1,892006
	FRACC33	veneno	-,157161	,036854
		FRACC30	-,066677	,127338
		FRACC31	-,099933	,094082
		FRACC32	-2,219297	-2,025282
		FRACC37	-,104410	,089605

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC39	-,0393264	,0177466	,988
		FRACC41	-,4501277*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1031700*	,0177466	,026
		FRACC44-9	,0090610	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2256608*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1642511*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7155082*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3185918*	,0177466	,000
		FRACC28	,0159037	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3272911*	,0177466	,000
	FRACC37	veneno	-,0527514	,0177466	,862
		FRACC30	,0377326	,0177466	,992
		FRACC31	,0044763	,0177466	1,000
		FRACC32	-2,1148875*	,0177466	,000
		FRACC33	,0074022	,0177466	1,000
		FRACC39	-,0319243	,0177466	,999
		FRACC41	-,4427255*	,0177466	,000
		FRACC43	-,0957679	,0177466	,057
		FRACC44-9	,0164632	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2182586*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1568489*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7081060*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3111896*	,0177466	,000
		FRACC28	,0233059	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3198889*	,0177466	,000
	FRACC39	veneno	-,0208272	,0177466	1,000
		FRACC30	,0696569	,0177466	,455
		FRACC31	,0364006	,0177466	,994
		FRACC32	-2,0829632*	,0177466	,000
		FRACC33	,0393264	,0177466	,988
		FRACC37	,0319243	,0177466	,999
		FRACC41	-,4108013*	,0177466	,000
		FRACC43	-,0638436	,0177466	,608
		FRACC44-9	,0483875	,0177466	,925
		FRACC46	-,1863343*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1249246*	,0177466	,002
		FRACC48	-,6761818*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,2792654*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC39	-,136334	,057681
		FRACC41	-,547135	-,353120
		FRACC43	-,200178	-,006163
		FRACC44-9	-,087946	,106069
		FRACC46	-,322668	-,128653
		FRACC47	-,261259	-,067244
		FRACC48	-,812516	-,618501
		FRACC27	-1,415599	-1,221584
		FRACC28	-,081104	,112911
		FRACC29	-,424299	-,230284
	FRACC37	veneno	-,149759	,044256
		FRACC30	-,059275	,134740
		FRACC31	-,092531	,101484
		FRACC32	-2,211895	-2,017880
		FRACC33	-,089605	,104410
		FRACC39	-,128932	,065083
		FRACC41	-,539733	-,345718
		FRACC43	-,192775	,001240
		FRACC44-9	-,080544	,113471
		FRACC46	-,315266	-,121251
		FRACC47	-,253856	-,059841
		FRACC48	-,805114	-,611099
		FRACC27	-1,408197	-1,214182
		FRACC28	-,073702	,120313
		FRACC29	-,416896	-,222881
	FRACC39	veneno	-,117835	,076180
		FRACC30	-,027351	,166664
		FRACC31	-,060607	,133408
		FRACC32	-2,179971	-1,985956
		FRACC33	-,057681	,136334
		FRACC37	-,065083	,128932
		FRACC41	-,507809	-,313794
		FRACC43	-,160851	,033164
		FRACC44-9	-,048620	,145395
		FRACC46	-,283342	-,089327
		FRACC47	-,221932	-,027917
		FRACC48	-,773189	-,579174
		FRACC27	-1,376273	-1,182258

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC28	,0552302	,0177466	,815
		FRACC29	-,2879646*	,0177466	,000
	FRACC41	veneno	,3899741*	,0177466	,000
		FRACC30	,4804581*	,0177466	,000
		FRACC31	,4472018*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,6721619*	,0177466	,000
		FRACC33	,4501277*	,0177466	,000
		FRACC37	,4427255*	,0177466	,000
		FRACC39	,4108013*	,0177466	,000
		FRACC43	,3469576*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,4591887*	,0177466	,000
		FRACC46	,2244669*	,0177466	,000
		FRACC47	,2858766*	,0177466	,000
		FRACC48	-,2653805*	,0177466	,000
		FRACC27	-,8684641*	,0177466	,000
		FRACC28	,4660314*	,0177466	,000
		FRACC29	,1228366*	,0177466	,003
	FRACC43	veneno	,0430164	,0177466	,972
		FRACC30	,1335005*	,0177466	,001
		FRACC31	,1002442*	,0177466	,036
		FRACC32	-2,0191196*	,0177466	,000
		FRACC33	,1031700*	,0177466	,026
		FRACC37	,0957679	,0177466	,057
		FRACC39	,0638436	,0177466	,608
		FRACC41	-,3469576*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,1122311*	,0177466	,010
		FRACC46	-,1224907*	,0177466	,003
		FRACC47	-,0610810	,0177466	,679
		FRACC48	-,6123382*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,2154217*	,0177466	,000
		FRACC28	,1190738*	,0177466	,004
		FRACC29	-,2241210*	,0177466	,000
	FRACC44-9	veneno	-,0692147	,0177466	,466
		FRACC30	,0212694	,0177466	1,000
		FRACC31	-,0119869	,0177466	1,000
		FRACC32	-2,1313507*	,0177466	,000
		FRACC33	-,0090610	,0177466	1,000
		FRACC37	-,0164632	,0177466	1,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC28	-,041777	,152238
		FRACC29	-,384972	-,190957
	FRACC41	veneno	,292967	,486982
		FRACC30	,383451	,577466
		FRACC31	,350194	,544209
		FRACC32	-1,769169	-1,575154
		FRACC33	,353120	,547135
		FRACC37	,345718	,539733
		FRACC39	,313794	,507809
		FRACC43	,249950	,443965
		FRACC44-9	,362181	,556196
		FRACC46	,127459	,321474
		FRACC47	,188869	,382884
		FRACC48	-,362388	-,168373
		FRACC27	-,965472	-,771457
		FRACC28	,369024	,563039
		FRACC29	,025829	,219844
	FRACC43	veneno	-,053991	,140024
		FRACC30	,036493	,230508
		FRACC31	,003237	,197252
		FRACC32	-2,116127	-1,922112
		FRACC33	,006163	,200178
		FRACC37	-,001240	,192775
		FRACC39	-,033164	,160851
		FRACC41	-,443965	-,249950
		FRACC44-9	,015224	,209239
		FRACC46	-,219498	-,025483
		FRACC47	-,158089	,035926
		FRACC48	-,709346	-,515331
		FRACC27	-1,312429	-1,118414
		FRACC28	,022066	,216081
		FRACC29	-,321129	-,127114
	FRACC44-9	veneno	-,166222	,027793
		FRACC30	-,075738	,118277
		FRACC31	-,108994	,085021
		FRACC32	-2,228358	-2,034343
		FRACC33	-,106069	,087946
		FRACC37	-,113471	,080544

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC39	-,0483875	,0177466	,925
		FRACC41	-,4591887*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1122311*	,0177466	,010
		FRACC46	-,2347218*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1733121*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7245693*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3276528*	,0177466	,000
		FRACC28	,0068427	,0177466	1,000
		FRACC29	-,3363521*	,0177466	,000
	FRACC46	veneno	,1655071*	,0177466	,000
		FRACC30	,2559912*	,0177466	,000
		FRACC31	,2227349*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,8966289*	,0177466	,000
		FRACC33	,2256608*	,0177466	,000
		FRACC37	,2182586*	,0177466	,000
		FRACC39	,1863343*	,0177466	,000
		FRACC41	-,2244669*	,0177466	,000
		FRACC43	,1224907*	,0177466	,003
		FRACC44-9	,2347218*	,0177466	,000
		FRACC47	,0614097	,0177466	,671
		FRACC48	-,4898475*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,0929310*	,0177466	,000
		FRACC28	,2415645*	,0177466	,000
		FRACC29	-,1016303*	,0177466	,031
	FRACC47	veneno	,1040975*	,0177466	,024
		FRACC30	,1945815*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC39	-,145395	,048620
		FRACC41	-,556196	-,362181
		FRACC43	-,209239	-,015224
		FRACC46	-,331729	-,137714
		FRACC47	-,270320	-,076305
		FRACC48	-,821577	-,627562
		FRACC27	-1,424660	-1,230645
		FRACC28	-,090165	,103850
		FRACC29	-,433360	-,239345
	FRACC46	veneno	,068500	,262515
		FRACC30	,158984	,352999
		FRACC31	,125727	,319742
		FRACC32	-1,993636	-1,799621
		FRACC33	,128653	,322668
		FRACC37	,121251	,315266
		FRACC39	,089327	,283342
		FRACC41	-,321474	-,127459
		FRACC43	,025483	,219498
		FRACC44-9	,137714	,331729
		FRACC47	-,035598	,158417
		FRACC48	-,586855	-,392840
		FRACC27	-1,189939	-,995923
		FRACC28	,144557	,338572
		FRACC29	-,198638	-,004623
	FRACC47	veneno	,007090	,201105
		FRACC30	,097574	,291589

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC31	,1613252*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,9580386*	,0177466	,000
		FRACC33	,1642511*	,0177466	,000
		FRACC37	,1568489*	,0177466	,000
		FRACC39	,1249246*	,0177466	,002
		FRACC41	-,2858766*	,0177466	,000
		FRACC43	,0610810	,0177466	,679
		FRACC44-9	,1733121*	,0177466	,000
		FRACC46	-,0614097	,0177466	,671
		FRACC48	-,5512572*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,1543407*	,0177466	,000
		FRACC28	,1801548*	,0177466	,000
		FRACC29	-,1630400*	,0177466	,000
	FRACC48	veneno	,6553546*	,0177466	,000
		FRACC30	,7458387*	,0177466	,000
		FRACC31	,7125824*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,4067814*	,0177466	,000
		FRACC33	,7155082*	,0177466	,000
		FRACC37	,7081060*	,0177466	,000
		FRACC39	,6761818*	,0177466	,000
		FRACC41	,2653805*	,0177466	,000
		FRACC43	,6123382*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,7245693*	,0177466	,000
		FRACC46	,4898475*	,0177466	,000
		FRACC47	,5512572*	,0177466	,000
		FRACC27	-,6030836*	,0177466	,000
		FRACC28	,7314120*	,0177466	,000
		FRACC29	,3882172*	,0177466	,000
	FRACC27	veneno	1,2584382*	,0177466	,000
		FRACC30	1,3489222*	,0177466	,000
		FRACC31	1,3156659*	,0177466	,000
		FRACC32	-,8036978*	,0177466	,000
		FRACC33	1,3185918*	,0177466	,000
		FRACC37	1,3111896*	,0177466	,000
		FRACC39	1,2792654*	,0177466	,000
		FRACC41	,8684641*	,0177466	,000
		FRACC43	1,2154217*	,0177466	,000
		FRACC44-9	1,3276528*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC31	,064318	,258333
		FRACC32	-2,055046	-1,861031
		FRACC33	,067244	,261259
		FRACC37	,059841	,253856
		FRACC39	,027917	,221932
		FRACC41	-,382884	-,188869
		FRACC43	-,035926	,158089
		FRACC44-9	,076305	,270320
		FRACC46	-,158417	,035598
		FRACC48	-,648265	-,454250
		FRACC27	-1,251348	-1,057333
		FRACC28	,083147	,277162
		FRACC29	-,260048	-,066032
	FRACC48	veneno	,558347	,752362
		FRACC30	,648831	,842846
		FRACC31	,615575	,809590
		FRACC32	-1,503789	-1,309774
		FRACC33	,618501	,812516
		FRACC37	,611099	,805114
		FRACC39	,579174	,773189
		FRACC41	,168373	,362388
		FRACC43	,515331	,709346
		FRACC44-9	,627562	,821577
		FRACC46	,392840	,586855
		FRACC47	,454250	,648265
		FRACC27	-,700091	-,506076
		FRACC28	,634404	,828419
		FRACC29	,291210	,485225
	FRACC27	veneno	1,161431	1,355446
		FRACC30	1,251915	1,445930
		FRACC31	1,218658	1,412673
		FRACC32	-,900705	-,706690
		FRACC33	1,221584	1,415599
		FRACC37	1,214182	1,408197
		FRACC39	1,182258	1,376273
		FRACC41	,771457	,965472
		FRACC43	1,118414	1,312429
		FRACC44-9	1,230645	1,424660

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
		FRACC46	1,0929310*	,0177466	,000
		FRACC47	1,1543407*	,0177466	,000
		FRACC48	,6030836*	,0177466	,000
		FRACC28	1,3344955*	,0177466	,000
		FRACC29	,9913007*	,0177466	,000
	FRACC28	veneno	-,0760574	,0177466	,305
		FRACC30	,0144267	,0177466	1,000
		FRACC31	-,0188296	,0177466	1,000
		FRACC32	-2,1381934*	,0177466	,000
		FRACC33	-,0159037	,0177466	1,000
		FRACC37	-,0233059	,0177466	1,000
		FRACC39	-,0552302	,0177466	,815
		FRACC41	-,4660314*	,0177466	,000
		FRACC43	-,1190738*	,0177466	,004
		FRACC44-9	-,0068427	,0177466	1,000
		FRACC46	-,2415645*	,0177466	,000
		FRACC47	-,1801548*	,0177466	,000
		FRACC48	-,7314120*	,0177466	,000
		FRACC27	-1,3344955*	,0177466	,000
		FRACC29	-,3431948*	,0177466	,000
	FRACC29	veneno	,2671375*	,0177466	,000
		FRACC30	,3576215*	,0177466	,000
		FRACC31	,3243652*	,0177466	,000
		FRACC32	-1,7949986*	,0177466	,000
		FRACC33	,3272911*	,0177466	,000
		FRACC37	,3198889*	,0177466	,000
		FRACC39	,2879646*	,0177466	,000
		FRACC41	-,1228366*	,0177466	,003
		FRACC43	,2241210*	,0177466	,000
		FRACC44-9	,3363521*	,0177466	,000
		FRACC46	,1016303*	,0177466	,031
		FRACC47	,1630400*	,0177466	,000
		FRACC48	-,3882172*	,0177466	,000
		FRACC27	-,9913007*	,0177466	,000
		FRACC28	,3431948*	,0177466	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) fraccion	(J) fraccion	95% de intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
		FRACC46	,995923	1,189939
		FRACC47	1,057333	1,251348
		FRACC48	,506076	,700091
		FRACC28	1,237488	1,431503
		FRACC29	,894293	1,088308
	FRACC28	veneno	-,173065	,020950
		FRACC30	-,082581	,111434
		FRACC31	-,115837	,078178
		FRACC32	-2,235201	-2,041186
		FRACC33	-,112911	,081104
		FRACC37	-,120313	,073702
		FRACC39	-,152238	,041777
		FRACC41	-,563039	-,369024
		FRACC43	-,216081	-,022066
		FRACC44-9	-,103850	,090165
		FRACC46	-,338572	-,144557
		FRACC47	-,277162	-,083147
		FRACC48	-,828419	-,634404
		FRACC27	-1,431503	-1,237488
		FRACC29	-,440202	-,246187
	FRACC29	veneno	,170130	,364145
		FRACC30	,260614	,454629
		FRACC31	,227358	,421373
		FRACC32	-1,892006	-1,697991
		FRACC33	,230284	,424299
		FRACC37	,222881	,416896
		FRACC39	,190957	,384972
		FRACC41	-,219844	-,025829
		FRACC43	,127114	,321129
		FRACC44-9	,239345	,433360
		FRACC46	,004623	,198638
		FRACC47	,066032	,260048
		FRACC48	-,485225	-,291210
		FRACC27	-1,088308	-,894293
		FRACC28	,246187	,440202

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

HT-29

fraccion	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5		
HSD Tukey ^a	veneno	3	6,428680					
	FRACC29	3	6,517120					
	FRACC32	3		9,144790				
	FRACC37	3		9,489870				
	FRACC28	3		10,712800	10,712800			
	FRACC30	3		10,925640	10,925640	10,925640		
	FRACC33	3			11,438270	11,438270	11,438270	
	FRACC43	3			11,698400	11,698400	11,698400	11,698400
	FRACC48	3			11,961600	11,961600	11,961600	11,961600
	FRACC41	3			12,186400	12,186400	12,186400	12,186400
	FRACC39	3			12,239960	12,239960	12,239960	12,239960
	FRACC27	3				12,580200	12,580200	12,580200
	FRACC31	3					12,896450	12,896450
	FRACC46	3						
	FRACC47	3						
	FRACC44-9	3						
	Sig.		1,000	,072	,207	,125	,266	
Scheffe ^a	veneno	3	6,428680					
	FRACC29	3	6,517120					
	FRACC32	3	9,144790	9,144790				
	FRACC37	3		9,489870	9,489870			
	FRACC28	3		10,712800	10,712800	10,712800		
	FRACC30	3		10,925640	10,925640	10,925640		
	FRACC33	3		11,438270	11,438270	11,438270		
	FRACC43	3		11,698400	11,698400	11,698400		
	FRACC48	3			11,961600	11,961600		
	FRACC41	3			12,186400	12,186400		
	FRACC39	3				12,239960		
	FRACC27	3				12,580200		
	FRACC31	3				12,896450	12,896450	
	FRACC46	3						15,637900
	FRACC47	3						
	FRACC44-9	3						
	Sig.		,055	,096	,059	,281	,050	

HT-29

		Subconjunto para alfa = 0.05	
		6	7
HSD Tukey ^a	veneno		
	FRACC29		
	FRACC32		
	FRACC37		
	FRACC28		
	FRACC30		
	FRACC33		
	FRACC43		
	FRACC48		
	FRACC41		
	FRACC39		
	FRACC27		
	FRACC31		
	FRACC46	15,637900	
	FRACC47		17,986400
FRACC44-9		18,008000	
Sig.	1,000	1,000	
Scheffe ^a	veneno		
	FRACC29		
	FRACC32		
	FRACC37		
	FRACC28		
	FRACC30		
	FRACC33		
	FRACC43		
	FRACC48		
	FRACC41		
	FRACC39		
	FRACC27		
	FRACC31		
	FRACC46	15,637900	
	FRACC47	17,986400	
FRACC44-9	18,008000		
Sig.	,169		

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

HeLa

		Subconjunto para alfa = 0.05				
fraccion	N	1	2	3	4	
HSD Tukey ^a	FRACC31	3	9,034100			
	FRACC33	3	9,215700			
	FRACC27	3	9,444300			
	FRACC39	3	9,569700			
	FRACC32	3	9,885900			
	FRACC30	3	9,978300			
	FRACC37	3	9,982800			
	veneno	3	10,505800			
	FRACC43	3		14,104100		
	FRACC47	3		15,475000	15,475000	
	FRACC46	3			16,575800	
	FRACC48	3			16,977900	
	FRACC44-9	3			17,751400	
	FRACC29	3			17,797800	
	FRACC28	3				23,695500
	FRACC41	3				
Sig.		,613	,715	,056	1,000	
Scheffe ^a	FRACC31	3	9,034100			
	FRACC33	3	9,215700			
	FRACC27	3	9,444300			
	FRACC39	3	9,569700			
	FRACC32	3	9,885900			
	FRACC30	3	9,978300			
	FRACC37	3	9,982800			
	veneno	3	10,505800			
	FRACC43	3		14,104100		
	FRACC47	3		15,475000	15,475000	
	FRACC46	3		16,575800	16,575800	
	FRACC48	3		16,977900	16,977900	
	FRACC44-9	3			17,751400	
	FRACC29	3			17,797800	
	FRACC28	3				23,695500
	FRACC41	3				
Sig.		,981	,221	,577	1,000	

HeLa

		Subconjunto .
fraccion		5
HSD Tukey ^a	FRACC31	
	FRACC33	
	FRACC27	
	FRACC39	
	FRACC32	
	FRACC30	
	FRACC37	
	veneno	
	FRACC43	
	FRACC47	
	FRACC46	
	FRACC48	
	FRACC44-9	
	FRACC29	
	FRACC28	
	FRACC41	30,195400
	Sig.	1,000
Scheffe ^a	FRACC31	
	FRACC33	
	FRACC27	
	FRACC39	
	FRACC32	
	FRACC30	
	FRACC37	
	veneno	
	FRACC43	
	FRACC47	
	FRACC46	
	FRACC48	
	FRACC44-9	
	FRACC29	
	FRACC28	
	FRACC41	30,195400
	Sig.	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

raizhbt26

fraccion		N	Subconjunto para alfa = 0.05					
			1	2	3	4	5	
HSD Tukey ^a	FRACC48	3	3,671250					
	veneno	3	3,856954	3,856954				
	FRACC37	3	3,890654	3,890654				
	FRACC47	3	4,145110	4,145110	4,145110			
	FRACC27	3		4,197136	4,197136			
	FRACC30	3			4,453272			
	FRACC31	3			4,575627	4,575627		
	FRACC46	3				5,039405	5,039405	
	FRACC44-9	3						5,167771
	FRACC32	3						
	FRACC39	3						
	FRACC41	3						
	FRACC33	3						
	FRACC43	3						
	FRACC28	3						
	FRACC29	3						
		Sig.		,061	,430	,126	,072	1,000
Scheffe ^a	FRACC48	3	3,671250					
	veneno	3	3,856954	3,856954				
	FRACC37	3	3,890654	3,890654	3,890654			
	FRACC47	3	4,145110	4,145110	4,145110			
	FRACC27	3	4,197136	4,197136	4,197136			
	FRACC30	3		4,453272	4,453272	4,453272		
	FRACC31	3			4,575627	4,575627	4,575627	
	FRACC46	3				5,039405	5,039405	
	FRACC44-9	3						5,167771
	FRACC32	3						
	FRACC39	3						
	FRACC41	3						
	FRACC33	3						
	FRACC43	3						
	FRACC28	3						
	FRACC29	3						
		Sig.		,411	,212	,074	,236	,221

raizhbt26

		Subconjunto para alfa = 0.05				
fraccion		6	7	8	9	10
HSD Tukey ^a	FRACC48					
	veneno					
	FRACC37					
	FRACC47					
	FRACC27					
	FRACC30					
	FRACC31					
	FRACC46					
	FRACC44-9	5,167771				
	FRACC32	5,623736	5,623736			
	FRACC39		5,678446			
	FRACC41		5,901904			
	FRACC33			6,515366		
	FRACC43				7,654911	
	FRACC28				7,810176	
FRACC29					14,939291	
Sig.	,083	,735	1,000	,997	1,000	
Scheffe ^a	FRACC48					
	veneno					
	FRACC37					
	FRACC47					
	FRACC27					
	FRACC30					
	FRACC31					
	FRACC46	5,039405				
	FRACC44-9	5,167771				
	FRACC32	5,623736	5,623736			
	FRACC39	5,678446	5,678446			
	FRACC41		5,901904	5,901904		
	FRACC33			6,515366		
	FRACC43				7,654911	
	FRACC28				7,810176	
FRACC29					14,939291	
Sig.	,131	,992	,176	1,000	1,000	

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

raizneurona

fraccion	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
HSD Tukey ^a						
veneno	3	1,481683				
FRACC37	3		2,166135			
FRACC33	3		2,418772	2,418772		
FRACC31	3		2,518463	2,518463		
FRACC39	3			3,014765	3,014765	
FRACC43	3				3,449353	
FRACC41	3				3,487066	
FRACC29	3					4,281676
FRACC48	3					4,366778
FRACC28	3					4,579896
FRACC30	3					4,750367
FRACC44-9	3					
FRACC46	3					
FRACC32	3					
FRACC27	3					
FRACC47	3					
Sig.		1,000	,831	,122	,419	,431
Scheffe ^a						
veneno	3	1,481683				
FRACC37	3	2,166135	2,166135			
FRACC33	3	2,418772	2,418772			
FRACC31	3		2,518463	2,518463		
FRACC39	3		3,014765	3,014765		
FRACC43	3			3,449353	3,449353	
FRACC41	3			3,487066	3,487066	
FRACC29	3				4,281676	4,281676
FRACC48	3				4,366778	4,366778
FRACC28	3					4,579896
FRACC30	3					4,750367
FRACC44-9	3					
FRACC46	3					
FRACC32	3					
FRACC27	3					
FRACC47	3					
Sig.		,079	,172	,059	,095	,948

raizneurona

fraccion		Subconjunto para alfa = 0.05			
		6	7	8	9
HSD Tukey ^a	veneno				
	FRACC37				
	FRACC33				
	FRACC31				
	FRACC39				
	FRACC43				
	FRACC41				
	FRACC29				
	FRACC48				
	FRACC28				
	FRACC30				
	FRACC44-9	6,255588			
	FRACC46		7,387377		
	FRACC32			8,407093	
	FRACC27				21,568177
FRACC47				21,960418	
Sig.	1,000	1,000	1,000	,705	
Scheffe ^a	veneno				
	FRACC37				
	FRACC33				
	FRACC31				
	FRACC39				
	FRACC43				
	FRACC41				
	FRACC29				
	FRACC48				
	FRACC28				
	FRACC30				
	FRACC44-9	6,255588			
	FRACC46		7,387377		
	FRACC32			8,407093	
	FRACC27				21,568177
FRACC47				21,960418	
Sig.	1,000	1,000	1,000	,990	

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

logpc3

		Subconjunto para alfa = 0.05					
fraccion	N	1	2	3	4	5	
HSD Tukey ^a	FRACC30	3	1,158907				
	FRACC28	3	1,173334	1,173334			
	FRACC44-9	3	1,180176	1,180176			
	FRACC33	3	1,189237	1,189237	1,189237		
	FRACC31	3	1,192163	1,192163	1,192163		
	FRACC37	3	1,196640	1,196640	1,196640		
	FRACC39	3		1,228564	1,228564	1,228564	
	veneno	3			1,249391	1,249391	
	FRACC43	3				1,292407	1,292407
	FRACC47	3					1,353488
	FRACC46	3					
	FRACC29	3					
	FRACC41	3					
	FRACC48	3					
	FRACC27	3					
	FRACC32	3					
Sig.		,737	,181	,103	,065	,092	
Scheffe ^a	FRACC30	3	1,158907				
	FRACC28	3	1,173334				
	FRACC44-9	3	1,180176				
	FRACC33	3	1,189237				
	FRACC31	3	1,192163				
	FRACC37	3	1,196640	1,196640			
	FRACC39	3	1,228564	1,228564			
	veneno	3	1,249391	1,249391			
	FRACC43	3		1,292407	1,292407		
	FRACC47	3			1,353488	1,353488	
	FRACC46	3				1,414898	
	FRACC29	3					1,516528
	FRACC41	3					
	FRACC48	3					
	FRACC27	3					
	FRACC32	3					
Sig.		,094	,057	,679	,671	1,000	

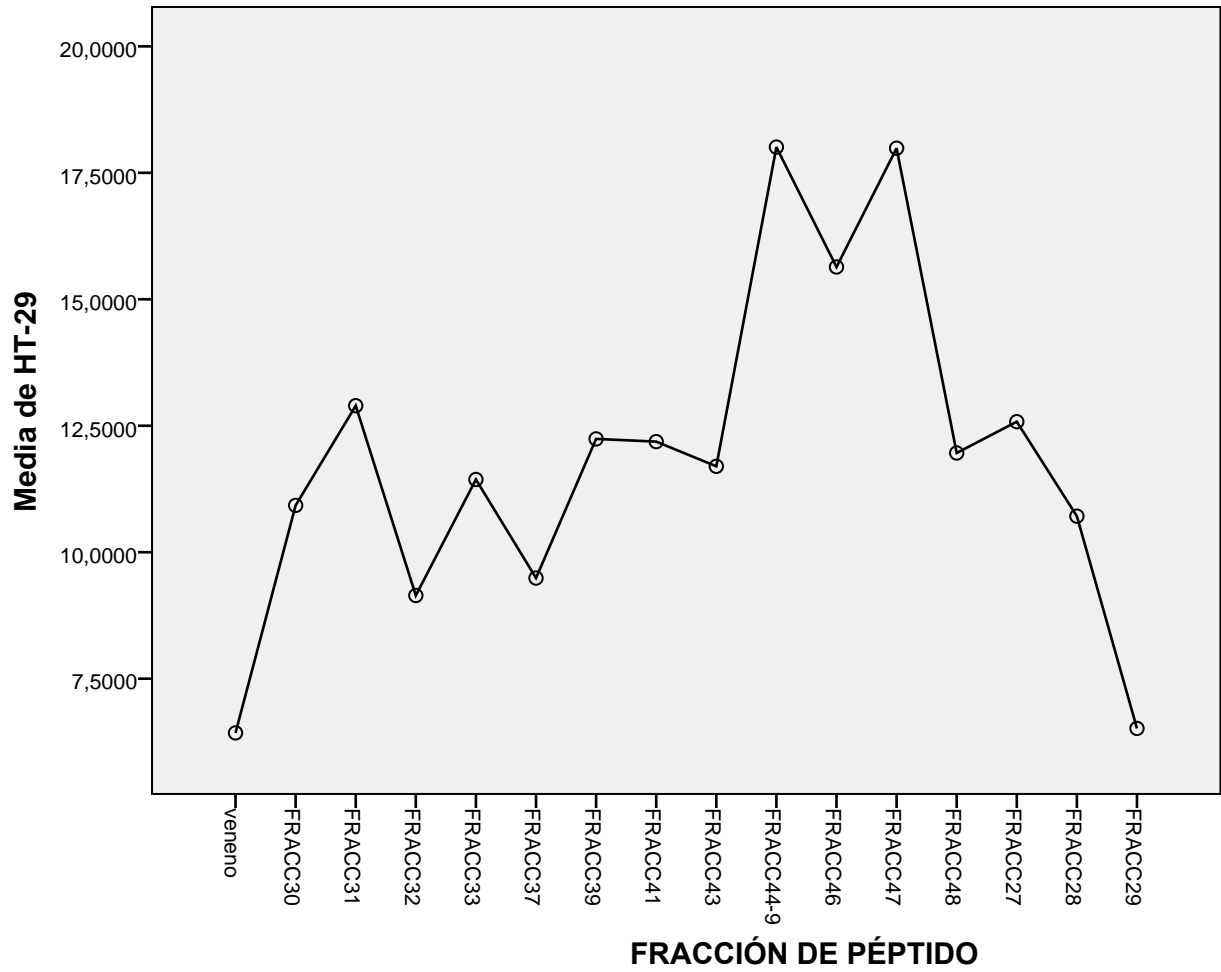
logpc3

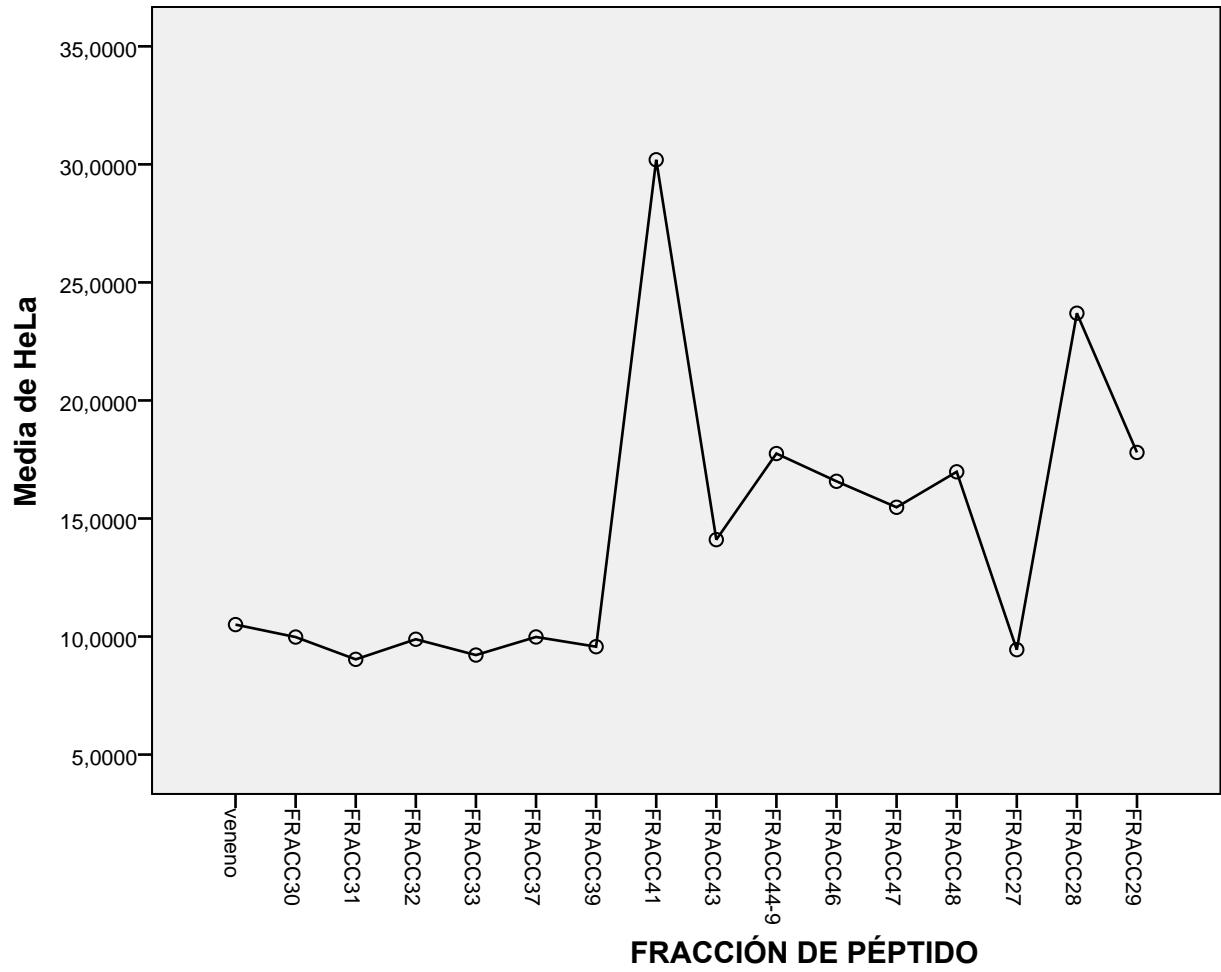
		Subconjunto para alfa = 0.05					
fraccion		6	7	8	9	10	11
HSD Tukey ^a	FRACC30						
	FRACC28						
	FRACC44-9						
	FRACC33						
	FRACC31						
	FRACC37						
	FRACC39						
	veneno						
	FRACC43						
	FRACC47	1,353488					
	FRACC46	1,414898					
	FRACC29		1,516528				
	FRACC41			1,639365			
	FRACC48				1,904746		
	FRACC27					2,507829	
	FRACC32						3,311527
Sig.	,088	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
Scheffe ^a	FRACC30						
	FRACC28						
	FRACC44-9						
	FRACC33						
	FRACC31						
	FRACC37						
	FRACC39						
	veneno						
	FRACC43						
	FRACC47						
	FRACC46						
	FRACC29						
	FRACC41	1,639365					
	FRACC48		1,904746				
	FRACC27			2,507829			
	FRACC32				3,311527		
Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000			

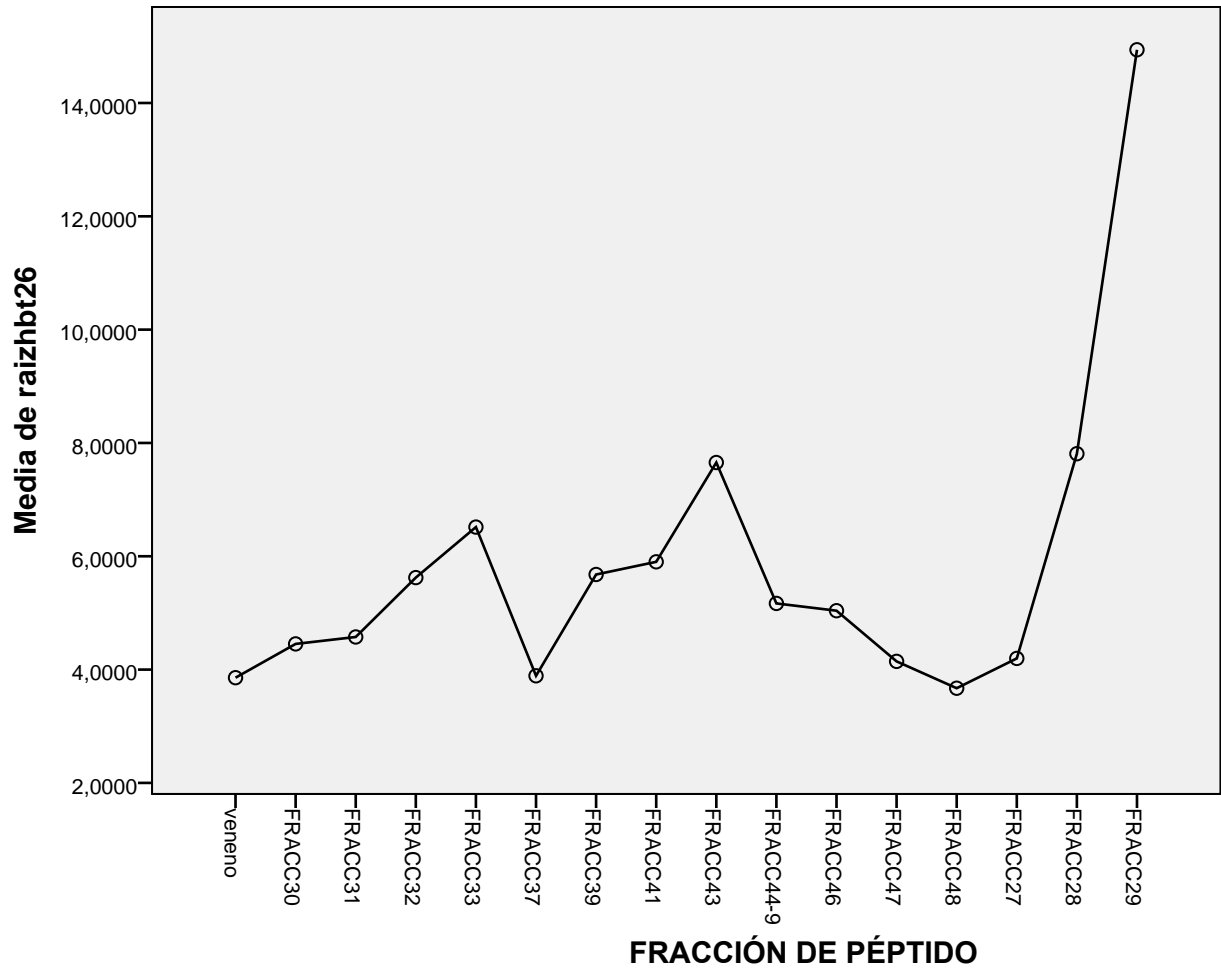
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

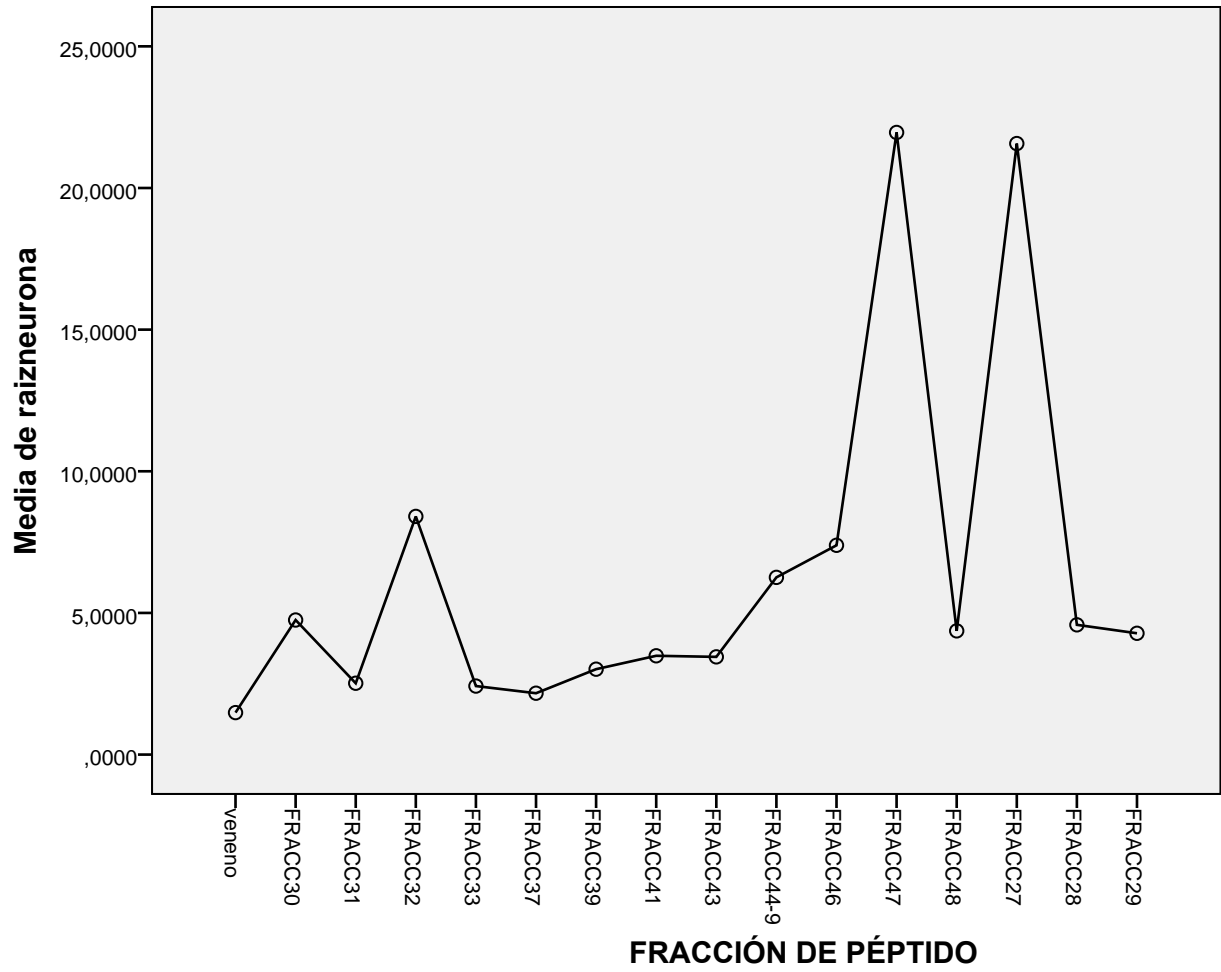
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

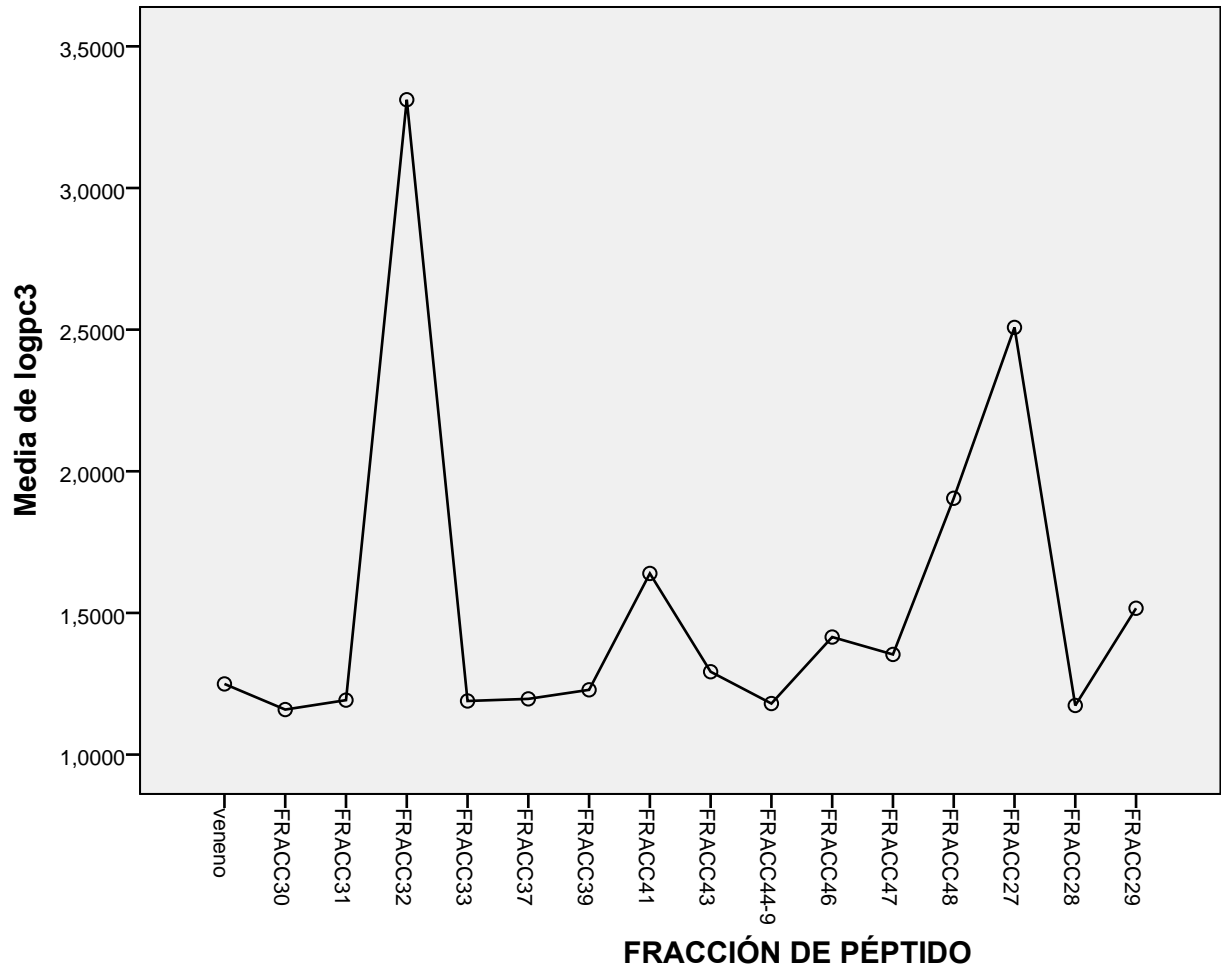
Gráficos de medias











DATASET ACTIVATE Conjunto_de_datos1

SAVE OUTFILE='C:\Users\cgarc_000\Documents\factorial datos clara.sav'
/COMPRESSED.