



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA - U. N. A. M.

**Efecto del Suero en la Formación de Ampollas
en una Línea Celular Establecida (MDCK)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A**

ELDA MA. HERRERA QUINTERO

SAN JUAN IZTACALA, MEXICO 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta investigación se realizó bajo la acertada dirección del D. en C. Marcelino Cereijido en el Laboratorio # 7 que tiene a su cargo dentro del Departamento de Fisiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

I

Es, en parte,
gracias a los errores presentes,
que el hombre labra los logros futuros.

A MIS ABUELOS

MIS PADRES

HERMANOS

GUSTAVO

AMIGOS

TI .

MI SINCERO AGRADECIMIENTO

Al Dr. Marcelino Cereijido
por su gran calidad humana y
valiosas sugerencias, por ha-
berme permitido aprender a su
lado.

A toda la gente del Laboratorio 27
del Depto. de Fisiología y Biofísica
del I.P.N. por su comprensión y estí-
mulo, por su amistad.

A Gustavo
por su conocimiento y paciencia,
por estar cuando le necesitaba.

A mis amigos y sinodales
por su crítica constructiva
y brillantes observaciones.

III

I N D I C E

Resumen

I - Introducción	1
I - 1 El tejido epitelial	2
I - 2 Tejidos embrionarios	9
I - 3 Cultivo de tejidos	12
I - 4 Línea celular MDCK	15
I - 5 Objetivos generales	19
II - Metodología	
II - 1 Cultivo Celular	21
II - 2 Determinación del patrón de distribución de las ampollas en las células MDCK	22
II - 3 Determinación del efecto de la concentración de Suero Fetal Bovino en la formación de ampo- llas en las MDCK	24
II - 4 Efecto del tipo de suero en la formación de am- pollas en las MDCK a través del tiempo	27
III - Resultados y Discusión	
III - 1 Procesamiento de los datos	28
III - 2 Distribución de las ampollas	30
III - 3 La concentración del suero	34
III - 4 El tipo de suero	55
III - 5 Las pruebas estadísticas	65

IV

IV - Conclusiones generales	67
Proposiciones para corroborar los resultados	70
V - Bibliografía	71
VI - Apéndice	
VI - 1 Composición de los medios de cultivo	78
VI - 2 Terminología en cultivo de tejidos	81
VI - 3 Programas para el procesamiento de los datos ..	83
VI - 4 Tablas de "t"	88

La línea celular MDCK (Madin and Derby Canine Kid -
ney) constituye una valiosa herramienta en el estudio de las
propiedades de la mayor parte de los epitelios especializa -
dos en transporte, debido a que forman estructuras caracterís -
ticas llamadas blisters o ampollas como expresión de su fun -
cionalidad (igual que muchos otros epitelios de este tipo), -
debido a ello, se les utilizó cultivándolas en multicámaras -
estériles para observar el efecto que tenía la concentración
y el tipo de suero que suele agregarse al medio de cultivo co -
mo complemento , en la formación de dichas estructuras. Se
cuantificaron cuatro características de las ampollas: área to -
tal y área promedio de ocupación, diámetro medio y densidad (-
representada como número de ampollas por centímetro cuadrado
de superficie) encontrándose que los domos o ampollas no res -
ponden de manera significativa a las variables manejadas, si -
no que su formación, distribución, número y tamaño dependen -
más bien de la edad del cultivo y de factores intrínsecos a
él.

I

I N T R O D U C C I O N

Los seres vivos se dividen de acuerdo a su nivel de complejidad orgánica, primeramente en organismos unicelulares y organismos pluricelulares; los organismos unicelulares son aquellos que están constituidos solamente por una célula, -- mientras que los organismos pluricelulares están constituidos por varias (incluso por millones de) células. Las células, a medida que aumenta la complejidad de los organismos en la escala evolutiva, tienden a unirse y especializarse formando tejidos, los cuales son diferentes para vegetales y animales, - de acuerdo a la función específica que desempeñan.

En los vertebrados superiores se pueden distinguir cuatro tipos básicos de tejidos (Ham,1979;Junqueira,1979), éstos se clasifican de acuerdo a su origen embrionario y a las funciones específicas que desempeñan en:

TEJIDO	ORIGEN	FUNCIONES
EPITELIAL	Ectodermo y Mesodermo	Recubrimiento y revestimiento Absorción , Se - creción , Sensorial
CONJUNTIVO	Mesodermo	Sostén, Relleno, Defensa, Nutrición

MUSCULAR	Mesodermo y Ectodermo	Contracción, Movimiento
NERVIOSO	Ectodermo	Sensorial, Trans- misión y conduc-- ción de informa-- ción, Control

Cada uno de estos tejidos tiene gran importancia, - por lo que han sido objeto de constantes estudios para el mejor entendimiento de sus funciones; en el presente trabajo, nos referiremos solamente al tejido epitelial, por considerar que es el primero en aparecer como tal en la historia de la - evolución de los organismos y por la importancia que reviste el hecho de aislar, y al mismo tiempo intercomunicar a los or ganismos con su medio ambiente inmediato.

I - 1 EL TEJIDO EPITELIAL

Un tejido epitelial o epitelio está compuesto por - una o varias capas de células contiguas, que recubren una superficie (interna o externa) del organismo; una de las caras del epitelio está en contacto con el aire o un líquido biológico, mientras que la otra descansa sobre una lámina basal -- que une al epitelio con el tejido conjuntivo subyacente o co-

rion (Maillet, 1980). Los epitelios se clasifican según bases morfológicas de acuerdo a los siguientes criterios: (fig 1 y 2)

I Forma de las Células (superficiales)	Pavimentosas Cúbicas Prismáticas o cilíndricas
II Número de Capas Celulares	Epitelio Simple (1 capa) Epitelio Seudoestratificado (1 capa) Epitelio Estratificado (varias capas celulares)
III Naturaleza o Especialización de Estructuras Superficiales	Sustancias Químicas (cutícula, queratina) Diferenciaciones de la cara apical (cilios, estereocilios, borde estriado, etc.)
IV Especialización de algunas células epiteliales	Células con polo mucoso cerrado Células caliciformes Células pigmentarias

Los epitelios están dotados de propiedades comunes que tienden a mantener su estructura funcional, entre las cuales podemos mencionar:

a) Cohesión.- la cohesión evita la dislocación del

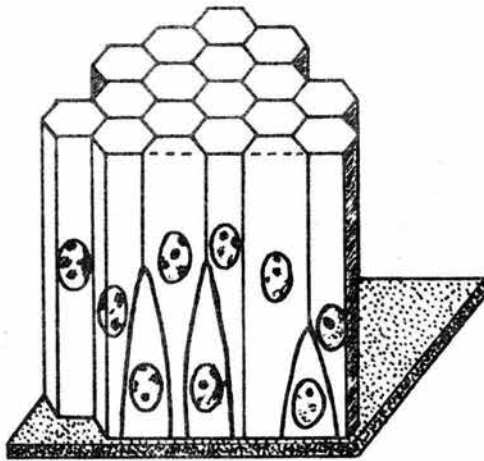


FIG. 1 Epitelio Prismático Pseudoestratificado

La figura 1 representa un epitelio prismático pseudoestratificado, como se puede observar, las células semejan cilindros de altura mayor que el diámetro; al estar agrupadas la base de las células adquiere formas poligonales. Este tipo de epitelios resulta de la yuxtaposición de células que reposan todas sobre la lámina basal, pero no todas llegan a la su perficie.

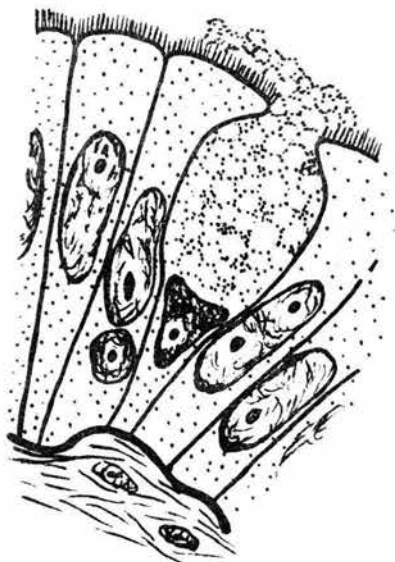


FIG. 2 Célula caliciforme con polo mucoso
abierto.

La figura 2 muestra una célula caliciforme típica al centro con polo mucoso abierto, el mucus es vertido libremente al exterior de la célula; se puede observar que la cara apical de las células se encuentra tapizada por un borde estriado de cilios.

tejido epitelial; está asegurada por interdigitaciones o uniones intercelulares a nivel de las cuales radican las propiedades de adherencia de la membrana plasmática. Las digitaciones aumentan considerablemente la superficie de las células contiguas, aumentando así su cohesión y facilitando también el --- transporte de sustancias diversas. Las uniones intercelulares son especializaciones de la periferia de las células que cumplen una o varias de las siguientes funciones:

- asegurar la cohesión de las células entre sí,
- obturar el espacio intercelular,
- transmitir informaciones de una célula a otra.

Entre estas uniones se distinguen las uniones abiertas, uniones estrechas, comunicantes y desmosomas entre otras.

b) Acoplamiento Electrofisiológico.- el acoplamiento electrofisiológico de las células debido a los tipos de unión prevaecientes en el tejido, determina las posibilidades de - intercambio de información y probablemente, de las sustancias necesarias para el mantenimiento estructural del epitelio.

c) Permeabilidad.- los epitelios son permeables total o parcialmente a ciertas sustancias, así como a las células migradoras; esta permeabilidad asegura la nutrición y defensa de las células epiteliales.

d) Reposición, Cicatrización y Regulación.- un epi-

telio es capaz de renovarse completamente en pocos días, gracias a la migración continua de células que provienen de las capas germinativas en caso que las células superficiales se descamen o destruyan, o bien, a partir de los extremos de una herida, para cubrirla con fragmentos de epitelio nuevo. Los mecanismos de regulación, a veces propios de ciertos epitelios intervienen en su crecimiento y troficidad; éstos mecanismos dependen de hormonas (sustancias elaboradas por grupos celulares situados o no a distancia del epitelio), y en algunos casos de calonas (productos secretados por el propio epitelio) (Maillet, 1980).

Debido a las importantes funciones que desempeñan los diversos tejidos epiteliales (tales como absorción, movimiento, secreción, lubricación, excreción e intercambio entre otras), éstos han sido objeto de innumerables estudios; así, en los últimos 20 años se ha venido obteniendo información sobre los mecanismos que operan en las diferentes membranas epiteliales, lo que ha permitido analizar satisfactoriamente muchos fenómenos fisiológicos, tales como la absorción intestinal, la secreción salival, producción de ácido gástrico, formación de orina, intercambio de sales y agua a través de la piel de los anfibios, etc. En todos estos estudios, la conducta de las membranas epiteliales se ha tratado de explicar en base a las propiedades de las células y las características diferenciales que poseen de acuerdo a la función específica -

que desempeñan, entre otras cosas, se pueden mencionar las polaridades o asimetría de las capas epiteliales y el tipo de unión que predomina en el tejido (Ussing,1949; Curran y Salomon 1957; Diamond,1962; Barry, Diamond y Wright,1971; Biber, Aceves y Mandel,1972).

Generalmente esta información ha sido obtenida en sistemas naturales, como la piel de rana, vejiga urinaria, vesícula, mucosa intestinal y riñón "in vivo" e "in vitro", usándose para ello el epitelio del animal adulto (Ussing,1949; Curran y Salomon,1957; Diamond,1962; Barry, et al,1971; Whittembury,1971; Biber, et al,1972; Ussing, et al,1974). De modo que actualmente se sabe bastante acerca de las propiedades de barrera y de transporte en un epitelio adulto o ya formado lo que no se conoce aún es cómo evolucionan los epitelios, a partir de la diferenciación de las hojas embrionarias hasta adquirir y manifestar sus características diferenciales y propiedades de barrera y asimetría, es decir, cómo, cuándo y por qué se establecen estos mecanismos.

Se han propuesto dos métodos para resolver estas interrogantes:

A) Trabajar con tejidos en formación.

B) Utilizar células en cultivo que conserven las propiedades y características del tejido del cual provienen.

I - 2 TEJIDOS EMBRIONARIOS

El origen embrionario de los tejidos epiteliales que recubren los diversos órganos de un individuo no es único, las células epiteliales derivan de las tres hojas germinativas (Balinsky, 1975). Durante su desarrollo, el embrión pasa por fases que se caracterizan por la asociación de dos y después de tres capas celulares; cada una recibe el nombre de "hoja", - aunque sea el resultado de la yuxtaposición de células (el término de espitelio sólo se utiliza para definir ciertos tejidos después del nacimiento).

Después de la fecundación, el huevo se divide en 2 blastómeras, permaneciendo constante su volúmen. El número de blastómeras aumenta por divisiones consecutivas hasta transformarse en una mórula, que es un grupo compacto de 16 a 32 blastómeras yuxtapuestas. Posteriormente se forma la blástula o blastocito por la penetración entre las células de la mórula de un líquido procedente del medio ambiente, creándose así espacios intercelulares que aumentan y se transforman en una cavidad única, llamada blastocele o cavidad de segmentación. Una vez implantado el blastocito, las células del botón embrionario se dividen en dos capas u hojas:

- el ectoblasto, capa de células prismáticas pequeñas que se separan y forman la cavidad amniótica
- el endoblasto, capa de células cúbicas pequeñas

El siguiente paso en el desarrollo, es la formación de la línea primitiva, que es un canal estrecho en la parte media del embrión hecha por ahuecamiento; el fondo de la línea está ocupado por varias capas de células esféricas, a uno y otro lado, las células cilíndricas se yuxtaponen en una sola capa. Las células esféricas de la línea primitiva migran bajo la hoja ectoblástica, asociándose unas a otras y constituyendo una tercera hoja: el mesoblasto. Así, el embrión desde el principio del desarrollo posee tres hojas, ectoblasto, mesoblasto y endoblasto, de las cuales derivan todos los epitelios del organismo (Maillet, 1980). Por ejemplo, la mayor parte de las células epiteliales que recubren la piel y algunas cavidades naturales (boca, ano y fosas nasales) son de origen ectodérmico; el epitelio que reviste casi todo el tubo digestivo y el árbol respiratorio deriva del endodermo, mientras que los epitelios restantes, como en el caso del riñón, tienen un origen mesodérmico (Tabla # 1).

El estudio de los epitelios en formación presenta serias dificultades para su mantenimiento, debido a que las células aún se encuentran en etapas de diferenciación y requieren tratamientos especiales y costosos, además, la vida media de las células en etapas indiferenciadas es sumamente corta, por lo que se requiere gran cantidad de embriones para el estudio de sólo unas cuantas células, su evolución y funcionalidad.

LA TABLA INDICA EL ORIGEN DE CADA UNO DE LOS EPITELIOS.

TABLA I

ECTODERMO	MESODERMO	ENDODERMO
- Epidermis	- Epitelio del aparato urinario (pelvis renal, uréter, uretra)	- Epitelio del aparato respiratorio (laringe, tráquea, bronquios, alveolos)
- Epitelio de la cavidad bucal y del ano	- Epitelio del aparato genital (tubárico, uterino, vaginal)	- Epitelio del aparato digestivo (esófago, estómago, intestino, colon)
- Porciones epiteliales de los órganos sensoriales (olfato, oído, etc.)	- Mesotelios que limitan las cavidades pleurales, pericárdicas y peritoneales	- Epitelio del conducto faringotimpánico
- Cavidad nasal, seno maxilar	- Endotelios (vasos sanguíneos, linfáticos, cavidad cardiaca)	- Epitelio de la cavidad media del oído
- Porción terminal de los tractos urinario y genital		- Epitelio que reviste la cara interna de la membrana timpánica
- Epitelio anterior de la córnea		- Epitelio que recubre las cavidades mastoideas
- Capa más externa de la membrana timpánica		- Epitelio vesical (excepto el trigono)
		- Porción inferior de la vagina

La segunda opción, utilizar células en cultivo que conserven las propiedades y características del tejido del cual provienen presenta en cambio, grandes ventajas: 1) la clonación permite estudiar una población homogénea de un solo tipo celular. 2) se puede disponer de gran número de células o cultivos para estudios diversos. 3) se pueden controlar las condiciones de crecimiento o desarrollo antes, durante y después de los experimentos, con lo cual se reducen los factores de errores experimentales por influencias externas y 4) es posible usar técnicas genéticas cuyo costo se reduce considerablemente sin afectar mucho las características de las células en comparación con los tejidos "in vivo" (Handler, 1978). Por todas las ventajas que estas técnicas proporcionan, ahondaremos un poco más en el tema.

I - 3 CULTIVO DE TEJIDOS

Los primeros intentos de cultivar tejidos datan de 1885, cuando Wilhelm Roux logró transplantar muestras de embrión de pollo a medio salino templado, en donde se conservaron las células vivas durante varios días; posteriormente, Arnold en 1885 y Jolly en 1903 transfirieron leucocitos (procedentes de ranas y salamandras) a medio salino y suero, logrando observar movimiento y división de las células vivas. Sin embargo, es a Ross Harrison a quien se le considera como el -

"padre" de la técnica de cultivo de tejidos, ya que sus experimentos (realizados en 1907) mostraron que adoptando el método de la gota pendiente usada por los bacteriólogos, no sólo era posible conservar los tejidos vivos "in vitro" durante varias semanas sino que el procedimiento era un método de investigación capaz de aportar una contribución fundamental al conocimiento biológico.

El siguiente aporte importante fue realizado por Alexis Carrel, inventor del matraz que lleva su nombre y reduce considerablemente los riesgos de contaminación en los cultivos; posteriormente los experimentos de Lewis y otros investigadores culminaron con el reemplazamiento de los medios de cultivo naturales (plasma y extracto embrionario) por medios sintéticos elaborados con componentes conocidos, que son los más usados actualmente.

La composición y las propiedades de los medios de cultivo son los factores más importantes para conseguir el éxito en los cultivos de células "in vitro"; para ello el medio de cultivo debe cumplir una serie de requisitos como son:

- 1.- Nutrientes.- debe proporcionar todas las sales, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, vitaminas, etc. necesarias para que las células vivan.
- 2.- Capacidad amortiguadora.- debe poseer amortiguadores no tóxicos que mantengan el pH entre 7.0 y 7.4 aún a pesar de

que las células produzcan sustancias ácidas.

3.- Isotonía.- las sustancias disueltas en el medio tienen que ser isotónicas con respecto al fluido intracelular.

4.- Esterilidad.- los medios tienen que estar exentos de microorganismos, pues si éstos se presentan, encontrarán en el cultivo las condiciones ideales para su desarrollo, lo que destruiría a las células. Para reforzar las condiciones de esterilidad de los medios, se suele agregar a ellos antes de su uso, antibióticos (como la penicilina o la estreptomina) en concentraciones bajas que no sean tóxicas para las células, pero suficientes para inhibir el crecimiento de muchas de las bacterias que pueden contaminar los cultivos accidentalmente.

La composición de los medios sintéticos se obtuvo como resultado del estudio de las necesidades nutricionales de las poblaciones celulares; como ejemplo de un medio sintético completo, de los más usados en la actualidad tenemos al Medio Mínimo Esencial (M.E.M.) de Eagle (Apéndice 1), que contiene 13 aminoácidos y 8 vitaminas, y junto con los electrolitos y la glucosa que se encuentran en la solución salina equilibrada (Apéndice 1) agregada al medio, logra la propagación indefinida de las células "in vitro" en presencia de sólo un 5 a 10 % de suero. La contribución precisa hecha por la pequeña proporción de suero que se añade generalmente a los medios sintéticos no es bien comprendida aún (Sharp, 1980), pare

ce como si ciertas moléculas protéicas (probablemente las γ -globulinas) presentes en el suero ejercieran un efecto beneficioso sobre los cultivos promoviendo la adherencia y la expansión celular y estimulando la división celular, y recientemente se ha sugerido que las hormonas del suero juegan también un papel significativo.

Aún cuando el mantenimiento de las células "in vitro" en un medio totalmente definido es una posibilidad práctica hoy en día, esto es posible solamente para unas pocas cepas celulares muy específicas; la tendencia de las células epiteliales a unirse y formar láminas extensas persiste con mucha frecuencia cuando existe una superficie adecuada en la cual puedan adherirse, y esto hace que las células epiteliales constituyan un recurso invaluable para realizar estudios diversos de fenómenos de transporte, secreción, y en general, para el mejor entendimiento de la funcionalidad de éste tejido.

I - 4 LA LINEA CELULAR MDCK

La línea celular MDCK (Madin and Derby Canine Kidney) fue establecida en 1959 a partir de un riñón de hembra de cocker spaniel, y desde entonces ha sido de gran utilidad para la realización de múltiples estudios, ya que conserva -

gran cantidad de las características diferenciales del epitelio renal.

El epitelio del riñón es uno de los más específicos pues la función de excreción que desempeña es sumamente compleja; la excreción es un mecanismo de depuración de la sangre para la eliminación de los desechos tóxicos y no metabolizables por el organismo, este mecanismo se realiza gracias al transporte activo de las sustancias no metabolizables por las células, lo que indica que las células epiteliales del riñón se encuentran altamente especializadas.

Las células MDCK se comportan como epitelios en cultivo y, al igual que las células del epitelio renal "in situ" conservan su número cromosómico durante largos períodos de tiempo (ocasionalmente, pueden aumentar su número, pero esto depende de la edad del cultivo)(Gaush,1966). Cuando se hace un cultivo de tejidos, las células se comportan en forma semejante a las bacterias en lo que respecta a su curva de crecimiento, por lo que se puede caracterizar a éste con una curva logística; en el caso de las MDCK, la fase logarítmica se alcanza entre los 2 y 5 días, después de lo cual, el cultivo tiende a un asíntota que representa la fase estable o confluyente, en la que las células forman una monocapa uniforme (Apéndice 2) y se detiene el crecimiento acelerado. Las células MDCK se unen entre sí conservando las características mor

fisiológicas del epitelio renal, esto es, se unen a las células de otro tipo (como células musculares o del tejido conjuntivo en el caso de que se inyecten en animales (Leighton, et al, 1968)) o al soporte (cajas de Petri, botellas de cultivo, etc.) por su cara basal, la cara apical se encuentra provista de numerosas microvellosidades, y la unión entre las células se realiza entre las caras basolaterales (fig. 1 y 2) por medio de uniones estrechas y zonas adherentes (Owens, et al, 1974).

Cuando las MDCK alcanzan la fase estacionaria o estado confluyente, se hace evidente su especialización como epitelio de transporte debido a que aparecen en el cultivo unas estructuras características llamadas "blisters", domos o ampollas. La formación de domos o ampollas es un rasgo característico no sólo de las MDCK, sino en general de las células en cultivo que provienen de tejidos epiteliales especializados en transporte, tal es el caso de las células del cuello uterino (Auersperg, 1969); epitelio mamario del ratón (McGrath, 1971); hígado de ratón (Owens, 1974); riñón de cerdo (Smith, 1974); hígado de ratón (Taub, et al, 1980) y riñón de conejo (Chung, 1982) entre otros. La formación de ampollas se debe a la polarización funcional de las células que acumulan iones y agua gracias al transporte entre su cara serosa o basal y el soporte en el cual se encuentran adheridas; dichas -

ampollas son estructuras hemisféricas compuestas por varias - células (fig. 6) y se interpretan fisiológicamente como pro - ductos de la reabsorción intersticial de los componentes del medio, en forma semejante al filtrado glomerular. Después de crecer y mantenerse estables durante uno o dos días, las ampollas se colapsan, retornando entonces los fluidos al medio y adhiriéndose nuevamente las células al soporte (leighton,1968)

Se han realizado diversos experimentos en busca de datos que confirmen que las ampollas son el resultado de un - transporte activo, encontrándose que al quitar iones de Na^+ ; K^+ o introducir ouabaína al medio (la ouabaína es un glucósido tóxico que inhibe el transporte de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$), la formación de ampollas desaparece (Abaza, et al,1974), al i gual que cuando se emplean iones de magnesio y manganeso (Rabito,1978). El efecto contrario, es decir, aumento en la for mación de domos se verifica al agregar al medio cationes diva lentes, AMP cíclico, papaverina y diversos solventes polares (estos elementos incrementan o estimulan la actividad de la - bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$); así como algunas hormonas (vasopresina , oxitocina, prostaglandinas y glucagon, entre otras), lo mismo sucede con sustancias que estimulan una elevación en los nive les de AMP cíclico o inductores de la diferenciación celular (Rabito,1978; Lever,1979; Rindler,1979; Valentich,1979; Taub, 1979).

Otra sustancia que en algunos casos estimula la división celular, crecimiento y diferenciación es el suero que normalmente se agrega al medio como complemento nutritivo para las células, pero éste puede actuar de diversas maneras dependiendo del tipo de células en cultivo, la concentración - que se use y el tipo de suero (fetal, de caballo, etc.), por ejemplo, estudios realizados en 1975 por Holley, indican que algunos tipos de células como las 3T3 (línea celular del embrión de ratón), requieren de los constituyentes del suero para su desarrollo, mientras que las células BCS - 1 (African - green monkey kidney cell) se pueden desarrollar con un mínimo de suero en el medio. Sato y col. (1979) han demostrado que en diversos tipos celulares el suero puede ser reemplazado - por un medio que contenga factores de crecimiento y hormonas, dependiendo éstos del tipo celular empleado.

En 1979, Taub y col., experimentando con las MDCK - muestran que puede haber formación de domos en un medio libre de suero, pero suplementado con hormonas y factores de crecimiento; posteriormente Taylor - Papadimitriou y col. (1980) - encuentran que el suero puede actuar sinérgicamente con la toxina de la cólera y factores de crecimiento para incrementar la tasa de mitosis en células del epitelio mamario en cultivo.

Tomando en consideración que en los trabajos anteriores sólo se menciona la presencia o ausencia de domos, así

como incrementos en el crecimiento de los cultivos, nos propu-
simos determinar el papel que desempeña el suero (tipo y con-
centración) en la formación de ampollas en las células MDCK -
como una manifestación de la especialización y funcionalidad
de éstas, y establecer si el suero ejerce o no efectos en di-
chas estructuras a través del tiempo.

FIG. 5 MONOCAPA DE CELULAS MDCK

Se observan claramente las células MDCK,
así como las uniones entre las células.

FIG. 6 DOMO O AMPOLLA

La figura muestra un domo o ampolla
característica en cultivo de células
MDCK una vez formada la monocapa.

I I

M E T O D O L O G I A

II - 1 CULTIVO CELULAR

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon células MDCK pasajes 61, 62, 65 y 72 libres de contaminantes, - crecidas en botellas Falcon (fig. 3) a 36.5° C en atmósfera - de 5 % de CO₂ y humedad constante (V.I.P. CO₂ Incubator 417, New Brunswick, New Jersey) y 100 ml. de medio mínimo completo de Eagle (CMEM)(Apéndice 1) con sales de Earle (Grand Island Biological Co. (GIBCO)F - 11, Grand Island, N. Y.), 100 U/ml. de penicilina, 100 µg./ml. de estreptomycin y 10 % de suero fetal bovino (GIBCO 671) (Cereijido y col., 1977, 1978).

Cuando las células se encontraron en confluencia, - fueron tratadas con tripsina - EDTA (GIBCO 540) para resem--- brarse en multicámaras estériles de 24 compartimentos (fig.4) (Limbro Chemical co., New Haven, Conn.) con densidad aproxima da a 6.5×10^5 cél./cm². para la realización del experimento correspondiente, según el cual cambian algunas partes del mé- todo general descrito. Las células una vez en las multicáma- ras, se dejan crecer a confluencia a 36.5° C en atmósfera de 5 % de CO₂ y humedad constante con cambio de medio CMEM con - antibióticos y las concentraciones o tipo de suero correspon- dientes cada tercer día para el mantenimiento del cultivo.

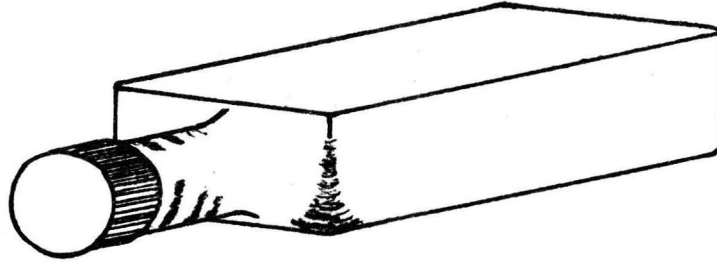


FIG. 3 Botella Falcon de Cultivo.

Se esquematiza una botella falcon típica empleada para el cultivo de células "in vitro" en laboratorio bajo condiciones controladas de cultivo.

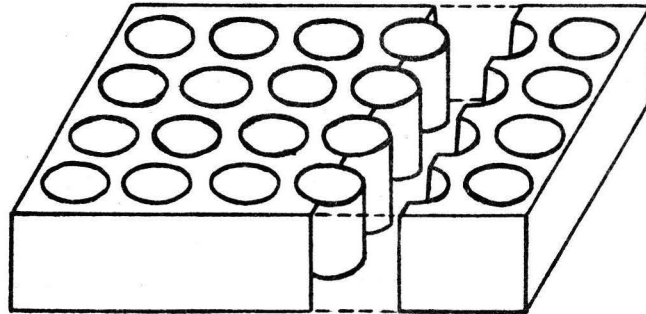


FIG. 4 Multicámara.

El dibujo representa una multicámara de 24 compartimentos individuales frecuentemente empleada en el cultivo celular.

II - 2 DETERMINACION DEL PATRON DE DISTRIBUCION DE AMPOLLAS
EN LAS CELULAS MDCK

Después de dos horas de sembradas las células en la multicámara, se cambió la concentración de suero fetal bovino agregado al medio, manteniéndose constante la concentración y el tipo de antibióticos, quedando:

0.0 % de Suero Fetal Bovino	2 compartimentos
0.8 % " " " "	2 compartimentos
2.0 % " " " "	2 compartimentos
6.0 % " " " "	2 compartimentos
11.0 % " " " "	2 compartimentos
19.0 % " " " "	2 compartimentos

Posteriormente se dejó crecer a confluencia a las células en las condiciones estandarizadas y pasadas 48 horas (después de renovar el medio) se procedió a tomar microfotografías de los distintos cultivos bajo el microscopio óptico (100 X) (esto se hizo para los dos compartimentos de la multicámara correspondientes a las seis diferentes concentraciones de suero). Las fotos fueron tomadas en línea recta, una por milímetro, empleando para ello una rejilla de plástico transparente, siendo el diámetro de los compartimentos de 15 mm. Las fotografías se revelaron (cámara oscura Agfa modelo Rondinax, revelador Dektol, Kodak) e imprimieron (amplificador Veigel Photogerate en papel kodabromide F - 4); posteriormente y

suguiendo el criterio establecido por Sharp (1980) se procedió a recortar las zonas de ampollas para pesarlas en balanza analítica digital (Sartorius 1212 MP) con el fin de obtener una medida relativa del área ocupada por los domos, de acuerdo a las relaciones:

$$A_t : P_t = 100\%$$

$$A_a : P_a = x\%$$

A_t = área total de foto (12 x 17 cm)

P_t = peso total

A_a = área de domos

P_a = peso de domos

x = porcentaje de área ocupada

El porcentaje promedio del área ocupada por las ampollas en cada uno de los campos (uno por milímetro en línea recta para cada uno de los compartimentos fotografiados para cada concentración de suero) se graficó en papel milimétrico (gráficas 1 y 2) para de esta manera determinar el patrón de distribución de las ampollas sobre la superficie de la multicámara y elegir los campos con menor distorsión óptica para la obtención de los resultados en los experimentos subsecuentes.

II - 3 DETERMINACION DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUE-
RO FETAL BOVINO EN LA FORMACION DE AMPOLLAS EN LAS
CELULAS MDCK.

Para esta fase se montaron dos experimentos que a -
continuación se describen:

A) Siguiendo el procedimiento anteriormente des -
crito (Cereijido,1977,1978) se resebraron células MDCK pasa -
je 62 en multicámaras estériles, a las que se les cambió el -
medio de cultivo con diferentes concentraciones de suero fe -
tal bovino a las dos horas de sembradas, quedando de la mane -
ra siguiente:

Concentración de S.F.B.	compartimentos
0.0 %	12
0.8 %	12
2.0 %	12
6.0 %	12
11.0 %	12
19.0 %	12

Se dejó crecer a las células en las condiciones es -
tandarizadas con cambios de medio CMEM con antibióticos y las
distintas concentraciones de suero cada tercer día.

Para registrar el área ocupada por las ampollas o domos a través del tiempo se tomaron microfotografías a las dos horas de efectuada la siembra (una de cada cámara o compartimento) de la zona central como registro previo para asegurar que las células se encontraban en buen estado, posteriormente se tomaron fotografías (en forma similar a la anterior) al primer día (24 hrs. después de la siembra), al 2º, 3º, 6º y 10º día de sembradas las células (una para cada cámara, obteniéndose así 12 repeticiones de cada condición experimental).

B) Debido al alto costo de los experimentos (tanto la experimentación como el procesamiento de los resultados) se decidió disminuir el número de concentraciones de suero a probar; así mismo se modificó ligeramente la metodología con el fin de que las células no sufrieran períodos de ambientación largos al ser cambiadas las concentraciones de suero en el medio, y que esto altere de algún modo los resultados.

Trabajando en forma análoga a la descrita anteriormente, se sembraron 4 botellas Falcon medianas con células MDCK pasaje 65 con diferentes concentraciones de suero fetal bovino (0.0 %, 0.5 %, 5.0 % y 10.0 %) agregado al medio y se esperó a que llegaran a confluencia manteniendo las condicio-

nes estándar; posteriormente se tripsinizaron (tripsina-EDTA) y se les cambió a multicámaras con una densidad aproximada de 6.5×10^5 cél./cm², conservándose las diferentes concentraciones de suero en el medio, quedando:

Suero Fetal Bovino	compartimentos
0.0 %	12
0.5 %	12
5.0 %	12
10.0 %	12

Las células se mantuvieron en las condiciones estandarizadas ya descritas (temperatura constante, ambiente húmedo, etc.) con cambios de medio CMEM con antibióticos cada tercer día, conservándose las diferencias en la concentración de suero empleado.

Para la obtención de los resultados se tomaron fotografías al microscopio óptico de la zoan central de cada compartimento al primer día de sembradas, 2º, 3º, 5º, 7º y 10º día posterior a la siembra de las células, con lo cual se tuvieron 12 repeticiones de cada condición experimental.

II - 4 EFECTO DEL TIPO DE SUERO EN LA FORMACION DE AMPOLLAS
EN LAS MDCK A TRAVES DEL TIEMPO.

Se procedió en forma similar a la de los experimentos anteriores, sembrándose 3 botellas Falcon medianas (pasa-je 72) y agregándose al medio CMEM con antibióticos diferentes tipos de suero (Fetal Bovino, de Ternera y de Caballo)(to-dos marca GIBCO) a una concentración del 10 % (es la normal - en el cultivo celular); manteniéndose las condiciones preesta-blecidas para su crecimiento.

Una vez que las células se encontraron en estado -confluyente, se les trató con tripsina-EDTA para resembrar en multicámaras con una densidad de 6.5×10^5 cél./cm² teniendo:

Suero Fetal Bovino	12 compartimentos
Suero de Ternera	12 compartimentos
Suero de Caballo	12 compartimentos

Las células se mantuvieron bajo condiciones estándar y cambios de medio cada tercer día. Las fotografías para el -registro de datos se tomaron de la zona central de cada compar-timento al 2º, 4º, 5º, 7º y 10º día de sembradas las células.

I I I

R E S U L T A D O S

Y

D I S C U S I O N

III - 1 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Para la determinación del efecto de la concentración y el tipo de suero en la formación y desarrollo de los domos en las células MDCK, se registraron los datos del número de ampollas, su área y diámetro promedio a través del tiempo de cultivo, empleando para ello una modificación al método propuesto por Sharp (1980) que originalmente consiste en proyectar una imagen del cultivo sobre papel de gráfica a un aumento conocido para enseguida señalar sobre el papel la zona de interés, y contando el número de cuadrículas ocupadas, o cortando el papel por los bordes marcados y pesándolos, obtener una medida del área ocupada por las células que nos interesan. La modificación consistió en tomar microfotografías de los cultivos para la obtención de los resultados; este método tiene la ventaja de no interferir con la vitalidad del cultivo y puede realizarse a intervalos regulares en el mismo cultivo.

Una vez obtenidas las fotos (condiciones estándar, sin orillas) se pesaron de una en una en balanza analítica digital (Sartorius 1212 MP) y se recortaron las ampollas, pesándose para estimar la fracción relativa de área que les correspondía, para después procesar los datos (computadora WANG -- 2200-T con 16 K de memoria) de la manera siguiente.

Obtención del área real de cada ampolla mediante la fórmula:

$$A_{rb} = (\% A \times A_{rc}) / 100$$

donde: A_{rb} = área real de ampolla

A_{rc} = área real del campo

(432880.6 μ^2)

$\% A$ = área relativa de cada ampolla

Para obtener el área promedio de cada ampolla tenemos:

$$\bar{A} = \sum A_{rb} / n$$

\bar{A} = área promedio de c/ampolla

n = # de ampollas observadas en
el campo

Obtención del diámetro promedio de las ampollas con:

$$\bar{D} = \sum D_{bi} / n \quad \text{y:}$$

$$D_{bi} = 2 \sqrt{\frac{A_{rb}}{\pi}}$$

Obtención de la densidad de ampollas por cm^2 con la fórmula:

$$n / \text{cm}^2 = \frac{100\ 000\ 000 \times n}{A_{rc}}$$

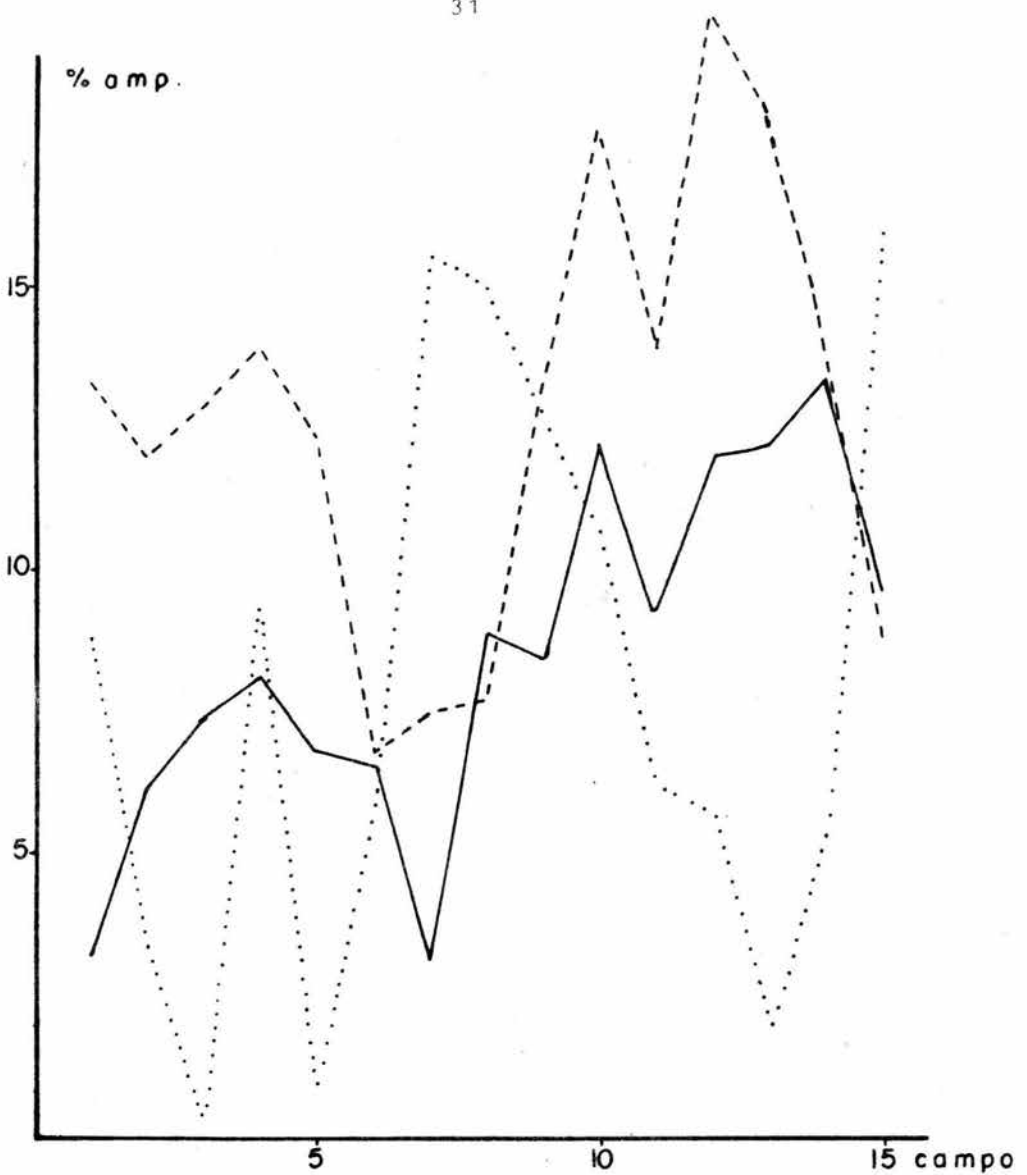
En cada una de las estimaciones promedio se calculó la varianza, el error estándar y los límites de confianza pa-

ra la estimación de la media con un 0.05 de significancia (-95 % de confianza). Posteriormente, con los datos obtenidos se realizaron una serie de comparaciones entre las posibles combinaciones de las variables suero y tiempo, usando para ello la prueba de "t" , con el fin de averiguar a partir de cuándo o entre qué concentraciones o sueros se manifiestan posibles diferencias y su grado de significancia.

Los programas empleados se anexan en el apéndice 3.

III - 2 DISTRIBUCION DE LAS AMPOLLAS

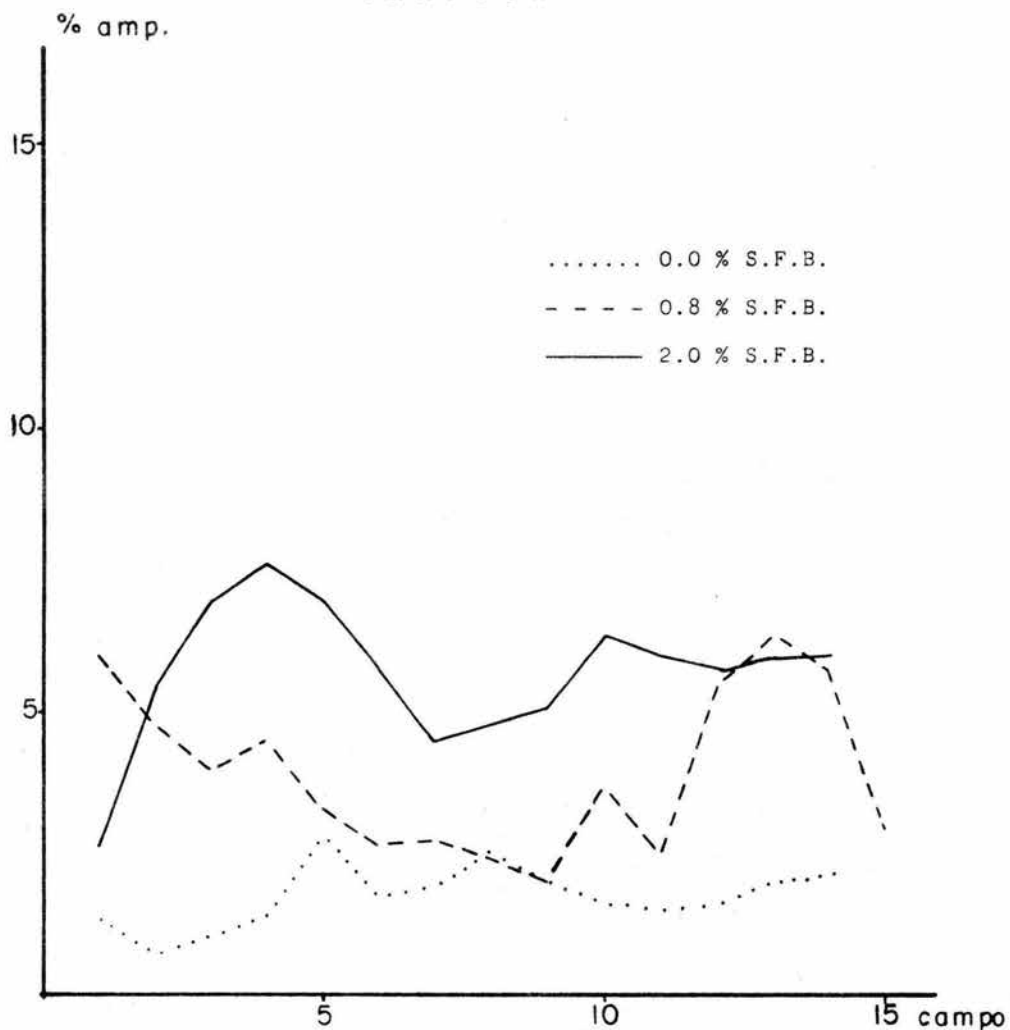
De los resultados obtenidos para esta etapa, se puede observar en las gráficas 1 y 2 que la distribución de las ampollas en las células MDCK sobre el fondo de las multicámaras es al azar, esto es, que no existe un patrón definido de distribución (contagiosa, ordenada, etc.): sino que más bien ésta depende de la velocidad en la formación de la monocapa o del estado de confluencia de las células, o sea que en los sitios en donde primero se establecen las células y se adhieren unas a otras para formar la monocapa, es en donde primero aparecen los domos o blisters, de ahí su distribución heterogénea en la superficie de la multicámara.



G R A F I C A 2

En esta gráfica se observa la distribución de las ampollas en las células MDCK para las concentraciones de 6.0% (línea continua), 11.0 % (línea discontinua) y 19.0 % (línea

GRAFICA 1



La gráfica muestra el comportamiento heterogéneo de la distribución de los domos a lo largo del diámetro de las cámaras de cultivo para las tres primeras concentraciones de Suero Fetal Bovino empleadas para ello.

punteada) de Suero Fetal Bovino agregado al medio. Se ve claramente que la distribución de las ampollas a lo largo de la cámara de siembra no sigue un patrón definido, lo que indica que las ampollas o domos se distribuyen al azar.

III - 3 LA CONCENTRACION DEL SUERO

En los dos experimentos para la concentración del Suero Fetal y en el de Tipo de Suero, se tienen los valores - obtenidos para cuatro características de los domos muestradas: área total, área promedio, diámetro medio y densidad representado como número de domos por centímetro cuadrado de su superficie.

EXPERIMENTO A

Los resultados de este experimento se muestran en - las tablas 2, 3, 4 y 5 de donde resultan las gráficas 3, 4, 5 y 6. Analizando la gráfica 3, donde se representa el comportamiento del área total de ampollas a través del tiempo para las 6 concentraciones de suero empleadas, tenemos que para - las distintas concentraciones el área de ampollas disminuye conforme pasa el tiempo, esto quiere decir que a medida que - el cultivo envejece, la superficie total ocupada por los domos es menor, aunque esto no se establece en forma lineal, ya que la superficie de las estructuras es menor al 10º día de - experimentación para las concentraciones de 2.0 y 0.8 % de - suero, asimismo, existen diferencias en cuanto a los máximos alcanzados, teniendo las concentraciones 11.0 y 0.8 % los picos más altos en la superficie ocupada por los domos al 1º y

6º día de cultivo, cuando éste aún se encuentra en etapa de - proliferación celular lenta. Con el área promedio de las am pollas la tendencia no es uniforme debido a que las ampollas más grandes se localizan en la concentración de 19 % de suero al tercer día de experimentación, mientras que para el resto de las concentraciones el tamaño (área promedio) es semejante y siempre mucho menor con respecto a esta última concentra -- ción (tabla 3, gráfica 4). Esto mismo ocurre con la tercer característica considerada, el diámetro medio de los domos (- tabla 4, gráfica 5).

Por lo que respecta al número de domos por centímetro cuadrado de superficie (densidad)(tabla 5) se observa que hay, en general, mayor densidad en las concentraciones bajas de suero (0.0 y 0.8 %) a lo largo del periodo experimental; - en las concentraciones medias (2.0 y 6.0 %) la densidad de am pollas es mayor en los tres primeros días de tratamiento al i gual que en la concentración de 11.0 %, mientras que para la concentración más elevada (19.0 %) la densidad es siempre menor a la observada para las otras concentraciones, siendo en el tercer día cuando aparecen menos ampollas por unidad de su perficie esto, si consideramos los resultados de área prome - dio y diámetro (son los valores más altos) indica que es en - el tercer día para esta concentración cuando las ampollas son más grandes, pero debido a su tamaño hay pocas ampollas en la

multicámara, lo cual se puede explicar en términos de edad de el cultivo, pues se considera normalmente, que las células en cultivo se encuentran en perfectas condiciones (cultivo maduro) entre los 2 y 6 días de efectuada la resiembra (Sharp, - 1980)(gráfica 6).

EXPERIMENTO B

Los resultados obtenidos para este experimento se encuentran contenidos en las tablas 6, 7, 8, y 9, que corresponden a las características de área total (gráfica 7), área promedio (gráfica 8), diámetro medio (gráfica 9) y densidad de los domos (gráfica 10) respectivamente.

Contrariamente a lo que se pudiera esperar, los comportamientos de estas cuatro características no se asemejan a los del experimento anterior, aún cuando las cuatro concentraciones de suero fetal empleadas no difieren considerablemente de las utilizadas para el experimento A:

Experimento A	Experimento B
0.0 %	0.0 %
0.8 %	0.5 %
6.0 %	5.0 %
11.0 %	10.0 %

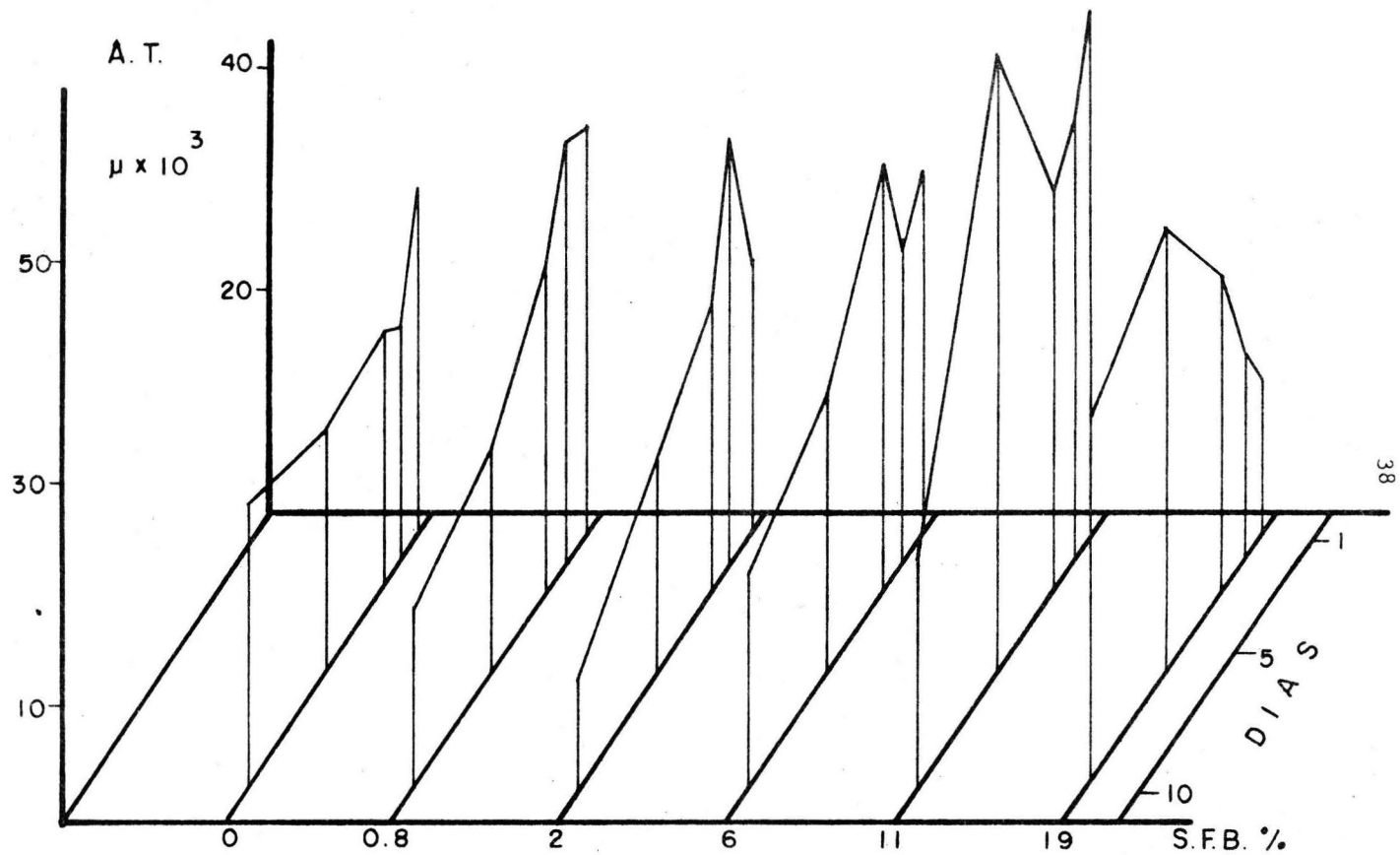
Estas diferencias pudieran deberse a que las células

T A B L A 2

AREA TOTAL DE AMPOLLAS

		D I A S					
		1	2	3	6	10	
C O N C E N T R A C I O N	0.0 Z	$\bar{X}_y =$	34017.92	21473.63	23952.36	22571.84	26000.97
		$S^2 =$	353282330	45041498	141402026	114376479	57606874
		n =	12	11	12	12	12
	0.8 Z	$\bar{X}_y =$	37044.12	37989.06	29989.61	20796.66	16430.34
		$S^2 =$	131008285	186863572	291621823	85930518	37053602
		n =	12	8	12	12	12
	2.0 Z	$\bar{X}_y =$	24549.38	38393.80	25964.54	28367.03	10097.66
		$S^2 =$	280133138	397461226	181592538	66306158	111103694
		n =	11	8	12	12	12
	6.0 Z	$\bar{X}_y =$	32876.92	28877.06	38491.74	25491.62	19694.62
		$S^2 =$	609174125	339322522	419048148	126510606	228535702
		n =	12	11	12	12	12
11.0 Z	$\bar{X}_y =$	47467.88	41082.89	36461.89	56157.24	20572.29	
	$S^2 =$	323167646	488627178	174377731	1831984959	199460567	
	n =	12	12	12	12	12	
19.0 Z	$\bar{X}_y =$	14721.91	19878.60	28960.43	40827.85	33630.85	
	$S^2 =$	449437916	133586614	2210518392	1690869300	423287930	
	n =	12	12	12	12	12	

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 n = TAMAÑO DE LA MUESTRA



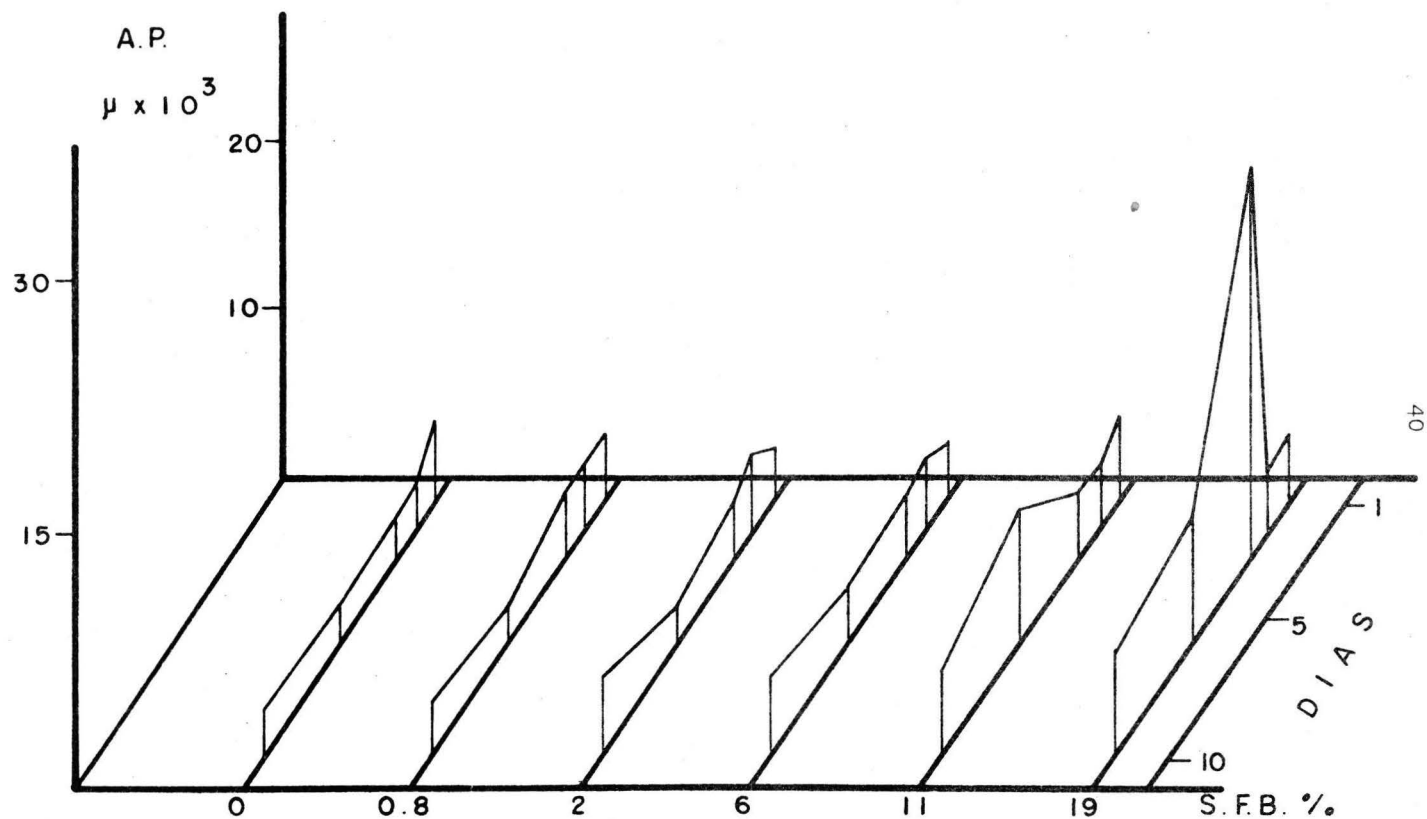
GRAFICA 3 El eje de las absisas representa la concentración de suero, las ordenadas el área total ocupada por domos en micras y en el eje de las z el tiempo de cultivo.

T A B L A 3

AREA PROMEDIO

		D I A S					
		1	2	3	6	10	
C O N C E N T R A C I O N	0.0 X	$\bar{X}_2 =$	4970.32	3873.74	2447.66	2455.82	2879.72
		$S^2 =$	4347278	1498222	339853	1831887	688959
		$n =$	12	11	12	12	12
	0.8 X	$\bar{X}_2 =$	4218.86	4056.93	4018.38	2031.38	3536.81
		$S^2 =$	1466359	1797956	4518609	178062	4059683
		$n =$	12	8	12	12	12
	2.0 X	$\bar{X}_2 =$	3503.33	4677.61	3670.93	2315.74	4711.00
		$S^2 =$	3699102	3504795	5275590	337853	14634045
		$n =$	11	8	12	12	12
	6.0 X	$\bar{X}_2 =$	3700.79	4452.51	3733.15	3392.77	4752.06
		$S^2 =$	2075635	2899390	1925630	1682854	2864223
		$n =$	12	11	12	12	12
11.0 X	$\bar{X}_2 =$	5561.49	4463.07	4331.82	8138.02	5278.33	
	$S^2 =$	4186700	2198075	2344549	40235855	6704153	
	$n =$	12	12	12	12	12	
19.0 X	$\bar{X}_2 =$	4172.62	3392.35	23227.43	7792.96	6431.47	
	$S^2 =$	4935091	1677850	2234253266	94873337	21971886	
	$n =$	12	12	12	12	12	

\bar{X}_2 = MEDIA DE LA MUESTRA
 S^2 = VARIANZA DE LA MUESTRA
 n = TAMAÑO DE LA MUESTRA



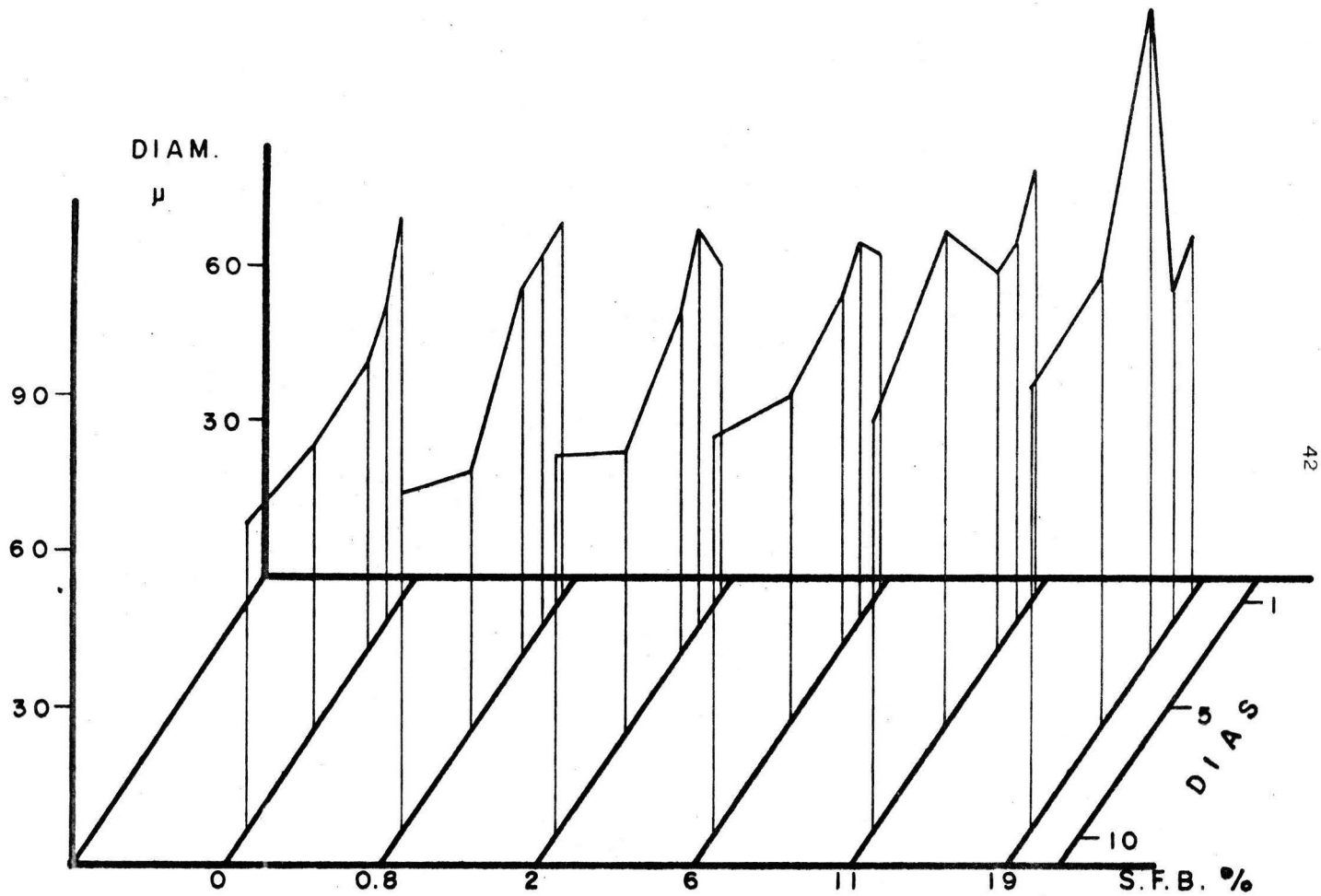
G R A F I C A 4 Muestra el comportamiento de el área promedio de los domos para 6 concentraciones de Suero Fetal a través del tiempo .

T A B L A 4

DIAMETRO MEDIO

		D I A S					
		1	2	3	4	11	
C O N C E N T R A C I O N	0.8 Z	$\bar{X}_y =$	78.86	61.49	55.49	55.85	59.96
		$S^2 =$	256.9	145.6	41.1	104.7	78.2
		$n =$	12	11	12	12	12
	0.8 Z	$\bar{X}_y =$	72.61	71.82	69.86	58.68	65.18
		$S^2 =$	109.1	138.8	256.9	28.5	278.4
		$n =$	12	8	12	12	12
	2.0 Z	$\bar{X}_y =$	64.39	76.13	66.89	53.92	73.39
		$S^2 =$	341.8	181.7	334.4	44.3	666.5
		$n =$	11	8	12	12	12
	6.0 Z	$\bar{X}_y =$	67.35	73.96	67.77	64.78	76.68
		$S^2 =$	191.7	219.3	174.2	145.5	185.8
		$n =$	12	11	12	12	12
11.0 Z	$\bar{X}_y =$	82.92	74.31	73.26	95.71	79.79	
	$S^2 =$	224.3	174.6	162.8	1309.2	386.5	
	$n =$	12	12	12	12	12	
19.0 Z	$\bar{X}_y =$	78.96	64.64	129.81	87.66	86.11	
	$S^2 =$	382.7	152.9	13880.8	2441.8	845.7	
	$n =$	12	12	12	12	12	

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 $n =$ TAMAÑO DE LA MUESTRA



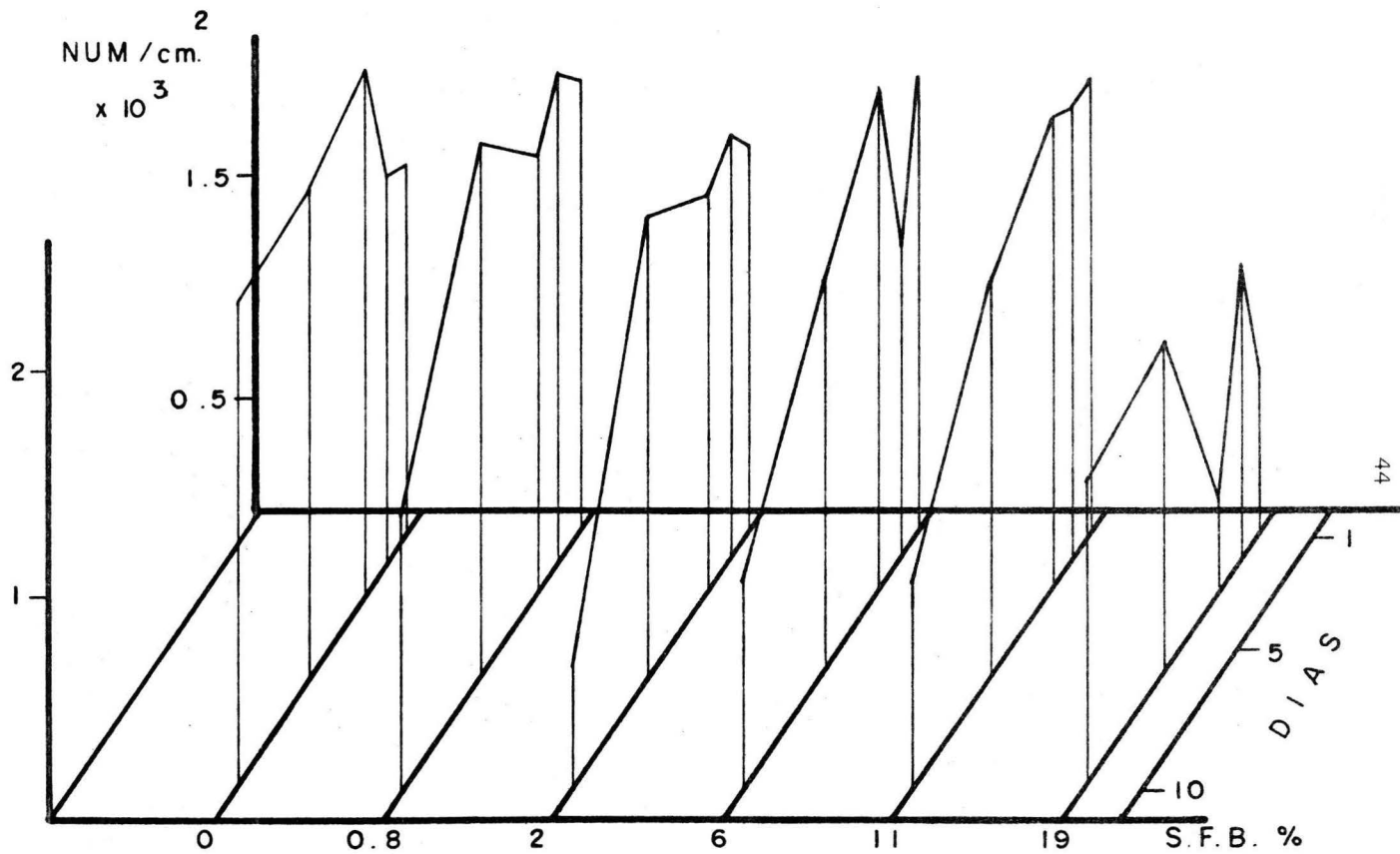
GRAFICA 5 Se observa el patrón de comportamiento del diámetro medio de los domos a través de los 10 días de experimentación.

T A B L A 5

DENSIDAD

		D I A S					
		1	2	3	4	10	
C O N C E N T R A C I O N	0.0 Z	$\bar{X}_y =$	1655.58	1722.08	2329.36	2175.35	2175.35
		$S^2 =$	376795	270710	1168793	693352	363454
		$n =$	12	11	12	12	12
	0.8 Z	$\bar{X}_y =$	2040.59	2194.60	1944.34	2387.11	1232.05
		$S^2 =$	114817	426927	1110576	1002631	333132
		$n =$	12	8	12	12	12
	2.0 Z	$\bar{X}_y =$	1751.83	1934.71	1790.33	2059.84	558.27
		$S^2 =$	1042656	669932	825958	373156	227613
		$n =$	11	8	12	12	12
	6.0 Z	$\bar{X}_y =$	2059.84	1428.06	2252.35	1751.83	943.29
		$S^2 =$	2585415	606430	825958	586620	266425
		$n =$	12	11	12	12	12
11.0 Z	$\bar{X}_y =$	2059.84	2059.84	2136.85	1771.08	924.04	
	$S^2 =$	538106	625432	1087936	236103	203760	
	$n =$	12	12	12	12	12	
19.0 Z	$\bar{X}_y =$	731.53	1347.56	423.52	1501.57	1386.06	
	$S^2 =$	745505	590259	260360	334749	640390	
	$n =$	12	12	12	12	12	

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 $n =$ TAMAÑO DE LA MUESTRA



G R A F I C A 6 Representa el desarrollo de los domos en cuanto a su densidad o número de domos por centímetro cuadrado de superficie.

fueron colocadas en medio de cultivo con las respectivas cantidades de suero 72 horas antes de ser sembradas en las multi cámaras en este experimento, por lo que se encontraban mejor adaptadas a las condiciones de experimentación (diferentes - concentraciones de suero fetal). Es quizá por esto que la - tendencia general de las gráficas obtenidas para las cuatro - características cuantificadas es semejante en las cuatro con- centraciones de suero empleadas, cosa que no sucedía en el ex perimento anterior.

En general se puede decir que el segundo día poste- rior a la siembra de las células es cuando se alcanzan los va lores más elevados para el área total ocupada por los domos, y entre el 5º y 6º día para las cuatro concentraciones de sue ro se presentan los valores más bajos (ver tabla 6) volviendo a elevarse posteriormente, pero sin llegar a los obtenidos en el segundo día, para después (del 8º día en adelante) volver a disminuir su área de ocupación; este comportamineto es seme- jante para el área promedio y el diámetro medio de las ampo- llas, que en realidad difieren sólo en la magnitud de sus res pectivas unidades de medición, presentando la misma tendencia de comportamiento.

Si sobreponemos las gráficas 8 y 9, podremos ver -- que los valores más bajos (tablas 7 y 8) fueron obtenidos en

el sexto día, cuando el cultivo (Sharp, op cit) empieza a envejecer; al 2º día (cultivo en fase exponencial) es cuando se presentan los valores más elevados, que son superados para ambas características y en todas las concentraciones al 10º día de experimentación, una posible explicación para esto sería - la renovación de la mayor parte de las células que forman la monocapa, pues a partir del octavo día de sembradas las células se observa la formación de capas dobles de células principalmente en las zonas cercanas a las orillas de los compartimentos, sin que se encuentren signos de contaminación en el medio de cultivo, en el cual sólo se observa al momento de hacer la renovación del mismo, gran cantidad de desechos celulares.

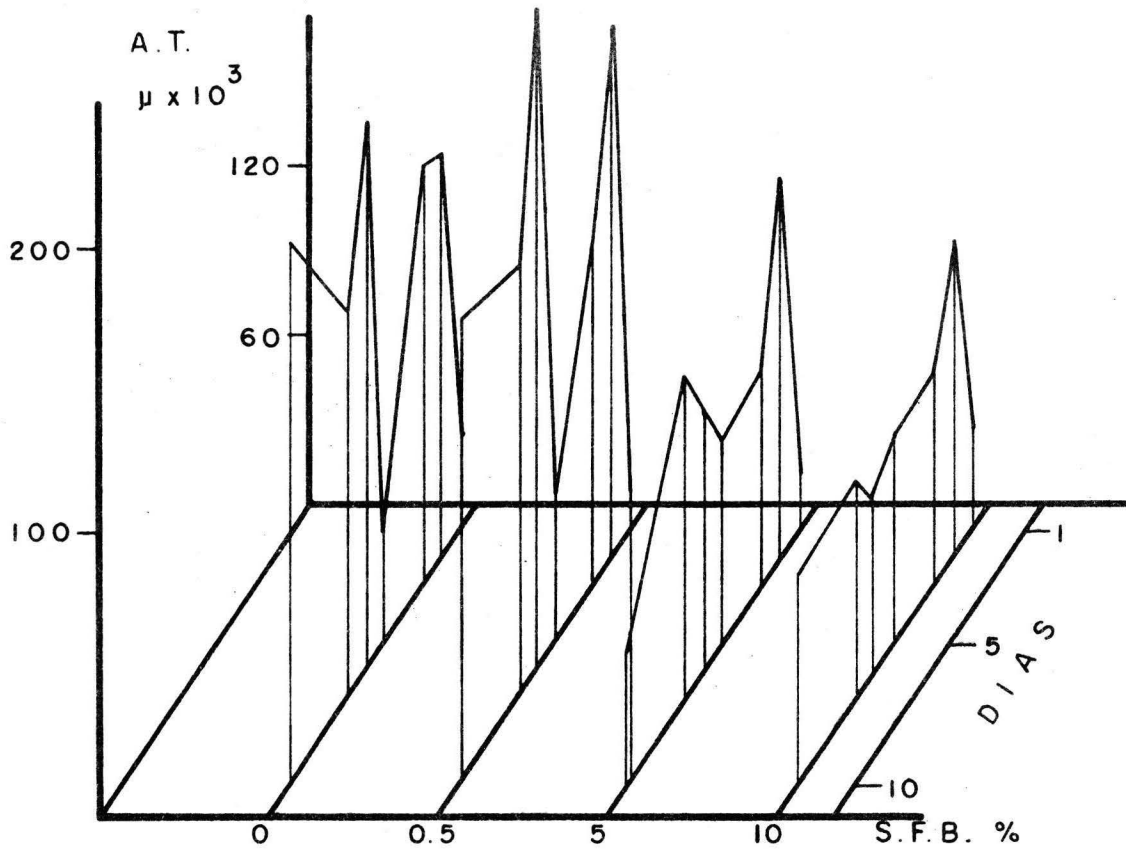
Por último, las variaciones que sufre la densidad (Núm./cm²) de las ampollas para las cuatro concentraciones de suero empleadas son idénticas, pero inversas (aunque no proporcionales) a las observadas para el área promedio y diámetro; esto es, cuanto mayor es el diámetro de los domos (2º y 10º día posterior a la siembra) menores son los valores obtenidos para la densidad de los mismos, y viceversa (tablas 8 y 9 ; gráficas 9 y 10).

T A B L A 6

AREA TOTAL

		D I A S							
		1	2	3	5	6	7	10	
C O N C E N T R A C I O N	0.0 %	$\bar{X}_2 =$	35189.96	144580.15	150427.94	37985.56	192686.54	139852.97	193047.79
		$S^2 =$	451302464	1730186198	1374108284	498196297	3501190828	3205044014	20205646685
		n =	12	12	12	12	12	12	12
	0.5 %	$\bar{X}_2 =$	14702.07	187071.72	126144.73	50801.74	234874.37	154811.57	165230.25
		$S^2 =$	118775317	1592430511	967543703	283710420	4510590840	799146518	21119192470
		n =	12	12	12	12	12	12	12
	5.0 %	$\bar{X}_2 =$	21400.62	134241.09	75301.70	72803.93	94598.22	155507.83	46957.77
		$S^2 =$	195615055	423750980	273893025	1859916139	2103787070	1652912619	342997055
		n =	12	12	12	12	12	12	12
	10.0 %	$\bar{X}_2 =$	36348.33	112659.13	77970.51	76585.97	79639.62	98514.44	75064.31
		$S^2 =$	1019775490	627653602	709778627	963257053	1875235025	1572927609	4070447811
		n =	10	12	12	12	12	12	12

$\bar{X}_2 =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 n = TAMAÑO DE LA MUESTRA



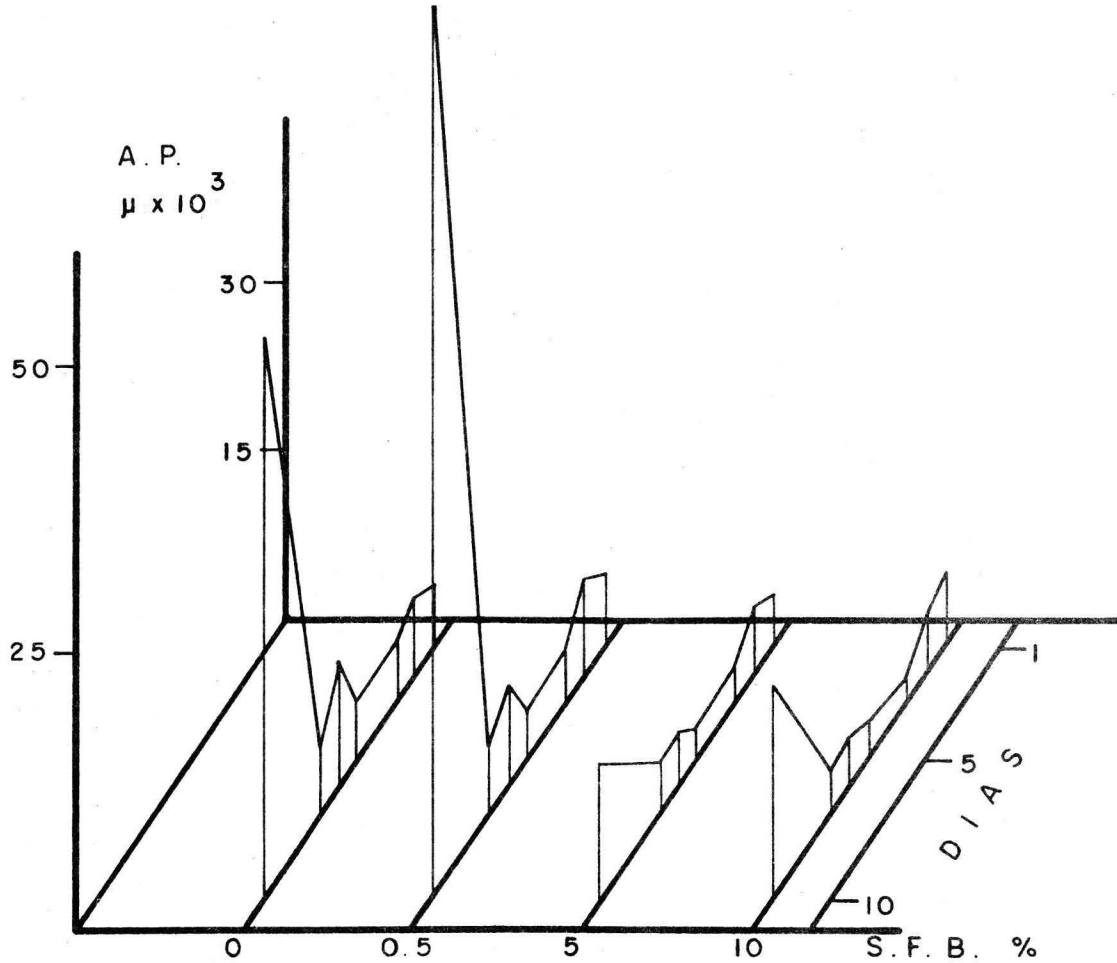
G R A F I C A 7 Se grafican los valores obtenidos para el área total de amnion a través de 10 días de experimentación con suero fetal bovino

T A B L A 7

AREA PROMEDIO

		D I A S							
		1	2	3	5	6	7	10	
C O N C E N T R A C I O N	0.0 %	\bar{X}_y =	5773.35	7732.82	5425.38	4979.20	11143.32	6261.00	50277.78
		S ² =	15336293	3974324	2518743	3389789	4943533	1949877	11393415457
		n =	12	12	12	12	12	12	12
	0.5 %	\bar{X}_y =	6497.20	8472.17	4481.63	3993.86	9175.56	5402.38	82949.48
		S ² =	28286707	1554452	652217	564598	3388172	449382	25554387795
		n =	12	12	12	12	12	12	12
	5.0 %	\bar{X}_y =	5892.84	6811.64	2945.54	2966.85	5887.82	4774.27	12184.36
		S ² =	16457896	878634	239388	386822	3221145	1212481	676133477
		n =	12	12	12	12	12	12	12
	10.0 %	\bar{X}_y =	6586.26	5374.94	2675.52	3772.80	4388.95	4215.18	19888.88
		S ² =	35253189	669765	129488	985517	1289518	1338498	1287616964
		n =	12	12	12	12	12	12	12

\bar{X}_y = MEDIA DE LA MUESTRA
 S² = VARIANZA DE LA MUESTRA
 n = TAMAÑO DE LA MUESTRA



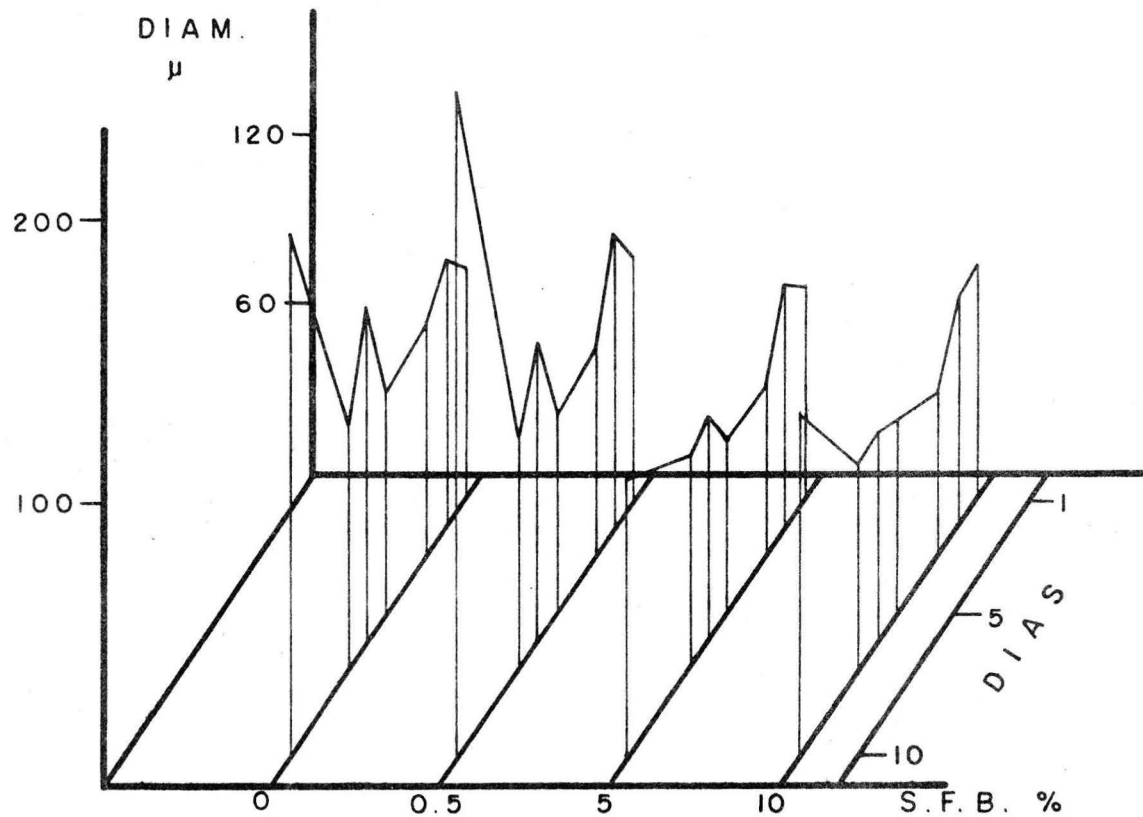
G R A F I C A 8 Nos muestra el patron general de el área promedio de los domos para cuatro concentraciones de suero a través del tiempo.

T A B L A 8

DIAMETRO MEDIO

			D	I	A	S			
			1	2	3	5	6	7	11
C O N C E N T R A C I O N	1.0 Z	$\bar{X}_y =$	82.84	95.22	82.36	77.79	118.49	88.82	193.96
		$S^2 =$	352.9	154.7	135.2	315.1	162.2	98.5	28794
		$n =$	12	12	12	12	12	12	12
	0.5 Z	$\bar{X}_y =$	85.89	103.61	75.27	71.03	107.58	82.79	230.37
		$S^2 =$	976.3	57.5	43.8	42.4	117.9	25.9	57320
		$n =$	12	12	12	12	12	12	12
	5.0 Z	$\bar{X}_y =$	77.11	87.23	61.06	61.22	79.36	77.41	99.08
		$S^2 =$	587.6	49.7	23.5	31.8	196.1	94.9	6213
		$n =$	12	12	12	12	12	12	12
	10.0 Z	$\bar{X}_y =$	84.69	82.51	58.24	68.83	74.25	72.35	121.77
		$S^2 =$	1234	38.5	15.5	71.4	82.3	143.9	10215
		$n =$	10	12	12	12	12	12	12

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 $n =$ TAMAÑO DE LA MUESTRA



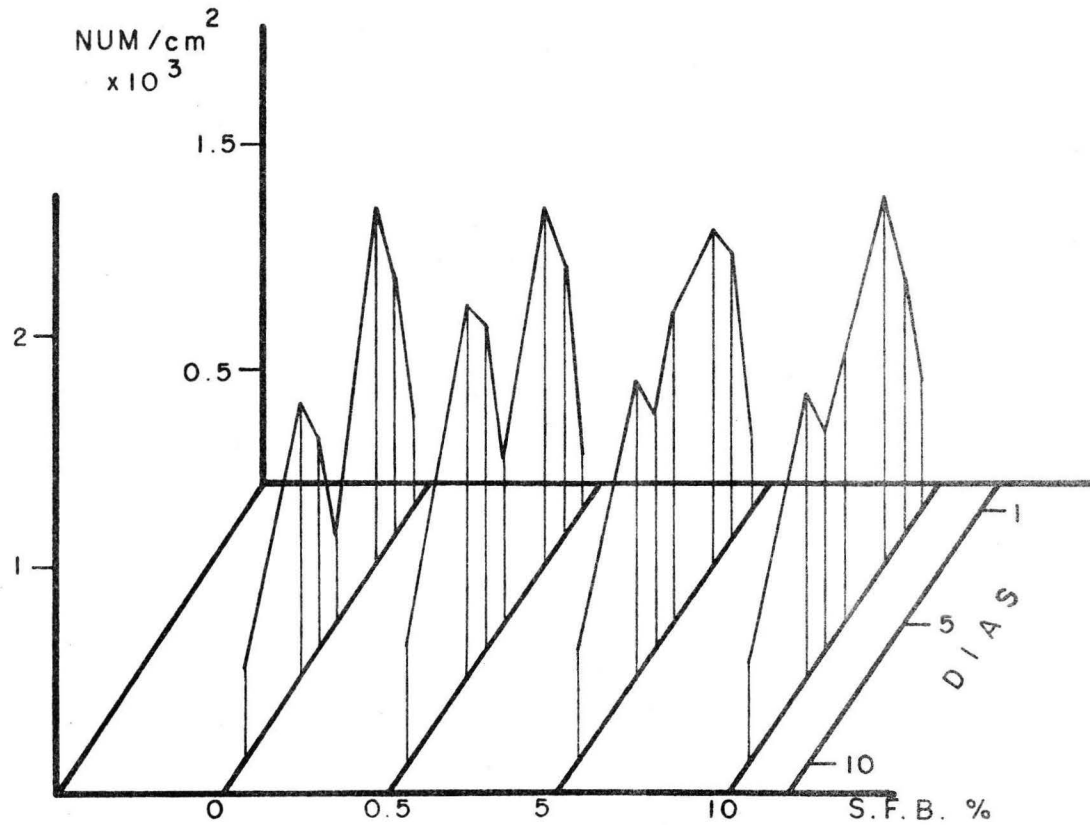
G R A F I C A 9 Muestra el comportamiento del diámetro medio de las ampoullas en las MDCK a través del tiempo para las concentraciones de suero fetal empleados en el experimento B.

T A B L A 9

DENSIDAD

		D I A S							
		1	2	3	5	6	7	10	
C O N C E N T R A C I O N	0.0 Z	$\bar{X}_7 =$	489.74	1149.18	1591.90	386.20	956.98	1233.96	433.29
		$S^2 =$	37821	80338	47525	41717	69376	147997	52788
		$n =$	12	12	12	12	12	12	12
	0.5 Z	$\bar{X}_7 =$	782.52	1248.08	1601.32	711.17	1458.60	1648.41	527.49
		$S^2 =$	73496	38596	108215	24658	69884	152062	348869
		$n =$	12	12	12	12	12	12	12
	5.0 Z	$\bar{X}_7 =$	320.26	1271.63	1497.70	1384.67	1059.69	1323.44	508.65
		$S^2 =$	55365	72359	196587	347004	112159	207016	56333
		$n =$	12	12	12	12	12	12	12
	10.0 Z	$\bar{X}_7 =$	548.22	1182.15	1643.70	1196.28	974.92	1276.34	461.56
		$S^2 =$	182458	75738	183786	234530	132485	266708	145093
		$n =$	10	12	12	12	12	12	12

$\bar{X}_7 =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 $n =$ TAMAÑO DE LA MUESTRA



G R A F I C A 10 Se observan las variaciones en la densidad de los domos a lo largo del tiempo experimental en células MDCK para 4 concentraciones de suero fetal bovino agregado al medio de cultivo.

III - 4 EL TIPO DE SUERO

De este experimento se puede apreciar, en primer término, que el patrón de comportamiento en el número y tamaño de los domos es completamente diferente al observado en los experimentos anteriores, aún cuando en todos ellos se empleó suero fetal bovino a una concentración semejante (10 %); y en segundo lugar tenemos que para las cuatro características registradas, la conducta seguida por las ampollas es similar, variando sólo en magnitud dependiendo del tipo de suero empleado.

Para el área total (tabla 10, gráfica 11) los máximos valores (137, 87 y 190×10^3 μ para suero fetal, de ternera y de caballo respectivamente) se obtienen pasado un día de efectuada la siembra de las células, después de lo cual decae la zona de ocupación de los domos, presentándose en el cuarto día los valores más bajos para aumentar posteriormente, aunque sin alcanzar los valores anteriores. Las gráficas obtenidos para las características de área promedio y diámetro de las ampollas son idénticas, variando solamente en las magnitudes de la unidad de medición (tablas 11 y 12); como se puede ver las gráficas 12 y 13 obteniéndose los valores más elevados al 1º y 7º día posterior a la siembra de las células, y los valores más bajos se presentan en el 4º día (

948 x 10³ μ en S.F.; 499 x 10³ μ en S.T.; 1536 x 10³ μ en S.C. para área promedio y 33.7 μ en S.F.; 24.1 μ en S.T.; 44.1 μ en S.C. para el diámetro medio).

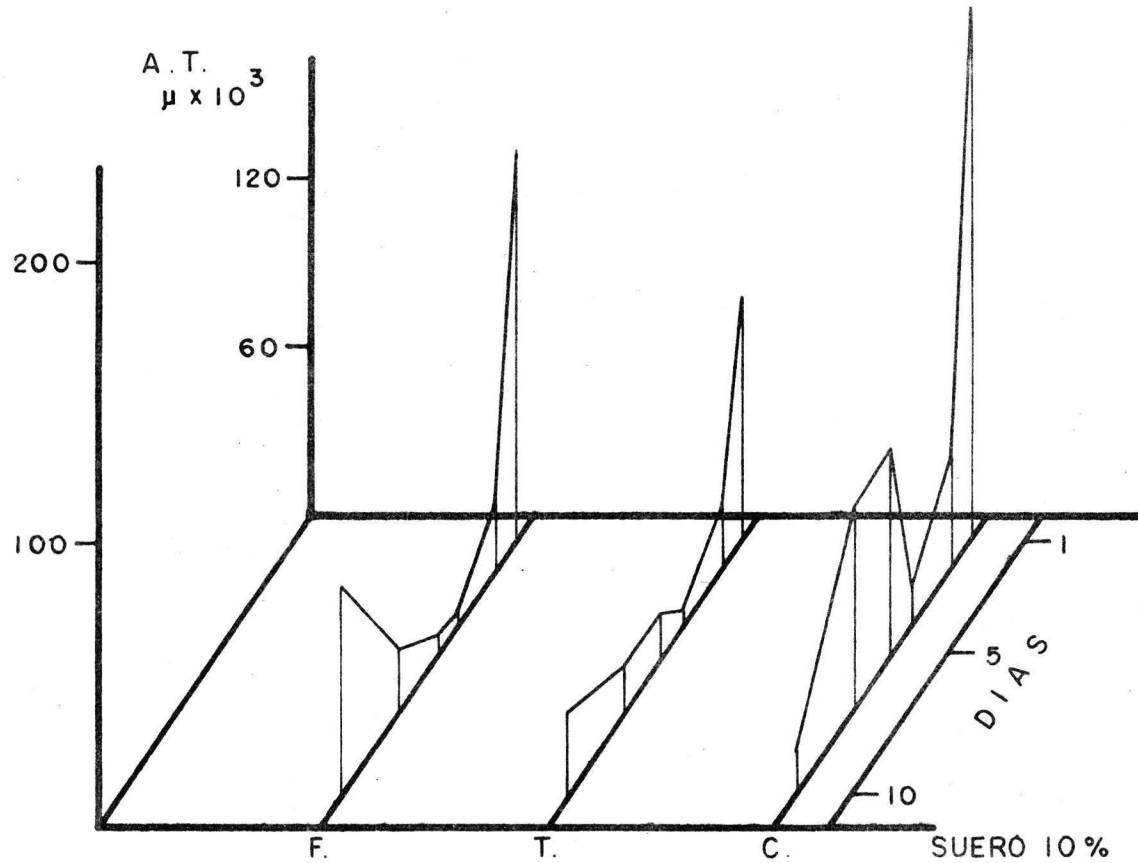
Por lo que respecta a la densidad (tabla 13) se observa claramente en la gráfica 14 que las variaciones que sufre a través del tiempo no son las mismas para los tres sueros, así mismo, no representa un patrón inverso al presentado en las dos características anteriores, como sucedía con las concentraciones de un solo suero (experimento B) donde la densidad es inversa al diámetro y área promedio de las ampollas, esto se puede deber a que cada suero contiene cantidades diferentes de las sustancias que le componen (diversos tipos de aminoácidos, hormonas y/o promotores) que de alguna manera pudieran afectar el tamaño y la cantidad de domos, sin que esto quiera decir que promuevan directamente su formación. Smith (1978), Rickman (1980) y Thomas (1981) encontraron que el suero y otras sustancias estimulan indirectamente el crecimiento celular al aumentar la tasa mitótica y la síntesis protéica, disminuir la actividad fosfodiesterasa y elevar niveles de AMP_C; estos factores pudieran ser en parte, responsables de la expresión de funcionalidad de las MDCK, pues se sabe que aumentos en la síntesis de proteínas y altos niveles de AMP_C influyen en la expansión de citoesqueleto y formación de cilios, que a su vez aumentan el transporte transepitelial (Händler, 1980; Mullin, 1980; Griëpp, 1981; Herzlinger, 1981; Meza, 1981).

T A B L A 10

AREA TOTAL

T I P O		D I A S					
		1	2	4	5	7	11
FETAL	$\bar{X}_y =$	137234,29	22266,66	4393,74	7466,11	22353,23	75012,07
	$S^2 =$	1655335583	26013722	50068461	3737723	599794355	820274158
	n =	12	12	12	12	12	12
TERNERA	$\bar{X}_y =$	86961,89	21811,05	5568,65	13848,93	15699,50	30847,79
	$S^2 =$	230597828	14653774	100686860	454642775	373965231	143230881
	n =	12	12	12	12	12	12
CABALLO	$\bar{X}_y =$	189928,06	39266,24	12664,28	73855,92	72468,54	15187,62
	$S^2 =$	1567914128	81642148	17283701	898479125	638408538	42610665
	n =	12	12	12	12	12	12

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
n = TAMAÑO DE LA MUESTRA



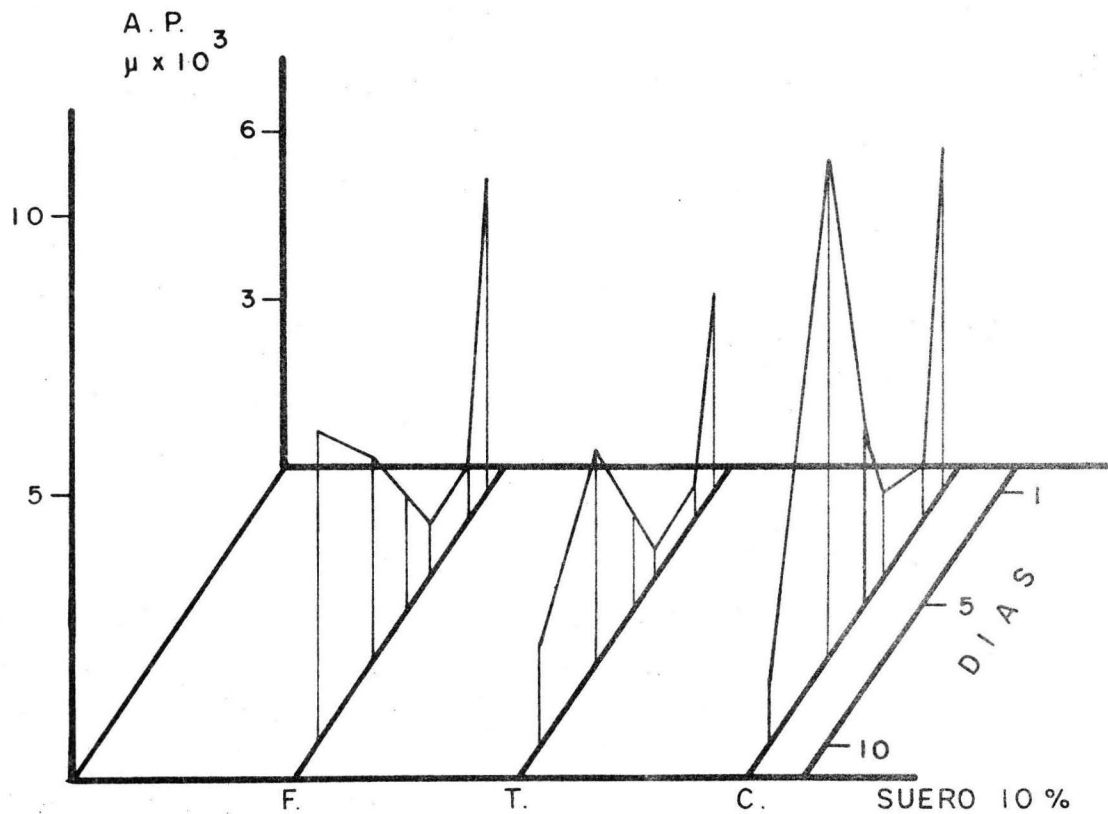
GRAFICA 11 Se puede observar el patrón general del área total de domos para tres tipos de suero agregado al medio de cultivo.

T A B L A 11

AREA PROMEDIO

		D I A S						
		1	2	4	5	7	10	
T I P O	FETAL	$\bar{X}_y =$	5635.29	1018.47	948.37	1831.09	3624.24	5606.99
		$S^2 =$	784205.3	21791.1	186721.8	30096.8	9832186	5926779
		$n =$	12	12	12	12	12	12
D E	TERNERA	$\bar{X}_y =$	3497.92	604.87	499.65	1536.52	3702.53	1826.12
		$S^2 =$	224683.1	2894.6	97393.9	617824.9	18355673	359296.4
		$n =$	12	12	12	12	12	12
S U E R O	CABALLO	$\bar{X}_y =$	6154.54	1057.68	1536.33	2974.19	8938.53	1203.17
		$S^2 =$	642609.6	30362.9	70853.2	551936.9	14947489	47694.8
		$n =$	12	12	12	12	12	12

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 $n =$ TAMAÑO DE LA MUESTRA



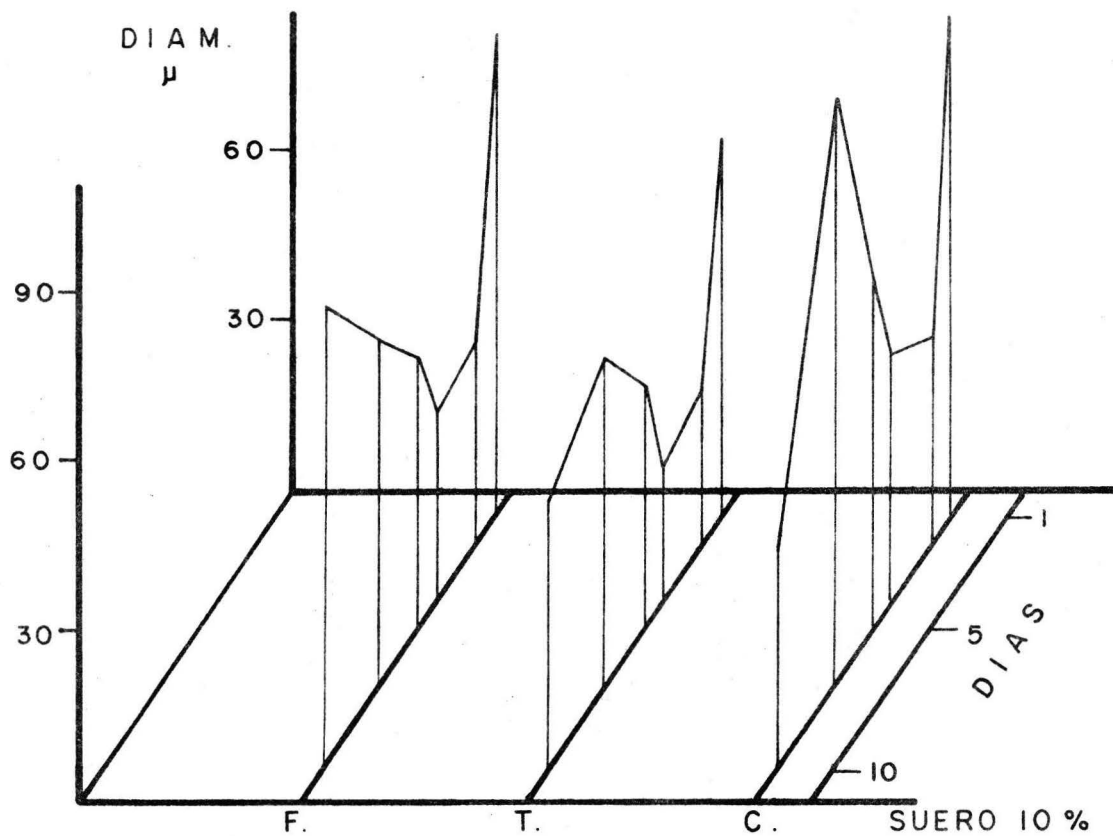
G R A F I C A 12 Representa el comportamiento del área promedio de los domos en las MDCK con tres tipos de suero a través del tiempo.

T A B L A 12

DIAMETRO MEDIO

		D I A M E T R O						
		1	2	4	5	7	10	
T I P O	FETAL	$\bar{X}_y =$	84,47	35,92	33,74	48,23	61,38	82,89
		$S^2 =$	42,79	7,21	75,2	5,25	923,4	436,9
		$n =$	12	12	12	12	12	12
D E	TERNERA	$\bar{X}_y =$	66,59	27,73	24,89	43,27	58,51	47,58
		$S^2 =$	20,5	1,53	60,8	92,4	1408	66,6
		$n =$	12	12	12	12	12	12
S U E R O	CABALLO	$\bar{X}_y =$	88,35	36,58	44,87	61,05	104,18	39,00
		$S^2 =$	72,8	9,02	15,0	56,7	574,5	12,2
		$n =$	12	12	12	12	12	12

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 $n =$ TAMAÑO DE LA MUESTRA



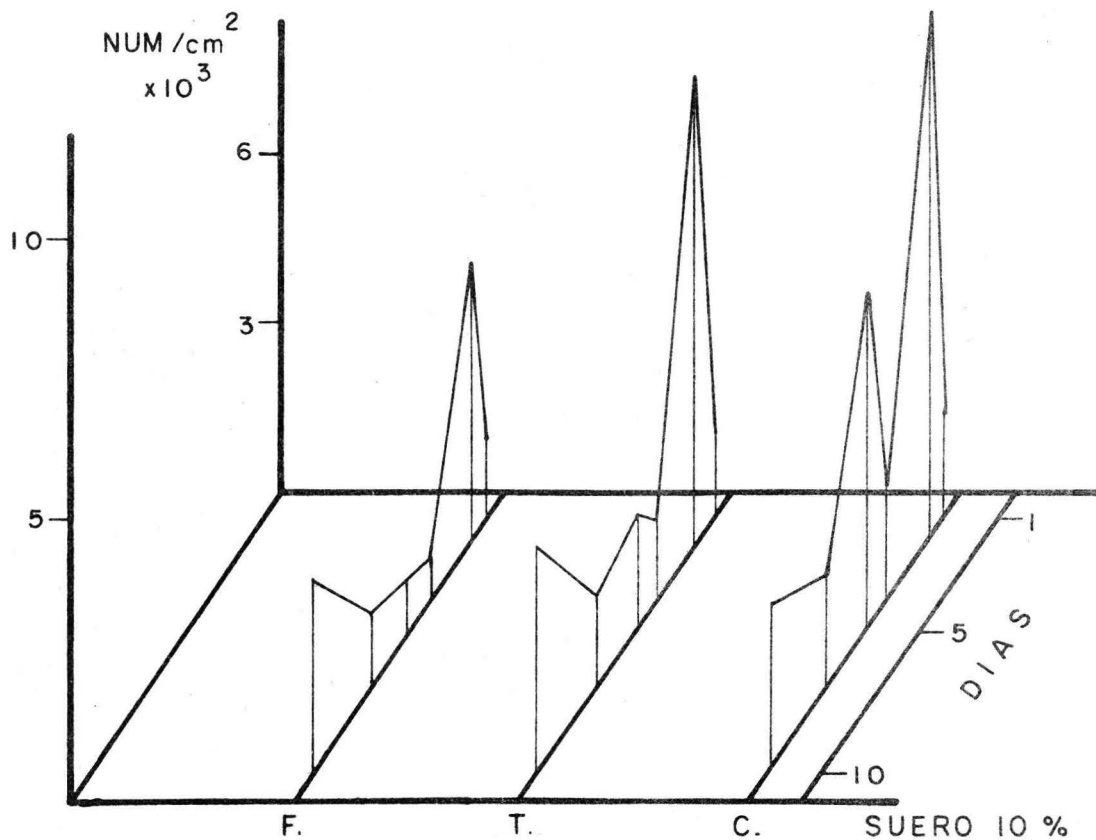
G R A F I C A 13 Se muestran las variaciones del diámetro medio de los domos a través de los 10 días de experimentación en las MDCK.

T A B L A 13

DENSIDAD

		D I A S						
		1	2	4	5	7	10	
T I P O	FETAL	$\bar{X}_y =$	1361.12	5082.73	827.79	962.54	1366.81	3445.91
		$S^2 =$	50792.3	1300187	1052359	105114	2012945	1430771
		$n =$	12	12	12	12	12	12
D E	TERNERA	$\bar{X}_y =$	1403.51	8354.88	1482.32	2117.60	1694.88	3965.68
		$S^2 =$	44041	2152424	5496282	11234328	5737641	1855997
		$n =$	12	12	12	12	12	12
S U E R O	CABALLO	$\bar{X}_y =$	1767.44	8528.14	2002.09	5987.02	2098.35	2906.88
		$S^2 =$	159767	2003242	808574	5942615	683649	965033
		$n =$	12	12	12	12	12	12

$\bar{X}_y =$ MEDIA DE LA MUESTRA
 $S^2 =$ VARIANZA DE LA MUESTRA
 $n =$ TAMAÑO DE LA MUESTRA



G R A F I C A 14 Se puede observar los cambios que sufre la densidad de d_o mos a través del tiempo para tres tipos de suero agregados al medio de cultivo para las células MDCK.

III - 5 LAS PRUEBAS ESTADISTICAS

De la aplicación del estadístico "t" (tablas en el Apéndice 4) se obtienen los valores críticos al realizar las posibles combinaciones entre las variables suero (concentración o tipo) y tiempo, los asteriscos indican que existe diferencia significativa (95 % de confianza) entre el valor obtenido a partir de la prueba y el valor teórico o de tablas sin embargo, estas diferencias son incongruentes al comparar las combinaciones "días de cada concentración o tipo de suero" y "concentraciones o tipo de suero de cada día", pues lo que para una prueba es significativo, para la otra no lo es; si recordamos el principio matemático que dice " dos números cualesquiera iguales a uno tercero son iguales entre sí " y lo extendemos a nuestros resultados cabría esperar que por ejemplo, cuando encontramos diferencias entre los días 2 y 10 para las concentraciones x, y, al analizar las combinaciones de concentraciones para cada día, encontraríamos que las concentraciones x - y tuvieran diferencias significativas en los días 2 y 10, o sea:

concentración x		concentración y
día 2 - 10 *	día	2 - 10 *

donde * es diferencia significativa

día 2	día 10
concent. x - y *	concent. x - y *

Pero en nuestros resultados tenemos:

concentración x	concentración y
día 2 - 10 *	día 2 - 10 *

día 2	día 10
concent. x - y +	concent. x - y +

donde: * = diferencia significativa
+ = diferencia no significativa

De ahí la incongruencia matemática, que en términos de interpretación biológica puede explicarse considerando que las diferencias en la formación, tamaño y número de los domos en las MDCK a través del tiempo de experimentación entre los distintos sueros o las concentraciones empleadas no son significativas en cuanto a que los resultados parecen no depender de la variable manejada, sino de factores entrínsecos al cultivo celular.

I V

C O N C L U S I O N E S

G E N E R A L E S

De todo lo expuesto anteriormente, podemos concluir que :

A) Las células de epitelio renal MDCK en cultivo con suero fetal bovino agregado al medio de cultivo como complemento, conservan "in vitro" gran cantidad de sus funciones específicas como epitelio especializado de transporte, de las cuales la formación de domos o ampollas es una manifestación característica.

B) La formación de las ampollas en las MDCK sobre el soporte al cual se adhieren depende en cierta forma de el establecimiento de la monocapa, siendo en las zonas donde primero se cubre el soporte de células en capa continua, los lugares en que se presentan con mayor rapidez los domos o "blisters" en tanto que las células se encuentren en buen estado, no importando si la superficie de la caja o botella de cultivo se ha cubierto completamente de células.

C) La distribución de las ampollas sobre el soporte no depende ni del tipo de éste, ni del tiempo del cultivo, sino que es completamente al azar y, dentro de los factores que le afectan se encuentran el estado de confluencia de las células y las condiciones fisiológicas del cultivo, de manera que si un cultivo permanece sin resiembras, pero con cambios constantes de medio, se renuevan en forma periódica las

células que forman la monocapa, con lo cual se mantiene a la población en buen estado y se promueve la aparición de domos en el cultivo con distribución heterogénea.

D) La formación de domos o ampollas en las MDCK se puede observar tanto en cultivos con diversas cantidades - de suero, en cultivos con diferentes tipos de suero complementario, en cultivos sin suero o bien en cultivos suplementados con hormonas (sin suero) (Taub,1979; Taub,1980;Davis,1982), - en tanto que las células se encuentren en condiciones de cultivo (temperatura adecuada, pH, atmósfera de CO₂, etc.) y, la velocidad en la formación de los domos así como su diámetro y densidad depende de la adaptación de las células al medio de cultivo en el cual se les coloque.

E) De la aplicación de pruebas estadísticas a - los resultados obtenidos se puede inferir que las diferencias en la formación , área de ocupación, diámetro y densidad de - las ampollas en las MDCK a través del tiempo , usando ya sea distintas concentraciones o tipos de suero, no se deben a las condiciones experimentales a las que fueron sometidos los cultivos sino que más bien estas características dependen,entre otras cosas de:

1) Edad del cultivo.- cuando el cultivo se encuentra en fase de proliferación celular casi no hay formación de

domos, ya que para que éstos se presenten es necesario que -- las células se dejen de dividir y den muestras de su funcionalidad al establecerse las uniones entre células contiguas, por lo que cuando el cultivo se encuentra en estado confluyente es posible observar estas estructuras y a medida que la monocapa madura, se reduce el número de domos, pero éstos son -- de mayor tamaño y, cuando el cultivo envejece disminuye considerablemente la formación de ampollas, misma que aumenta al -- renovarse las células que constituyen la monocapa (Mc. Grath, 1975; Mori, 1979; Mullin, 1980; Davis, 1982).

2) Estado fisiológico de las células.- en este punto podemos mencionar los niveles de AMP cíclico, la tasa de -- síntesis de proteínas y la actividad de enzimas que controlan parte de la actividad metabólica de las células (fosfodiesterasa, por ejemplo) quienes de algún modo intervienen en la -- formación de microvellosidades, cilios, uniones, citoesqueleto y transporte de sustancias tanto intraepiteliales como -- transepiteliales (Rickman, 1980; Thomas, 1981; Griep, 1981; -- Herzlinger, 1981; Meza, 1981; Davis, 1982; Herzlinger, 1982).

3) Especialización.- como resultado de la alta especialización de estas células se puede suponer que al alcanzar las células su estado maduro, se exprese información genética que establece la formación de domos por procesos de transporte, quedando aún por confirmar las sugerencias de Dulbecco (1980) con respecto a la posible liberación al medio de sustan

cias promotoras de diferenciación elaboradas por las mismas - células que, actuando de manera local, inducen la formación + de domos en células circunvecinas.

PROPOSICIONES PARA CORROBORAR LOS RESULTADOS

Una manera sencilla de corroborar las suposiciones de Dulbecco en las MDCK, y dar mayor solidez a los resultados aquí expuestos, es montar una serie de experimentos en donde se mantenga el cultivo celular con medio específico sin suero suplementado con hormonas (K - 1 , Taub,1979) se les deje crecer de manera normal y , al momento de efectuar el cambio de medio de cultivo, éste se recicle (sólo se eliminan los residuos del metabolismo celular mediante filtración al vacío y - se agrega un poco más de medio de cultivo fresco para compen-sar las cantidades asimiladas por las células). Cabe esperar con esto, que el cultivo presente mayor densidad de domos, o que éstos sean de mayor tamaño si realmente existe, liberado en el medio algún promotor o inductor elaborado por las célu-las que ya han formado ampollas como resultado de su funciona-lidad .

V

B I B L I O G R A F I A

- Abaza, N.A.; Leighton, J. & Schultz, S.G. 1974 Effects of ouabain on the function and structure of a Cell Line (MDCK) derivated from Canine Kidney. In Vitro 10 : 172 - 183.
- Auersperg, N. 1969 Histogenetic behavior of tumors morfologic variation "in vitro" and "in vivo" of two related - human carcinoma cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 43 : 151 - 173
- Balinsky, B.J. 1975 Introducción a la Embriología. Ediciones Omega. Barcelona 269 - 286
- Barry, P.H.; Diamond, J.W. & Wright, E.W. 1971 The mechanism - of cation permeation in Rabbit Gallblader. Dilution potentials and biionic potentials. J. Memb. Biol. 4 : 358 - 394
- Biber, T.V.L.; Aceves, J. & Mandel?L.J. 1972 Potassium uptake across serosal surface of Isolated Frog Skin. Amer J. Physiol. 222 : 1366 - 1373
- Cereijido, M.; Rotunno, C.A.; Robbins, E.S. & Sabatini, D.D. - 1977 In vitro formation of cell layers with proper ties of epithelial membranes. Biophys. J. 17 : 229
- Cereijido, M.; Rotunno, C.A.; Robbins, E.S. & Sabatini, D.D. - 1978 Polarized epithelial membranes produced in vi tro. Memb. Transp. Proc. vol. I Ed. J.F. Hoffman, Raven Press, N.Y.

- Curran, P.F. & Salomon, A.K. 1957 Ion and water fluxes in the Ileum of Rats. J. Gen. Physiol. 41 (1): 143 - 167
- Chuman, L.; Fine, L.G.; Cohen, A.H. & Saier, M.H. 1982 Continuous growth of proximal tubular kidney epithelial cells in hormone-supplemented serum-free medium. J. Cell. Biol. 94 (3): 506 - 510
- Chung, S.D.; Alavi, N.; Livingstone, D.; Hiller, S. & Taub, M. -- 1982 Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. J. Cell. Biol. 95 : 118 - 126
- Devis, P.; Hiller, S. & Taub, M. 1982 Prostaglandin E₁ regulates the growth and function of Madin and Derby Canine Kidney (MDCK) Cell in a hormonally defined medium. J. Cell. Biol. 95 (2): 118 a
- Diamond, J.M. 1962 The mechanism of solute transport by the Gallbladder. J. Physiol.(Lond) 161 : 474 - 502
- Diamond, J.M. 1962 The mechanism of water transport by the Gallbladder. J. Physiol.(Lond) 161 : 503 - 527
- Dulbecco, R. 1980 Differentiation and morphogenesis of mammary cells in vitro. Proc. R. Soc. Lond. B 208 : 399 - 408
- Gaush, Ch.R.; Hard, W.L. & Smith, T.F. 1966 Characterization of an Established line of Canine Kidney Cells (MDCK)

- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122 : 931 - 935
- Griep, E.B.; Robbins, E.S.; Dolan, W.J. & Sabatini, D.D. 1981
Role of microfilaments in tight junction formation
J. Cell. Biol. 91 (2) : 118 a
- Ham, A. & D. Conmarck 1979 Histología 8^a ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia 187 - 210
- Handler, J.S. 1978 Renal Cells in Culture Proc. VII Internat. Congr. Nephrol. (Montreal) 695 - 699
- Handler, J.S.; Perkins, F.M. & Johnson, J.P. 1980 Studies of -
Renal cell function using cell culture techniques
Am. J. Physiol. 238 : F 1 - F 9
- Herzlinger, D.A.; Baesley, E. & Ojakian, G.K. 1981 The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule J. Cell. Biol. 91 (2) : 113 a
- Herzlinger, D.A. & Ojakian, G.K. 1982 Development and maintenance of epithelial polarity in MDCK cells J. Cell Biol. 95 (2) : 105 a
- Holley, R.W. 1975 Control of growth of mammalian cells in -
Cell Cultured Nature 258 : 487 - 490
- Junqueira, L.C. & J. Carneiro 1979 Histología básica Salvat Editores, Barcelona 49 - 72
- Leighton, J.; Brada, Z.; Estes, L.W. & Justh, G. 1968 Secretary

- activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney Science 163 : 472
- Lever, J.E. 1979 Inducers of mammalian cell differentiation stimulate dome formation in a differentiated kidney epithelial cell line (MDCK) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 (3) : 1323 - 1327
- Maillet, M. 1980 Epitelios de Revestimiento Editorial A.C. Madrid 74 p.p.
- Mc. Grath, C.M. 1971 Replication of mammary tumor virus in - tumor cell cultures: Dependence on hormone induced cellular organization J. Nat. Cancer Inst. 47 : - 455 - 467
- Mc. Grath, C.M. 1975 Cell organization and responsiveness to hormones in vitro: Genesis of domes in mammary cell cultures Amer. Zool. 15 : 231 - 236
- Meza, I.; Sabanero, M.; Cereijido, M.; Snabes, M. y Bryan, J. 1981 Relationship between microfilaments and occluding - junctions J. Cell. Biol. 91 (2) : 106 a
- Mori, Y.; Akedo, H.; Tanigaki, Y.; Takama, K. & Okada, M. 1979 Ciliogenesis in tissue - cultured cells by the increased density of cell population Exp. Cell. Res. 120 : 435 - 439
- Mullin, J.M.; Weibel, J.; Diamond, L. & Kleinzeller, A. 1980 Su

- gar transport in the LLC-PK₁ renal epithelial cell line: Similarity to mammalian kidney and the influence of cell density J. Cell. Physiol. 104 : 375 - 389
- Owens, R.B.; Smith, H.S. & Hackett, A.J. 1974 Epithelial cell cultures from normal glandular tissue of mice J. Nat. Cancer Inst. 53 : 261 - 269
- Rabito, C.A.; Tchao, R.; Valentich, J. & Leighton, J. 1978 Distribution and characteristics of the occluding junctions in a monolayer of a cell line (MDCK) J. Membr Biol. 43 : 351 - 365
- Richman, R.A.; Weiss, J.P.; Roberts, S.B. & Florini, J.R. 1980 - The effect of serum and multiplication stimulating activity on L6 myoblast growth: The lack of correlation with cyclic nucleotide changes J. Cell. Physiol. 103 : 63 - 69
- Rindler, M.; Chuman, L.; Shaffer, L. & Saier, M. 1979 Retention of differentiated properties in an established Dog Kidney Epithelial Cell Line J. Cell. Biol. 81 : 635 - 648
- Rindler, M.; Taub, M. & Saier, M. 1979 Uptake of Na⁺ by cultured Dog Kidney Cells (MDCK) J. Biol. Chem 254 (22) : 11431 - 11439

- Sato, G. 1975 in Biochemical Action of Hormones. Ed. Litwak G. (Academic, N.Y.) vol. 3 : 391 - 396
- Sato, G. & Reid, L. 1978 in Biochemistry and Mode of Action of Hormones II. ed. Rickenberg, H.V. (University Park, Baltimore, M.D.) vol. 20 : 215 - 256
- Sharp, J.A. 1980 Introducción al Cultivo de Tejidos Animales Ediciones Omega, S.A. barcelona 68 p.p.
- Smith, R.E.; Ellis, L.F. & Hull, R.N. 1974 Light scanning and transmission electron microscopy of dome - like structures in a continuous pig kidney cell strain J. Cell. Biol. 63 : 322 a
- Smith, J. & Rozengurt, E. 1978 Lithium transport by fibroblastic mouse cells: Characterization and stimulation - by serum and growth factors in quiescent cultures J. Cell. Physiol. 97 : 441 - 450
- Taub, M.; Chuman, L.; Saier, M. & Sato, G. 1979 Growth of Madin - Darby canine kidney epithelial cell (MDCK) line - on hormone-supplemented, serum-free medium Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 (7) : 3338 - 3342
- Taub, M. & Sato, G. 1980 Growth of functional primary cultures of kidney epithelial cells in defined medium J. Cell. Physiol. 105 : 369 - 378
- Taylor - Papadimitriou, J.; Purkis, P. & Fentiman, I.S. 1980

- Cholera toxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured Human Mammary Epithelial - Cells J. Cell. Physiol. 102 : 317 - 321
- Thomas G. & Seigmann, M. 1981 Effect of serum, EGF and insulin on S6 phosphorylation and activation of protein synthesis J. Cell. Biol. 91 (2) : 3 a
- Ussing, H.H.; Erlj, D. & Lassen, U. 1974 Transport pathways in biological membranes Ann. Rev. Physiol. 36 : 17 - 49
- Ussing, H.H. 1949 The distinction by means of tracers between active transport and diffusion Acta Physiol. Scand. 19 : 43
- Valentich, J.D.; Tchao, R. & Leighton, J. 1976 Functional control of transporting epithelia by cAMP and divalent cations J. Cell. Biol. 70 : 330 a
- Valentich, J.D.; Tchao, R. & Leighton, J. 1979 Hemicyst formation stimulated by cyclic AMP in dog kidney cell line (MDCK) J. Cell. Physiol. 100 : 291 - 304
- Whittembury, G. & Rawlins, F.A. 1971 Evidence of paracellular pathway for ion flow in the kidney proximal tubule: Electron microscopic demonstration of Lanthanum precipitate on the tight junction Plügers Arch 330 : 302 - 309

V I

A P E N D I C E

1

COMPOSICION DE MEDIOS

DE CULTIVO

La tabla muestra la composición de las dos soluciones salinas equilibradas más usadas en el cultivo de tejidos animales (conocidas como "sales") inventadas respectivamente por Earle y por Hanks. Estas soluciones se agregan como complemento amortiguador de los medios sintéticos.

Ingredientes	Earle (mg/l)	Hanks (mg/l)
NaCl	6800	8000
Kcl	400	400
CaCl ₂ ·2H ₂ O	264	185
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	200
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140	---
Na ₂ HPO ₄	---	47.5
KH ₂ PO ₄	---	60
NaHCO ₃	1680	350
Glucosa	1000	1000
Fenol (rojo)	17	17

En la tabla que a continuación se muestra, se puede observar la composición del medio sintético más frecuentemente empleado, se trata del Medio Esencial Mínimo de Eagle (se omite la solución salina, la cual se agrega al medio al momento de prepararse y antes de esterilizar).

La composición de este medio surgió del estudio de las necesidades nutricionales de poblaciones puras de líneas celulares establecidas (Apéndice 2).

Ingredientes	mg/l
L-arginina HCl	126.40
L-cistina	24.02
L-glutamina	292.30
L-histidina HCl·H ₂ O	41.90
L-iso-leucina	52.50
L-leucina	52.50
L-lisina HCl	73.06
L-metionina	14.90
L-fenilalanina	33.02
L-treonina	47.64
L-triptófano	10.20
L-tirosina	36.22
L-valina	46.90

D-Ca pantotenato	1.00
Cloruro de colina	1.00
Acido fólico	1.00
i-nositol	2.00
Nicotinamida	1.00
Piridoxal HCl	1.00
Riboflavina	0.10
Tiamina HCl	1.00

V I

A P E N D I C E

2

TERMINOLOGIA EN

EL CULTIVO DE

TEJIDOS ANIMALES

Como resultado inevitable del florecimiento en las técnicas de cultivo han surgido confusiones en el significado de los términos empleados, por lo cual se estableció un comité sobre nomenclaturas; algunos de los términos más usados se definen como sigue:

Cultivo de Tejido Animal.- se refiere al estudio de células, tejidos y órganos explantados de animales y mantenidos vivos o que consiguen crecer "in vitro" durante más de 24 horas. Dependiendo de si son células o tejidos y órganos se aplican dos términos diferentes:

Cultivo Celular.- este término se utiliza para el crecimiento de células "in vitro" incluyendo el cultivo de una sola célula. En los cultivos celulares las células no se organizan nunca para formar tejidos.

Cultivo de Organos.- este término indica el mantenimiento o el crecimiento de tejidos, primordios de órganos, o al conjunto o a las partes de un órgano "in vitro" de forma que se preserve la arquitectura y/o la función.

Línea Celular.- es la originada a partir del cultivo primario hasta el momento del primer subcultivo y consta de numerosos descendientes de las células originalmente presentes en el cultivo primario.

Cepa Celular.- es la que se obtiene por selección a partir de

una sola célula que tiene propiedades específicas o marcadores, que deben persistir durante los subsiguientes cultivos.

Clon.- población celular derivada de una sola célula por mitosis.

Explante.- fragmentos extraídos de un tejido u órgano y utilizado para iniciar un cultivo "in vitro".

Monocapa.- capa única de células que crece sobre una superficie.

Cultivo Primario.- originado a partir de células, tejidos u órganos que proceden directamente de organismos.

Subcultivos.- es el trasplante de células desde un frasco de cultivo a otro.

Cultivo en Suspensión.- es un tipo de cultivo en el que las células se multiplican suspendidas en el medio, evitándose que se adhieran a las superficies de los frascos de cultivo.

V I

A P E N D I C E

3

PROGRAMAS PARA EL

PROCESAMIENTO DE

LOS DATOS

PROGRAMA I

Para la obtención de área real de ampolla, área - promedio por ampolla, diámetro medio y densidad (número de - ampollas por centímetro cuadrado de superficie). Cada medición con sus respectivas varianzas, error estándar y límites de confianza.

PROGRAMA II

Se emplea para la obtención de la prueba de "t" - con el fin de evidenciar las diferencias al comparar los resultados de cada una de las características cuantificadas en cada día para cada concentración o tipo de suero.

PROGRAMA III

Este programa realiza la prueba de "t" evidenciando las diferencias que existen al comparar los resultados de cada característica obtenidos para las diferentes concentraciones o tipo de suero para cada día.

PROGRAMA I

```

10 REM BLISTERS
20 DIM A(6),B(6),C(6),D1(6),D2(6),E(6),F(6),G(6),H1(6),H2(6),I(6
),J(6),K(6),L1(6),L2(6),M(6),N(6),O(6),P1(6),P2(6)
30 DIM Z(6),X(6,12),Y(6,12)
40 FOR I=1 TO 6
50 PRINT "CONCENTRACION ";:PRINT I
60 INPUT "NUM DE DATOS",Z(I)
70 FOR J=1 TO Z(I)
80 INPUT "AREA RELATIVA",X(I,J)
90 INPUT "NUMERO DE BLISTERS",Y(I,J)
100 NEXT J:NEXT I
110 FOR I=1 TO 6
120 A1,A2,B1,B2,C1,C2,D1,D2=0
130 FOR J=1 TO Z(I)
140 A=(X(I,J)*432880.6)/100
150 A1=A1+A:A2=A2+A $\frac{1}{2}$ 2
160 B=A/Y(I,J)
170 B1=B1+B:B2=B2+B $\frac{1}{2}$ 2
180 C=2*SQR(B/#PI)
190 C1=C1+C:C2=C2+C $\frac{1}{2}$ 2
200 D=(100000000*Y(I,J))/432880.6
210 D1=D1+D:D2=D2+D $\frac{1}{2}$ 2
220 NEXT J
230 A(I)=A1/Z(I):B(I)=((Z(I)*A2)-(A1 $\frac{1}{2}$ 2))/(Z(I)*(Z(I)-1)):C(I)=SQ
R(B(I)/Z(I)):D1(I)=A(I)-1.96*C(I):D2(I)=A(I)+1.96*C(I)
240 E(I)=B1/Z(I):F(I)=((Z(I)*B2)-(B1 $\frac{1}{2}$ 2))/(Z(I)*(Z(I)-1)):G(I)=SQ
R(F(I)/Z(I)):H1(I)=E(I)-1.96*G(I):H2(I)=E(I)+1.96*G(I)
250 I(I)=CL2/Z(I):J(I)+((Z(I)*C2
)-(C1 $\frac{1}{2}$ 2))/(Z(I)*(Z(I)-1)):K(I)=SQ
R(J(I)/Z(I)):L1(I)=I(I)-1.96*K(I):L2(I)=I(I)+1.96*K(I)
260 M(I)=D1/Z(I):N(I)=((Z(I)*D2)-(D1 $\frac{1}{2}$ 2))/(Z(I)*(Z(I)-1)):O(I)=SQ
R(N(I)/Z(I)):P1(I)=M(I)-1.96*O(I):P2(I)=M(I)+1.96*O(I)
270 NEXT I
280 SELECT PRINT 215(120)
@() PRINT "      0.0%          0.8%          2.0%
      6.0%          11.0%          19.0%"
300 PRINT "Area Total ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(A(I)*10000)/100
00,
310 NEXT I
320 PRINT "Varianza ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(B(I)*10000)/10000
,
330 NEXT I
340 PRINT "Error est ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(C(I)*10000)/1000
0,
350 NEXT I
360 PRINT "Lim inf ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(D1(I)*10000)/10000
,
370 NEXT I
380 PRINT "Lim sup ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(D2(I)*10000)/10000
,
390 NEXT I:PRINT
400 PRINT "Area prom";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(E(I)*10000)/10000,

```



```
410 NEXT I
420 PRINT "Varianza ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(F(I)*10000)/10000,
,
430 NEXT I
440 PRINT "Error est ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(G(I)*10000)/10000
,
450 NEXT I
460 PRINT "Lim inf ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(H1(I)*10000)/10000
,
470 NEXT I
480 PRINT "Lim sup ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(H2(I)*10000)/10000
,
490 NEXT I:PRINT
500 PRINT "Diametro ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(I(I)*10000)/10000,
,
510 NEXT I
520 PRINT "Varianza ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(J(I)*10000)/10000,
,
530 NEXT I
540 PRINT "Error est ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(K(I)*10000)/10000
,
550 NEXT I
560 PRINT "Lim inf ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(L1(I)*10000)/10000
,
570 NEXT I
580 PRINT "Lim sup ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(L2(I)*10000)/10000
,
590 NEXT I:PRINT
600 PRINT "Num/cm2 ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(M(I)*10000)/10000,
,
610 NEXT I
620 PRINT "Varianza ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(N(I)*10000)/10000,
,
630 NEXT I
640 PRINT "Error est ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(O(I)*10000)/10000
,
650 NEXT I
660 PRINT "Lim inf ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(P1(I)*10000)/10000
,
670 NEXT I
680 PRINT "Lim sup ";:FOR I=1 TO 6:PRINT INT(P2(I)*10000)/10000
,
690 NEXT I
700 END
```

```

10 REM TABLAT
20 DIM X(6,6),V(6,6),N(6,6),S(6,6),T(6,6),N$20
30 INPUT "PARAMETRO",N$
40 FOR I=1 TO 6
50 PRINT "CONCENTRACION";:PRINT I
60 FOR J=1 TO 5
70 PRINT "MEDIA DEL DIA";:PRINT J
80 INPUT X(I,J)
90 PRINT "VARIANZA DEL DIA";:PRINT J
100 INPUT V(I,J)
110 PRINT "NUMERO DEL DIA";:PRINT J
120 INPUT N(I,J)
130 S(I,J)=V(I,J)*(N(I,J)-1)
140 NEXT J:NEXT I
150 SELECT PRINT 211(95)
160 PRINT TAB(35);:PRINT N$:PRINT
170 PRINT TAB(10)," COMPARACION ENTRE LOS DIAS DE CADA CONCENTRA
CION":PRINT
180 FOR I=1 TO 6
190 PRINT TAB(16),"          CONCENTRACION";:PRINT I
200 PRINT
210 PRINT "          "," DIA 1 "," DIA 2 "," DIA 3 "," DIA 4 "
220 FOR J=2 TO 5
230 PRINT "DIA";:PRINT J
240 FOR K=1 TO J-1
250 S=(S(I,J)+S(I,K))/(N(I,J)+N(I,K)-2)
260 P=SQR((S/N(I,J))+S/N(I,K))
270 T(J,K)=ABS(X(I,J)-X(I,K))/P
280 T(J,K)=INT(T(J,K)*10000)/10000
290 PRINT T(J,K);:PRINT "(";:PRINT N(I,J)+N(I,K)-2;:PRINT ")",
300 NEXT K:PRINT
310 NEXT J:PRINT :PRINT
320 NEXT I:PRINT
330 SELECT PRINT 005
340 END

```

```

10 REM TABLAT2
20 DIM X(6,6),V(6,6),N(6,6),S(6,6),T(6,6),N$20
30 INPUT "COMO SE LLAMA EL ARCHIVO",A$
40 INPUT "PARAMETRO",N$
50 DATA LOAD DC OPEN R A$
60 DATA LOAD DC X(),V(),N()
70 FOR I=1 TO 6
80 FOR J=1 TO 5
90 S(I,J)=V(I,J)*(N(I,J)-1)
100 NEXT J:NEXT I
110 SELECT PRINT 211(95)
120 PRINT TAB(35);:PRINT N$:PRINT
130 PRINT TAB(10)," COMPARACION ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE CAD
A DIA":PRINT
140 FOR J=1 TO 5
150 PRINT TAB(16),"          DIA ";:PRINT J
160 PRINT
170 PRINT "          "," CONC 1 "," CONC 2 "," CONC 3 "," CONC 4 "
," CONC 5"
180 FOR I=2 TO 6
190 PRINT "CONC";:PRINT I,
200 FOR K=1 TO I-1
210 S=(S(I,J)+S(K,J))/(N(I,J)+N(K,J)-2)
220 P=SQR((S/N(I,J))+(S/N(K,J)))
230 T(I,K)=ABS(X(I,J)-X(K,J))/P
240 T(I,K)=INT(T(I,K)*10000)/10000
250 PRINT T(I,K);:PRINT "(::PRINT N(I,J)+N(K,J)-2;:PRINT ")",
260 NEXT K:PRINT
270 NEXT I:PRINT :PRINT
280 NEXT J:PRINT
290 SELECT PRINT 005
300 END

```

V I

A P E N D I C E

4

TABLAS DE " t "

TABLA 14 Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; AREA TOTAL, S.F.B.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	* 2.8912 (21)			
DIA 3	1.5677 (22)	0.6075 (21)		
DIA 6	1.8335 (22)	0.7916 (21)	0.2990 (22)	
DIA 10	1.3700 (22)	1.5095 (21)	0.5030 (22)	0.9057 (22)

CONCENTRACION 0.8Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.1665 (18)			
DIA 3	1.1875 (22)	1.1059 (18)		
DIA 6	* 3.8142 (22)	* 3.3657 (18)	1.6385 (22)	
DIA 10	* 5.4951 (22)	* 4.8370 (18)	* 7.5908 (22)	1.3638 (22)

CONCENTRACION 2.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.6440 (17)			
DIA 3	0.2242 (21)	1.6710 (18)		
DIA 6	0.7727 (21)	* 2.8276 (18)	1.7315 (22)	
DIA 10	* 2.5012 (21)	* 4.1563 (18)	* 3.2127 (22)	* 2.6708 (22)

CONCENTRACION 6.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.4369 (21)			
DIA 3	0.6065 (22)	1.1798 (21)		
DIA 6	0.9432 (22)	0.5374 (21)	1.9280 (22)	
DIA 10	1.5777 (22)	1.3116 (21)	* 2.5587 (22)	1.0657 (22)

CONCENTRACION 11.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.7767 (22)			
DIA 3	1.7092 (22)	0.6216 (22)		
DIA 6	0.8176 (22)	1.3391 (22)	1.9643 (22)	
DIA 10	* 4.0754 (22)	* 2.7082 (22)	* 2.8468 (22)	* 3.5127 (22)

CONCENTRACION 19.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.7398 (22)			
DIA 3	0.9564 (22)	0.6498 (22)		
DIA 6	1.9547 (22)	1.6989 (22)	0.6581 (22)	
DIA 10	* 2.2172 (22)	2.0187 (22)	0.3151 (22)	0.5422 (22)

TABLA 15 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; AREA TOTAL, S.F.B. (Los grados de libertad entre paréntesis)

DIA 1					
	CONC. 0Z	CONC. 0.8Z	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.8Z	0.4759 (22)				
CONC. 7Z	1.7711 (21)	≠ 2.1037 (21)			
CONC. 6Z	0.1774 (77)	0.5303 (72)	0.9378 (21)		
CONC. 11Z	1.7914 (72)	1.6978 (72)	≠ 3.1558 (21)	1.6553 (22)	
CONC. 19Z	≠ 2.3592 (77)	≠ 3.2073 (77)	1.7759 (21)	1.9329 (72)	≠ 4.0810 (22)

DIA 2					
	CONC. 0Z	CONC. 0.8Z	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.8Z	≠ 3.4938 (17)				
CONC. 7Z	≠ 2.6406 (17)	0.0478 (14)			
CONC. 6Z	1.2525 (20)	1.1785 (17)	1.0745 (17)		
CONC. 11Z	≠ 2.8205 (21)	0.3522 (18)	0.2767 (18)	1.4309 (21)	
CONC. 19Z	0.3996 (21)	≠ 3.1934 (18)	≠ 2.6393 (18)	1.4167 (21)	≠ 2.9447 (22)

DIA 3					
	CONC. 0Z	CONC. 0.8Z	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.8Z	1.0050 (72)				
CONC. 7Z	0.3878 (72)	0.6409 (77)			
CONC. 6Z	≠ 2.1774 (72)	1.1048 (72)	1.7706 (72)		
CONC. 11Z	≠ 2.4385 (72)	1.0386 (77)	1.9773 (72)	0.2886 (72)	
CONC. 19Z	0.3577 (72)	0.0717 (72)	0.7127 (72)	0.6438 (72)	0.5320 (22)

DIA 6					
	CONC. 0Z	CONC. 0.8Z	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.8Z	0.4344 (72)				
CONC. 7Z	0.5682 (72)	0.1206 (72)			
CONC. 6Z	0.6516 (72)	1.1158 (72)	1.7784 (72)		
CONC. 11Z	≠ 3.4367 (72)	≠ 3.6635 (72)	≠ 3.7410 (72)	≠ 3.1210 (72)	
CONC. 19Z	1.4884 (72)	1.6461 (72)	1.6908 (72)	1.7461 (72)	1.0176 (22)

DIA 10					
	CONC. 0Z	CONC. 0.8Z	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.8Z	≠ 3.4075 (72)				
CONC. 7Z	≠ 4.2413 (77)	1.8022 (72)			
CONC. 6Z	1.2914 (77)	0.6938 (72)	1.8038 (72)		
CONC. 11Z	1.1729 (77)	0.9329 (77)	≠ 2.0589 (72)	0.1469 (72)	
CONC. 19Z	1.2052 (72)	≠ 2.7771 (77)	≠ 3.5264 (72)	1.8908 (72)	1.8127 (22)

TABLA 16 Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; AREA PROMEDIO, S.F.E.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.02				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	* 2.6273 (21)			
DIA 3	* 4.0364 (22)	1.5885 (21)		
DIA 6	* 3.7556 (22)	1.3719 (21)	0.0241 (22)	
DIA 10	* 3.2270 (22)	0.4484 (21)	1.4756 (22)	1.1193 (22)

CONCENTRACION 0.8Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.2809 (18)			
DIA 3	0.2838 (22)	0.0454 (18)		
DIA 6	* 5.9092 (22)	* 4.9368 (18)	* 3.1760 (22)	
DIA 10	1.0050 (22)	0.6390 (18)	0.5695 (22)	* 2.5332 (22)

CONCENTRACION 2.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.3515 (18)			
DIA 3	0.1938 (22)	1.0297 (18)		
DIA 6	2.0475 (22)	* 4.1305 (18)	1.9814 (22)	
DIA 10	0.9770 (22)	0.0227 (18)	0.8074 (22)	* 2.1443 (22)

CONCENTRACION 6.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.1463 (21)			
DIA 3	0.0560 (22)	1.148 (22)		
DIA 6	0.5503 (22)	1.6879 (21)	0.6207 (22)	
DIA 10	1.6385 (22)	0.4227 (21)	1.6177 (22)	* 2.2081 (22)

CONCENTRACION 11.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.5058 (22)			
DIA 3	1.6668 (22)	0.2133 (22)		
DIA 6	1.3391 (22)	1.9542 (22)	2.0205 (22)	
DIA 10	0.2977 (22)	0.9465 (22)	1.0899 (22)	1.4458 (22)

CONCENTRACION 19.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.0510 (22)			
DIA 3	1.3949 (22)	1.4530 (22)		
DIA 6	1.2553 (22)	1.5514 (22)	1.1078 (22)	
DIA 10	1.5085 (22)	* 2.1648 (22)	1.2749 (22)	0.4363 (22)

TABLA 17 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; AREA PROMEDIO, S.F.E. (Los grados de libertad entre paréntesis)

DTA 1					
	CONC 0Z	CONC 0.8Z	CONC 2Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.8Z	1.0796 (77)				
CONC 2Z	1.7915 (77)	1.0906 (77)			
CONC 6Z	1.7352 (77)	0.9535 (77)	0.7846 (77)		
CONC 11Z	0.7010 (77)	1.9561 (77)	* 2.5389 (77)	* 2.5757 (77)	
CONC 19Z	0.9869 (77)	0.0633 (77)	0.7890 (77)	0.6172 (77)	1.5979 (77)

DTA 2					
	CONC 0Z	CONC 0.8Z	CONC 2Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.8Z	1.6615 (17)				
CONC 2Z	* 2.7639 (17)	0.7623 (14)			
CONC 6Z	* 2.1806 (20)	0.5443 (17)	0.2730 (17)		
CONC 11Z	* 2.4377 (21)	0.6276 (18)	0.7857 (18)	0.0158 (21)	
CONC 19Z	0.6048 (21)	1.1087 (18)	1.8270 (18)	1.6895 (21)	1.8839 (22)

DTA 3					
	CONC 0Z	CONC 0.8Z	CONC 2Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.8Z	* 2.4685 (77)				
CONC 2Z	1.7882 (77)	0.3845 (77)			
CONC 6Z	* 2.9585 (77)	0.3892 (77)	0.0803 (77)		
CONC 11Z	* 3.9836 (77)	0.4144 (77)	0.8293 (77)	1.0035 (77)	
CONC 19Z	1.5277 (77)	1.4063 (77)	1.4315 (77)	1.4280 (77)	1.3840 (77)

DTA 6					
	CONC 0Z	CONC 0.8Z	CONC 2Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.8Z	1.3366 (77)				
CONC 2Z	0.4146 (77)	1.3714 (77)			
CONC 6Z	1.9698 (77)	* 3.4570 (77)	* 2.6246 (77)		
CONC 11Z	* 3.0640 (77)	* 3.3275 (77)	* 3.1663 (77)	* 2.5389 (77)	
CONC 19Z	1.8878 (77)	2.0471 (77)	1.9444 (77)	1.5512 (77)	0.1078 (77)

DTA 10					
	CONC 0Z	CONC 0.8Z	CONC 2Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.8Z	1.0445 (77)				
CONC 2Z	1.6285 (77)	0.9407 (77)			
CONC 6Z	* 3.4408 (77)	1.5998 (77)	0.0340 (77)		
CONC 11Z	* 3.0558 (77)	1.8388 (77)	0.4254 (77)	0.5893 (77)	
CONC 19Z	* 2.5846 (77)	1.9453 (77)	0.9850 (77)	1.1673 (77)	0.7459 (77)

TABLA 18 Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; DIAMETRO, S.F.B.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	* 2.7787 (21)			
DIA 3	* 4.5287 (22)	1.5089 (21)		
DIA 6	* 4.1901 (22)	1.3838 (21)	0.1244 (22)	
DIA 10	* 3.4244 (22)	0.3499 (21)	1.4175 (22)	1.2558 (22)

CONCENTRACION 0.8Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.3156 (18)			
DIA 3	0.4967 (22)	0.1755 (18)		
DIA 6	* 6.4994 (22)	* 5.3076 (18)	* 3.9497 (22)	
DIA 10	1.3874 (22)	0.8565 (18)	0.7015 (22)	* 2.8823 (22)

CONCENTRACION 2.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.5279 (18)			
DIA 3	0.2248 (22)	1.3276 (18)		
DIA 6	1.8464 (22)	* 4.9223 (18)	* 2.1649 (22)	
DIA 10	0.9817 (22)	0.7743 (18)	0.8005 (22)	* 2.5302 (22)

CONCENTRACION 6.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.1857 (21)			
DIA 3	0.0767 (22)	1.0588 (21)		
DIA 6	0.4996 (22)	1.6497 (21)	0.5953 (22)	
DIA 10	1.6660 (22)	0.4607 (21)	1.6287 (22)	* 2.2834 (22)

CONCENTRACION 11.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.4924 (22)			
DIA 3	1.7074 (22)	0.1989 (22)		
DIA 6	1.1320 (22)	1.5246 (22)	2.0280 (22)	
DIA 10	0.4386 (22)	0.8007 (22)	0.9658 (22)	1.3397 (22)

CONCENTRACION 19.0Z				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.0246 (22)			
DIA 3	1.7117 (22)	1.9054 (22)		
DIA 6	1.1041 (22)	1.5649 (22)	1.1428 (22)	
DIA 10	1.5478 (22)	* 2.3519 (22)	1.2476 (22)	0.0940 (22)

TABLA 19 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; DIAMETRO, S.F.B. (Los grados de libertad entre paréntesis)

DIA 1					
	CONC 0Z	CONC 0.RZ	CONC 7Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.RZ	0.9868 (77)				
CONC 7Z	1.9334 (77)	1.3088 (77)			
CONC 6Z	1.7506 (77)	1.0495 (77)	0.4427 (77)		
CONC 11Z	0.7677 (77)	1.9566 (77)	* 2.6963 (77)	* 2.6438 (77)	
CONC 19Z	1.0392 (77)	0.7810 (77)	0.8952 (77)	0.5621 (77)	1.8046 (22)

DIA 2					
	CONC 0Z	CONC 0.RZ	CONC 7Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.RZ	1.7188 (17)				
CONC 7Z	* 2.4875 (17)	0.8083 (14)			
CONC 6Z	* 2.1643 (20)	0.4629 (17)	0.3283 (17)		
CONC 11Z	* 2.4219 (21)	0.5487 (18)	0.2998 (18)	0.0608 (21)	
CONC 19Z	0.6179 (21)	1.1527 (18)	1.9647 (18)	1.6421 (21)	1.8501 (22)

DIA 3					
	CONC 0Z	CONC 0.RZ	CONC 7Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.RZ	* 2.8844 (77)				
CONC 7Z	1.8949 (77)	0.5378 (77)			
CONC 6Z	* 2.9017 (77)	0.3482 (77)	0.2593 (77)		
CONC 11Z	* 4.3203 (77)	0.5748 (77)	1.1152 (77)	1.0360 (77)	
CONC 19Z	* 2.1819 (77)	1.7464 (77)	1.8513 (77)	1.8125 (77)	1.6530 (22)

DIA 6					
	CONC 0Z	CONC 0.RZ	CONC 7Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.RZ	1.3368 (77)				
CONC 7Z	0.3202 (77)	1.2503 (77)			
CONC 6Z	* 2.1131 (77)	* 3.7035 (77)	* 2.7100 (77)		
CONC 11Z	* 3.7459 (77)	* 4.2730 (77)	* 3.9349 (77)	* 2.8167 (77)	
CONC 19Z	* 2.7381 (77)	* 2.5828 (77)	* 2.3436 (77)	1.5633 (77)	0.4557 (22)

DIA 10					
	CONC 0Z	CONC 0.RZ	CONC 7Z	CONC 6Z	CONC 11Z
CONC 0.RZ	0.9574 (77)				
CONC 7Z	1.7067 (77)	0.9265 (77)			
CONC 6Z	* 3.5715 (77)	1.8521 (77)	0.3904 (77)		
CONC 11Z	* 3.1867 (77)	1.9630 (77)	0.6822 (77)	0.4494 (77)	
CONC 19Z	* 2.9795 (77)	* 2.1619 (77)	1.1316 (77)	1.0158 (77)	0.6279 (22)

TABLA 20 Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; DENSIDAD, S.F.B.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.0%				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.2789 (21)			
DIA 3	1.8774 (22)	1.6899 (21)		
DIA 6	1.7405 (22)	1.5479 (21)	0.3909 (22)	
DIA 10	* 2.0927 (22)	1.9217 (21)	0.4309 (22)	0.0000 (22)

CONCENTRACION 0.02%				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.6942 (18)			
DIA 3	0.3012 (22)	0.5965 (18)		
DIA 6	1.1355 (22)	0.4779 (18)	1.0551 (22)	
DIA 10	* 4.1848 (22)	* 3.4687 (18)	2.0535 (22)	* 3.4620 (22)

CONCENTRACION 2.0%				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.4228 (18)			
DIA 3	0.0975 (22)	0.3615 (18)		
DIA 6	0.8967 (22)	0.3922 (18)	0.8525 (22)	
DIA 10	* 3.6684 (22)	* 4.7703 (18)	* 4.1580 (22)	* 6.7109 (22)

CONCENTRACION 6.0%				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.1807 (21)			
DIA 3	0.3610 (22)	* 2.3249 (21)		
DIA 6	0.5990 (22)	1.0046 (21)	1.4588 (22)	
DIA 10	* 2.2903 (22)	1.7744 (21)	* 4.3387 (22)	* 3.0325 (22)

CONCENTRACION 11.0%				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	0.0000 (22)			
DIA 3	0.2091 (22)	0.2037 (22)		
DIA 6	1.1368 (22)	1.0776 (22)	1.1011 (22)	
DIA 10	* 4.5680 (22)	* 4.3208 (22)	* 3.6965 (22)	* 4.4241 (22)

CONCENTRACION 19.0%				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 6
DIA 2	1.8464 (22)			
DIA 3	1.0638 (22)	* 3.4706 (22)		
DIA 6	* 2.5664 (22)	0.5546 (22)	* 4.8409 (22)	
DIA 10	1.9259 (22)	0.1202 (22)	* 3.5132 (22)	0.4051 (22)

TABLA 21 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; DENSIDAD, S.F.B. (Los grados de libertad entre paréntesis)

DIA 1					
	CONC. 0Z	CONC. 0.RZ	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.RZ	1.9822 (72)				
CONC. 7Z	0.7798 (72)	0.9297 (72)			
CONC. 6Z	0.8136 (72)	0.0405 (22)	0.5681 (72)		
CONC. 11Z	1.4641 (72)	0.0825 (72)	0.8486 (72)	0.0000 (22)	
CONC. 19Z	≠ 3.0215 (72)	≠ 4.8889 (72)	≠ 2.6431 (72)	≠ 2.5212 (72)	≠ 4.0613 (72)

DIA 2					
	CONC. 0Z	CONC. 0.RZ	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.RZ	1.7568 (17)				
CONC. 7Z	0.6937 (17)	0.7018 (14)			
CONC. 6Z	1.0411 (20)	≠ 2.2606 (17)	1.3789 (17)		
CONC. 11Z	1.1975 (21)	0.3987 (18)	0.3419 (18)	1.9278 (21)	
CONC. 19Z	1.3555 (21)	≠ 2.5569 (18)	1.6320 (18)	0.2494 (21)	≠ 2.2378 (22)

DIA 3					
	CONC. 0Z	CONC. 0.RZ	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.RZ	0.8834 (72)				
CONC. 7Z	1.3220 (72)	0.3833 (72)			
CONC. 6Z	0.1888 (72)	0.7667 (72)	1.7452 (72)		
CONC. 11Z	0.4439 (72)	0.4497 (72)	0.8676 (72)	0.2892 (72)	
CONC. 19Z	≠ 5.5225 (22)	≠ 4.4994 (22)	≠ 4.5427 (22)	≠ 6.0783 (22)	≠ 5.1113 (22)

DIA 6					
	CONC. 0Z	CONC. 0.RZ	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.RZ	0.5632 (72)				
CONC. 7Z	0.3854 (72)	0.9665 (72)			
CONC. 6Z	1.2967 (72)	1.7456 (72)	1.0891 (72)		
CONC. 11Z	1.4526 (72)	1.9173 (72)	1.7815 (72)	0.0735 (72)	
CONC. 19Z	≠ 2.3019 (22)	≠ 2.6525 (72)	≠ 2.2985 (72)	0.9031 (22)	1.2356 (22)

DIA 18					
	CONC. 0Z	CONC. 0.RZ	CONC. 7Z	CONC. 6Z	CONC. 11Z
CONC. 0.RZ	≠ 3.9151 (72)				
CONC. 7Z	≠ 2.2862 (72)	≠ 3.1169 (72)			
CONC. 6Z	≠ 5.3776 (22)	1.2918 (22)	1.8975 (22)		
CONC. 11Z	≠ 5.7554 (22)	1.4561 (22)	1.9291 (22)	0.0972 (72)	
CONC. 19Z	≠ 2.7289 (72)	0.5407 (22)	≠ 3.0778 (22)	1.6106 (22)	1.7419 (22)

TABLA 22 Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; AREA TOTAL, S.F.B. (Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	≠ 8.113 (22)					
DIA 3	≠ 9.3434 (22)	0.3635 (22)				
DIA 5	0.3142 (22)	≠ 7.8277 (22)	≠ 9.0018 (22)			
DIA 6	≠ 8.6781 (22)	≠ 7.3040 (22)	≠ 2.0945 (22)	≠ 8.4739 (22)		
DIA 7	≠ 5.9953 (22)	0.7330 (22)	0.5413 (22)	≠ 5.7981 (22)	≠ 2.2347 (22)	
DIA 10	≠ 3.7964 (22)	1.1312 (22)	1.0029 (22)	≠ 3.7750 (22)	0.0081 (22)	1.2020 (22)

CONCENTRACION 0.5Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	≠ 14.434 (22)					
DIA 3	≠ 11.713 (22)	≠ 4.1714 (22)				
DIA 5	≠ 6.2333 (22)	≠ 10.898 (22)	≠ 7.3783 (22)			
DIA 6	≠ 11.210 (22)	≠ 7.1196 (22)	≠ 5.0888 (22)	≠ 9.2090 (22)		
DIA 7	≠ 16.020 (22)	≠ 7.2851 (22)	≠ 2.3626 (22)	≠ 10.949 (22)	≠ 3.8061 (22)	
DIA 10	≠ 3.5280 (22)	0.5020 (22)	0.9110 (22)	≠ 2.7094 (22)	1.5069 (22)	0.2437 (22)

CONCENTRACION 5.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	≠ 15.706 (22)					
DIA 3	≠ 8.6172 (22)	≠ 7.7299 (22)				
DIA 5	≠ 5.0253 (22)	≠ 5.5252 (22)	0.7369 (22)			
DIA 6	≠ 5.2878 (22)	≠ 2.7315 (22)	1.3708 (22)	1.3422 (22)		
DIA 7	≠ 7.5872 (22)	1.4240 (22)	≠ 3.1729 (22)	≠ 2.8401 (22)	1.1817 (22)	
DIA 10	≠ 8.8147 (22)	≠ 10.919 (22)	≠ 3.9531 (22)	≠ 2.3904 (22)	≠ 3.3363 (22)	≠ 5.3153 (22)

CONCENTRACION 10.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	≠ 6.2850 (20)					
DIA 3	≠ 3.3356 (20)	≠ 3.2858 (22)				
DIA 5	≠ 2.9886 (20)	≠ 3.1329 (22)	0.1172 (22)			
DIA 6	≠ 2.6190 (20)	≠ 2.2863 (22)	0.1137 (22)	0.1985 (22)		
DIA 7	≠ 3.9901 (20)	1.0445 (22)	1.4895 (22)	1.5083 (22)	1.1134 (22)	
DIA 10	1.7409 (20)	1.9000 (22)	0.1456 (22)	0.0742 (22)	0.2055 (22)	1.0813 (22)

TABLA 23 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; AREA TOTAL, S.F.E.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

DIA 1

	CONC 0Z	CONC 0.5Z	CONC 5Z
CONC 0.5Z	* 2.9724 (22)		
CONC 5Z	1.8780 (22)	1.3086 (22)	
CONC 10Z	0.1017 (20)	* 2.2080 (20)	1.4667 (20)

DIA 2

	CONC 0Z	CONC 0.5Z	CONC 5Z
CONC 0.5Z	* 2.5536 (22)		
CONC 5Z	0.7717 (22)	* 4.0757 (22)	
CONC 10Z	* 2.7777 (22)	* 5.4708 (22)	* 2.3056 (22)

DIA 3

	CONC 0Z	CONC 0.5Z	CONC 5Z
CONC 0.5Z	1.7383 (22)		
CONC 5Z	* 6.4106 (22)	* 4.9987 (22)	
CONC 10Z	* 5.4984 (22)	* 4.0774 (22)	0.2947 (22)

DIA 5

	CONC 0Z	CONC 0.5Z	CONC 5Z
CONC 0.5Z	1.5877 (22)		
CONC 5Z	* 3.0556 (22)	* 2.0793 (22)	
CONC 10Z	* 3.4977 (22)	* 2.5293 (22)	0.2917 (22)

DIA 6

	CONC 0Z	CONC 0.5Z	CONC 5Z
CONC 0.5Z	1.6327 (22)		
CONC 5Z	* 4.5385 (22)	* 5.9748 (22)	
CONC 10Z	* 5.3407 (22)	* 6.7293 (22)	0.8214 (22)

DIA 7

	CONC 0Z	CONC 0.5Z	CONC 5Z
CONC 0.5Z	0.8188 (22)		
CONC 5Z	1.2098 (22)	* 2.7495 (22)	
CONC 10Z	2.0715 (22)	* 4.0041 (22)	1.0364 (22)

DIA 10

	CONC 0Z	CONC 0.5Z	CONC 5Z
CONC 0.5Z	0.4735 (22)		
CONC 5Z	* 3.5226 (22)	* 2.7966 (22)	
CONC 10Z	* 2.6187 (22)	1.9679 (22)	1.4655 (22)

TABLA 24 Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; AREA PROMEDIO, S.F.B.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	1.1505 (22)					
DIA 3	0.2852 (22)	* 2.4571 (22)				
DIA 5	0.6357 (22)	* 2.8768 (22)	0.6358 (22)			
DIA 6	* 4.1307 (22)	* 4.5262 (22)	* 7.2509 (22)	* 7.3969 (22)		
DIA 7	0.4063 (22)	1.3832 (22)	1.3694 (22)	1.9217 (22)	* 6.4420 (22)	
DIA 10	1.4433 (22)	1.3967 (22)	1.4554 (22)	1.4698 (22)	1.2697 (22)	1.4283 (22)

CONCENTRACION 0.5Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	1.7523 (22)					
DIA 3	1.2979 (22)	* 9.3058 (22)				
DIA 5	1.6149 (22)	* 10.659 (22)	1.5342 (22)			
DIA 6	1.6487 (22)	1.8968 (22)	* 8.0974 (22)	* 9.0389 (22)		
DIA 7	0.7074 (22)	* 7.5173 (22)	* 3.0390 (22)	* 4.8484 (22)	* 6.6792 (22)	
DIA 10	1.6558 (22)	1.6138 (22)	1.7003 (22)	1.7109 (22)	1.5985 (22)	1.6804 (22)

CONCENTRACION 5.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	0.7646 (22)					
DIA 3	1.8204 (22)	* 10.081 (22)				
DIA 5	1.7987 (22)	* 9.7202 (22)	0.0998 (22)			
DIA 6	0.0039 (22)	1.5820 (22)	* 3.9892 (22)	* 3.9116 (22)		
DIA 7	0.2057 (22)	1.1805 (22)	1.7880 (22)	1.7625 (22)	0.2755 (22)	
DIA 10	0.9334 (22)	0.8218 (22)	1.2305 (22)	1.2276 (22)	0.9431 (22)	0.9783 (22)

CONCENTRACION 10.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	0.6558 (20)					
DIA 3	* 2.2412 (20)	* 10.640 (22)				
DIA 5	1.5782 (20)	* 4.4219 (22)	* 3.7364 (22)			
DIA 6	1.2162 (20)	* 2.4915 (22)	* 5.1295 (22)	1.4676 (22)		
DIA 7	1.3133 (20)	* 2.8951 (22)	* 4.4019 (22)	1.0228 (22)	0.3772 (22)	
DIA 10	1.0844 (20)	1.3150 (22)	1.5759 (22)	1.4695 (22)	1.4099 (22)	1.4266 (22)

TABLA 25 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; AREA PROMEDIO, S.F.B. (Los grados de libertad entre paréntesis)

DIA 1			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	0.3796 (22)		
CONC. 5Z	0.4180 (22)	0.7777 (22)	
CONC. 10Z	0.3472 (20)	0.0037 (20)	0.6613 (20)

DIA 2			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.8258 (22)		
CONC. 5Z	1.9218 (22)	≠ 5.4733 (22)	
CONC. 10Z	≠ 7.9864 (22)	≠ 7.1940 (22)	1.7770 (22)

DIA 3			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.8258 (22)		
CONC. 5Z	≠ 5.1725 (22)	≠ 5.6253 (22)	
CONC. 10Z	≠ 5.8536 (22)	≠ 7.0768 (22)	1.5407 (22)

DIA 5			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.7178 (22)		
CONC. 5Z	≠ 3.6757 (22)	≠ 3.8081 (22)	
CONC. 10Z	≠ 2.0164 (22)	0.6292 (22)	≠ 2.5356 (22)

DIA 6			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	≠ 2.3626 (22)		
CONC. 5Z	≠ 7.3412 (22)	≠ 5.5113 (22)	
CONC. 10Z	≠ 9.4325 (22)	≠ 7.7397 (22)	1.1501 (22)

DIA 7			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.9205 (22)		
CONC. 5Z	1.3637 (22)	0.6090 (22)	
CONC. 10Z	≠ 3.9087 (22)	≠ 2.0759 (22)	0.5242 (22)

DIA 10			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	0.5887 (22)		
CONC. 5Z	1.2011 (22)	1.5135 (22)	
CONC. 10Z	0.9621 (22)	1.3521 (22)	0.5328 (22)

TABLA 26 Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; DIAMETRO, S.F.B.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.0%						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	1.6358 (22)					
DIA 3	0.0636 (22)	* 2.6160 (22)				
DIA 5	0.6008 (22)	* 2.7884 (22)	0.7471 (22)			
DIA 6	* 4.6836 (22)	* 4.5777 (22)	* 7.2556 (22)	* 6.4532 (22)		
DIA 7	0.8296 (22)	1.4166 (22)	1.4882 (22)	1.8974 (22)	* 6.4648 (22)	
DIA 10	* 2.2477 (22)	2.0102 (22)	* 2.7778 (22)	* 2.3587 (22)	1.5363 (22)	* 2.1430 (22)
CONCENTRACION 0.5%						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	1.9085 (22)					
DIA 3	1.1517 (22)	* 9.7489 (22)				
DIA 5	1.6130 (22)	* 11.293 (22)	1.5824 (22)			
DIA 6	* 2.2717 (22)	1.0406 (22)	* 8.8003 (22)	* 10.007 (22)		
DIA 7	0.3390 (22)	* 7.8950 (22)	* 3.1185 (22)	* 4.9311 (22)	* 7.1613 (22)	
DIA 10	2.0728 (22)	1.8332 (22)	* 2.2432 (22)	* 2.3046 (22)	1.7747 (22)	* 2.1348 (22)
CONCENTRACION 5.0%						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	1.3894 (22)					
DIA 3	* 2.2484 (22)	* 10.632 (22)				
DIA 5	* 2.2110 (22)	* 10.806 (22)	0.0740 (22)			
DIA 6	0.2787 (22)	1.7402 (22)	* 4.2770 (22)	* 4.1612 (22)		
DIA 7	0.0394 (22)	2.8346 (22)	* 5.2032 (22)	* 4.9794 (22)	0.3969 (22)	
DIA 10	0.9231 (22)	0.5189 (22)	1.6677 (22)	1.6596 (22)	0.8534 (22)	0.9454 (22)
CONCENTRACION 10.0%						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	0.2122 (20)					
DIA 3	* 2.6012 (20)	* 11.442 (22)				
DIA 5	1.5188 (20)	* 4.5202 (20)	* 3.9355 (22)			
DIA 6	0.9954 (20)	* 2.6049 (22)	* 5.6050 (22)	1.5123 (22)		
DIA 7	1.1442 (20)	* 2.6056 (22)	* 3.8697 (22)	0.8302 (22)	0.4364 (22)	
DIA 10	1.1020 (20)	1.3430 (22)	* 2.1756 (22)	1.8080 (22)	1.6223 (22)	1.6819 (22)

TABLA 27 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; DIAMETRO, S.F.B. (Los grados de libertad entre paréntesis)

DTA 1

	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	0.7777 (77)		
CONC. 5Z	0.5929 (77)	0.7693 (77)	
CONC. 10Z	0.1487 (70)	0.0846 (70)	0.5976 (70)

DTA 2

	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.9939 (77)		
CONC. 5Z	1.9387 (77)	≠ 5.4919 (77)	
CONC. 10Z	≠ 3.1678 (77)	≠ 7.4597 (77)	1.7452 (77)

DTA 3

	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.8355 (77)		
CONC. 5Z	≠ 5.8571 (77)	≠ 5.9975 (77)	
CONC. 10Z	≠ 6.8055 (77)	≠ 7.6548 (77)	1.5650 (77)

DTA 5

	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.2379 (77)		
CONC. 5Z	≠ 3.0804 (77)	≠ 2.9433 (77)	
CONC. 10Z	1.5774 (77)	0.7129 (77)	≠ 2.5949 (77)

DTA 6

	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	≠ 7.2565 (77)		
CONC. 5Z	≠ 7.1597 (77)	≠ 5.5171 (77)	
CONC. 10Z	≠ 9.8000 (77)	≠ 8.1614 (77)	1.0615 (77)

DTA 7

	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	1.9343 (77)		
CONC. 5Z	≠ 2.9032 (77)	1.6976 (77)	
CONC. 10Z	≠ 3.7749 (77)	≠ 2.7748 (77)	1.1327 (77)

DTA 10

	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	0.4298 (77)		
CONC. 5Z	1.7565 (77)	1.8047 (77)	
CONC. 10Z	1.2661 (77)	1.4475 (77)	0.6131 (77)

TABLEA 2B Significancia de las comparaciones entre los días de cada concentración; DENSIDAD, S.F.B.
(Los grados de libertad entre paréntesis)

CONCENTRACION 0.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	* 7.4516 (22)					
DIA 3	* 14.017 (22)	* 4.2888 (22)				
DIA 5	0.2892 (22)	* 7.5452 (22)	* 13.981 (22)			
DIA 6	* 5.7803 (22)	1.7787 (22)	* 6.4418 (22)	* 5.9728 (22)		
DIA 7	* 6.6234 (22)	0.6145 (22)	* 2.8041 (22)	* 6.7423 (22)	2.0646 (22)	
DIA 10	0.2710 (22)	* 6.7967 (22)	* 12.672 (22)	0.5307 (22)	* 5.1817 (22)	* 6.1897 (22)

CONCENTRACION 0.5Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	* 14.535 (22)					
DIA 3	* 13.352 (22)	* 3.1935 (22)				
DIA 5	* 8.0295 (22)	* 7.3951 (22)	* 8.4592 (22)			
DIA 6	* 14.148 (22)	* 2.1300 (22)	1.2371 (22)	* 8.3305 (22)		
DIA 7	* 11.954 (22)	* 3.1759 (22)	0.3197 (22)	* 7.7232 (22)	1.4544 (22)	
DIA 10	1.8468 (22)	* 4.0143 (22)	* 5.5068 (22)	1.0422 (22)	* 4.9463 (22)	* 5.4906 (22)

CONCENTRACION 5.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	* 11.821 (22)					
DIA 3	* 8.1258 (22)	1.6736 (22)				
DIA 5	* 5.8127 (22)	0.6442 (22)	0.5310 (22)			
DIA 6	* 6.2581 (22)	2.0017 (22)	* 2.7306 (22)	1.6613 (22)		
DIA 7	* 6.7842 (22)	0.3747 (22)	0.9501 (22)	0.2849 (22)	1.6171 (22)	
DIA 10	1.9526 (22)	* 9.4218 (22)	* 6.8126 (22)	* 4.7782 (22)	* 4.6503 (22)	* 5.5000 (22)

CONCENTRACION 10.0Z						
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 6	DIA 7
DIA 2	* 4.7787 (20)					
DIA 3	* 5.9777 (20)	* 3.4971 (22)				
DIA 5	* 3.2942 (20)	0.0960 (22)	* 2.3964 (22)			
DIA 6	* 2.5314 (20)	1.8075 (22)	* 4.1195 (22)	1.2657 (22)		
DIA 7	* 3.5132 (20)	0.5938 (22)	1.8753 (22)	0.3879 (22)	1.6323 (22)	
DIA 10	0.5029 (20)	* 6.0462 (22)	* 7.1407 (22)	* 4.1308 (22)	* 3.3753 (22)	* 4.3459 (22)

TABLA 29 Significancia de las comparaciones entre las concentraciones de cada día; DENSIDAD, S.F.B. (Los grados de libertad entre paréntesis)

DIA 1			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	* 7.8989 (77)		
CONC. 5Z	1.0154 (77)	1.4524 (77)	
CONC. 10Z	1.0080 (70)	* 7.6190 (70)	1.5848 (70)

DIA 2			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	0.9934 (77)		
CONC. 5Z	1.3736 (77)	0.3304 (77)	
CONC. 10Z	0.3514 (77)	0.9040 (77)	1.4208 (77)

DIA 3			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	0.0826 (77)		
CONC. 5Z	0.6604 (77)	0.6501 (77)	
CONC. 10Z	0.3731 (77)	0.7717 (77)	0.8200 (77)

DIA 5			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	* 4.3695 (77)		
CONC. 5Z	* 5.5476 (77)	* 3.8269 (77)	
CONC. 10Z	* 5.3390 (77)	* 3.3007 (77)	0.8557 (77)

DIA 6			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	* 4.5905 (77)		
CONC. 5Z	0.8424 (77)	* 3.1737 (77)	
CONC. 10Z	0.1452 (77)	* 3.6629 (77)	0.5937 (77)

DIA 7			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	* 2.6210 (77)		
CONC. 5Z	0.5202 (77)	1.8786 (77)	
CONC. 10Z	0.2753 (77)	1.9483 (77)	0.2345 (77)

DIA 10			
	CONC. 0Z	CONC. 0.5Z	CONC. 5Z
CONC. 0.5Z	0.5153 (77)		
CONC. 5Z	0.7902 (77)	0.1026 (77)	
CONC. 10Z	0.2700 (77)	0.3252 (77)	0.3635 (77)

TABLA 30 Significancia de las comparaciones entre los días de cada suero; AREA TOTAL
(Los grados de libertad entre paréntesis)

S.F.R.					
	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	≠ 9,7126 (22)				
DIA 4	≠ 11,143 (22)	≠ 7,0981 (22)			
DIA 5	≠ 11,036 (22)	≠ 9,3997 (22)	1,4509 (22)		
DIA 7	≠ 8,3801 (22)	0,0119 (22)	≠ 2,4404 (22)	≠ 2,0991 (22)	
DIA 10	≠ 4,3320 (22)	≠ 6,2808 (22)	≠ 8,2920 (22)	≠ 8,1512 (22)	≠ 4,8406 (22)

S.C.					
	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	≠ 14,411 (22)				
DIA 4	≠ 15,491 (22)	≠ 5,2390 (22)			
DIA 5	≠ 9,6752 (22)	1,2731 (22)	1,2171 (22)		
DIA 7	≠ 10,034 (22)	1,0739 (22)	1,6108 (22)	0,2227 (22)	
DIA 10	≠ 10,054 (22)	≠ 2,4913 (22)	≠ 5,6070 (22)	≠ 2,4082 (22)	≠ 2,3074 (22)

S.T.					
	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	≠ 12,850 (22)				
DIA 4	≠ 15,423 (22)	≠ 9,2650 (22)			
DIA 5	≠ 8,1796 (22)	≠ 3,9288 (22)	≠ 7,2041 (22)		
DIA 7	≠ 8,6625 (22)	≠ 4,2862 (22)	≠ 8,0904 (22)	0,1246 (22)	
DIA 10	≠ 15,084 (22)	≠ 7,4828 (22)	1,1294 (22)	≠ 6,8082 (22)	≠ 7,6036 (22)

TABLA 31 Significancia de las comparaciones entre los sueros para cada día; AREA TOTAL
(Los grados de libertad entre paréntesis)

		DIA 1	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 4.0101 (22)		
S.C.	* 3.2151 (22)	* 8.4106 (22)	
		DIA 2	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	0.2474 (22)		
S.C.	* 5.6755 (22)	* 6.1618 (22)	
		DIA 4	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	0.3314 (22)		
S.C.	* 3.4909 (22)	* 2.2630 (22)	
		DIA 5	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	1.0327 (22)		
S.C.	* 7.8780 (22)	* 5.7583 (22)	
		DIA 7	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	0.7386 (22)		
S.C.	* 4.9336 (22)	* 6.1806 (22)	
		DIA 10	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 4.9287 (22)		
S.C.	* 7.0549 (22)	* 2.9793 (22)	

TABLA 32 Significancia de las comparaciones entre los días de cada suero: AREA PROMEDIO
(Los grados de libertad entre paréntesis)

S.F.R.

	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	* 17,814 (22)				
DIA 4	* 16,477 (22)	0,5317 (22)			
DIA 5	* 14,604 (22)	* 12,358 (22)	* 6,5669 (22)		
DIA 7	* 2,1380 (22)	* 2,8755 (22)	* 7,9784 (22)	1,9779 (22)	
DIA 10	0,0378 (22)	* 6,5171 (22)	* 6,5268 (22)	* 5,3597 (22)	1,7301 (22)

S.T.

	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	* 21,008 (22)				
DIA 4	* 18,301 (22)	1,1509 (22)			
DIA 5	* 7,4073 (22)	* 4,0963 (22)	* 4,2471 (22)		
DIA 7	0,1644 (22)	* 2,5044 (22)	* 2,5878 (22)	1,7775 (22)	
DIA 10	* 7,5783 (22)	* 7,0295 (22)	* 6,7995 (22)	1,0148 (22)	1,5025 (22)

S.C.

	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	* 21,527 (22)				
DIA 4	* 18,940 (22)	* 5,2117 (22)			
DIA 5	* 10,080 (22)	* 8,7001 (22)	* 6,3115 (22)		
DIA 7	* 2,4424 (22)	* 7,0540 (22)	0,6166 (22)	* 5,2480 (22)	
DIA 10	* 20,644 (22)	1,8038 (22)	* 3,3519 (22)	* 7,9226 (22)	* 6,9198 (22)

TABLEA 34 Significancia de las comparaciones entre los días de cada suero; DIAMETRO (Los grados de libertad entre paréntesis)

S.F.R.

	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	≠ 22,788 (22)				
DIA 4	≠ 16,177 (22)	0,8302 (22)			
DIA 5	≠ 18,120 (22)	≠ 12,087 (22)	≠ 5,5960 (22)		
DIA 7	≠ 2,5331 (22)	≠ 2,8918 (22)	≠ 3,8301 (22)	1,4948 (22)	
DIA 10	0,3772 (22)	≠ 7,5892 (22)	≠ 7,4003 (22)	≠ 5,5770 (22)	1,9445 (22)

S.T.

	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DTA 2	≠ 28,675 (22)				
DTA 4	≠ 16,327 (22)	1,5941 (22)			
DTA 5	≠ 7,6071 (22)	≠ 5,5541 (22)	≠ 5,3651 (22)		
DTA 7	0,7412 (22)	≠ 2,8391 (22)	≠ 3,1096 (22)	1,3627 (22)	
DTA 10	≠ 7,0571 (22)	≠ 8,3341 (22)	≠ 7,2083 (22)	1,1867 (22)	0,9850 (22)

S.C.

	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DTA 2	≠ 31,806 (22)				
DIA 4	≠ 24,967 (22)	≠ 5,2957 (22)			
DIA 5	≠ 10,055 (22)	≠ 9,8007 (22)	≠ 6,5448 (22)		
DIA 7	≠ 2,2437 (22)	≠ 9,6938 (22)	≠ 8,5764 (22)	≠ 5,9057 (22)	
DTA 10	≠ 28,922 (22)	1,8153 (22)	≠ 3,3745 (22)	≠ 8,6533 (22)	≠ 9,3227 (22)

TABLA 33 Significancia de las comparaciones entre los sueros para cada día; AREA PROMEDIO (Los grados de libertad entre paréntesis)

		DIA 1	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 7.3713 (??)		
S.C.	1.5058 (??)	* 9.8818 (??)	
		DIA 2	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 9.1188 (??)		
S.C.	0.5949 (??)	* 8.6812 (??)	
		DIA 4	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 2.9162 (??)		
S.C.	* 4.0131 (??)	* 8.7551 (??)	
		DIA 5	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	1.2677 (??)		
S.C.	* 5.1903 (??)	0.6046 (??)	
		DIA 7	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	0.0510 (??)		
S.C.	* 3.6981 (??)	* 3.1430 (??)	
		DIA 10	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 5.2238 (??)		
S.C.	* 6.2412 (??)	* 3.3826 (??)	

TABLA 35 Significancia de las comparaciones entre los sueros para cada día; DIAMETRO
(Los grados de libertad entre paréntesis)

		DIA 1	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 7,7843 (22)		
S.C.	1,6599 (22)	* 11,456 (22)	
		DIA 2	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 9,5998 (22)		
S.C.	0,5776 (22)	* 9,4472 (22)	
		DIA 4	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 7,8458 (22)		
S.C.	* 3,7677 (22)	* 5,9486 (22)	
		DIA 5	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	1,7431 (22)		
S.C.	* 5,2672 (22)	* 4,8991 (22)	
		DIA 7	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	0,2065 (22)		
S.C.	* 3,8307 (22)	* 3,5531 (22)	
		DIA 10	
		S.F.R.	S.T.
S.T.	* 5,3270 (22)		
S.C.	* 7,8439 (22)	* 3,3511 (22)	

TABLA 36 Significancia de las comparaciones entre los días de cada suero; DENSIDAD (Los grados de libertad entre paréntesis)

S.F.R.					
	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	* 11.090 (72)				
DIA 4	1.7590 (72)	* 9.6086 (72)			
DIA 5	* 3.4967 (72)	* 17.038 (72)	0.4338 (72)		
DIA 7	0.0137 (72)	* 7.0709 (72)	1.0665 (72)	0.9677 (72)	
DIA 10	* 5.9332 (72)	* 3.4300 (72)	* 5.7554 (72)	* 6.9414 (72)	* 3.8810 (72)
S.T.					
	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	* 16.748 (72)				
DIA 4	0.1159 (72)	* 8.6082 (72)			
DIA 5	0.7365 (72)	* 5.9053 (72)	0.5380 (72)		
DIA 7	0.4186 (72)	* 8.7144 (72)	0.7188 (72)	0.3561 (72)	
DIA 10	* 8.4674 (72)	* 8.4884 (72)	* 3.3607 (72)	1.8261 (72)	* 3.0190 (72)
S.C.					
	DIA 1	DIA 2	DIA 4	DIA 5	DIA 7
DIA 2	* 15.974 (72)				
DIA 4	0.8260 (72)	* 13.847 (72)			
DIA 5	* 5.9171 (72)	* 3.1228 (72)	* 5.3177 (72)		
DIA 7	1.7481 (72)	* 13.588 (72)	0.7779 (72)	* 5.7330 (72)	
DIA 10	* 3.7717 (72)	* 11.307 (72)	* 7.3534 (72)	* 4.0597 (72)	* 2.1813 (72)

TABLA 37 Significancia de las comparaciones entre los sueros para cada día; DENSIDAD
(Los grados de libertad entre paréntesis)

DIA 1		
	S.F.R.	S.T.
S.T.	0,4768 (22)	
S.C.	≠ 3,0674 (22)	≠ 2,7975 (22)

DIA 2		
	S.F.R.	S.T.
S.T.	≠ 6,1012 (22)	
S.C.	≠ 6,5676 (22)	0,2944 (22)

DIA 4		
	S.F.R.	S.T.
S.T.	0,8860 (22)	
S.C.	≠ 2,9819 (22)	0,7170 (22)

DIA 5		
	S.F.R.	S.T.
S.T.	1,1882 (22)	
S.C.	≠ 7,0775 (22)	≠ 3,2341 (22)

DIA 7		
	S.F.R.	S.T.
S.T.	0,4072 (22)	
S.C.	1,5431 (22)	0,5526 (22)

DIA 10		
	S.F.R.	S.T.
S.T.	1,1417 (22)	
S.C.	1,2063 (22)	≠ 2,5799 (22)