

152  
2Ej.



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFEECTO DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA EN QUE  
PERMANECEN LAS MUESTRAS DE SANGRE CAPRINA,  
ANTES DE LA CENTRIFUGACION, SOBRE LOS NIVELES  
DE PROGESTERONA DETECTABLES EN PLASMA.**

## T E S I S

Que para obtener el Título de  
Médico Veterinario Zootecnista

p r e s e n t a

**HECTOR ALEJANDRO NAVARRO GONZALEZ**



Asesores: M.V.Z. Luis Zarco Quintero  
M.V.Z. Andrés Ducoing Watty

México, D. F.

1987



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 está 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.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. RESUMEN. ....	1
II. INTRODUCCION. ....	3
III. MATERIAL Y METODOS. ....	10
IV. RESULTADOS. ....	13
V. DISCUSION. ....	15
VI. LITERATURA CITADA. ....	21
VII. FIGURAS. ....	25
VIII. CUADROS. ....	28

I. RESUMEN

NAVARRO GONZALEZ HECTOR ALEJANDRO. Efecto del tiempo y la temperatura en que permanecen las muestras de sangre caprina antes de la centrifugación, sobre los niveles de progesterona detectable en plasma. (Bajo la dirección de: Luis Zarco Quintero y Andrés Ducoing Watty).

En la investigación sobre aspectos reproductivos de la hembra, es de gran utilidad la cuantificación de los niveles de progesterona como una herramienta para explicar los fenómenos reproductivos. Es importante determinar si el tiempo transcurrido entre la toma de una muestra sanguínea de cabra y su centrifugación, así como la temperatura a la que ésta se conserva afectan la concentración de progesterona detectable en el plasma. Una vez determinados los factores que afectan la correcta estimación de los niveles hormonales, es posible establecer medidas de manejo de muestras que permitan realizar trabajos científicos con una adecuada metodología. Para éste trabajo se utilizaron 12 cabras gestantes de una granja de Xochimilco, D.F. De cada una se obtuvieron 100 ml de sangre con tubos Vacutainer heparinizados. Del volumen total de sangre se extrajo una primera alícuota de 3 ml y se centrifugó en los primeros 5 minutos, del resto de la muestra se hicieron 30 alícuotas de 3 ml, 15 se conservaron a temperatura ambiente (22°C) y 15 en refrigeración (4°C). Se centrifugó una muestra de cada grupo, cada media hora, hasta completar 6 horas y a las 8, 12 y 24 horas. Los niveles de progesterona fueron constantes a través del tiempo dentro de cada grupo, sin embargo fueron más altos en las muestras conservadas en refrigeración. De acuerdo a lo anterior puede decirse que en la cabra la progesterona no se metaboliza, por lo que es indispensable centrifugar la muestra inmediatamente después de su obtención.

## II. INTRODUCCION

Dada la creciente inquietud por la explotación de animales productivos y adaptables a las condiciones ambientales imperantes en la República Mexicana, como es el caso del ganado caprino, se ha hecho necesario contar con elementos de investigación que sirvan de apoyo para la profundización en el conocimiento de la especie, así como para realizar trabajos de investigación de mayor confiabilidad y valor científico.

Es indudable que gran parte del avance en el conocimiento de una especie está ligado al conocimiento de los aspectos reproductivos característicos de la misma y éstos a su vez al conocimiento de los fenómenos endocrinológicos que dan soporte a las diversas manifestaciones de índole reproductivo (3).

En la investigación sobre aspectos reproductivos de la hembra, es de mucha utilidad la cuantificación de los niveles de progesterona en el plasma (6),(7); sin embargo es importante considerar los factores que afectan la estabilidad de las hormonas en muestras biológicas almacenadas bajo diversas condiciones. En algunos casos el trato y almacenaje que reciben las muestras antes del análisis influye más sobre el resultado final, que la precisión y exactitud del método de Radioinmunoanálisis (RIA) empleado (5). Por tanto se hace necesario determinar los factores que afectan la estimación de los niveles hormonales a fin de poder establecer medidas de manejo de muestras que permitan

realizar trabajos científicos con la correcta metodología. Sin embargo, existe poca información acerca de los factores que afectan las concentraciones hormonales en suero y plasma después de que las muestras de sangre se toman y antes de realizar el RIA (10) (13).

Vahdat et al. (10), estudiaron los efectos de el tiempo y temperatura de almacenamiento de sangre bovina, encontrando que la concentración promedio de progesterona en plasma se redujo de 6.6 ng/ml encontrados inicialmente a 1.7 y 2.8 ng/ml cuando incubaron la sangre a 40°C durante 6 y 24 horas respectivamente, antes de ser centrifugada para separar el plasma. Aún cuando la temperatura de incubación se redujo a 4°C, la concentración de progesterona se redujo a 4.2 ng/ml cuando se dejaron pasar 24 horas antes de la centrifugación. Cuando la determinación de progesterona se realizó en suero, se demostró que los niveles de progesterona detectables también disminuyeron conforme aumentó el intervalo entre la toma de muestra y la separación del coágulo, sin embargo el efecto no fué tan marcado como en el caso del plasma.

En un trabajo más reciente, Vahdat et al. (11) encontraron que la concentración media de progesterona en el plasma de muestras de sangre bovina decreció de 5.7 ng/ml en la hora cero, a concentraciones mínimas de 3.5 ng/ml después de incubar a 4°C por 12 horas, 0.9 ng/ml al incubar a 22°C por 12 horas y 1.0 ng/ml después de incubar a 37°C por 8 horas. En dicho trabajo se encontró que al incubar a 22 o

37°C, la concentración de progesterona se redujo significativamente al pasar tan solo una hora desde la toma de la muestra.

Oltner y Edqvist (5) estudiaron los cambios en los niveles de progesterona en la sangre de la vaca, yegua, perra y cerda. En el caso de la vaca encontraron que después de una incubación de 2 y 6 horas a 20 y 4°C respectivamente, se observaba un decremento altamente significativo ( $P < 0.01$ ) en la concentración de progesterona. Cuando la sangre se almacenó a temperatura ambiente los niveles de progesterona se acercaron a cero después de 1 o 2 días, sin embargo después de 2 a 5 días de almacenamiento, se observó un significativo aumento en los niveles detectables de progesterona.

Wiseman et al. (13) realizaron también estudios en diferentes especies como los suinos, equinos, ovinos y bovinos, encontrando que en el caso de la cerda y yegua, la forma de conservación de muestras de sangre heparinizadas entre la colección y la centrifugación no afectaba los niveles de progesterona, pero que sin embargo la sangre al ser conservada a 4°C presentaba niveles de progesterona más constantes a través del tiempo que al conservarla a 22°C. En el caso de la oveja, los niveles de progesterona también fueron constantes al conservar la sangre heparinizada a 4°C, pero no así a 22°C. En el bovino el decremento fue observado sin importar la forma en la que se conservaron

las muestras antes de la centrifugación, aunque el decremento fué más drástico cuando las muestras se conservaron a 22°C - que al hacerlo a 4°C.

Es importante resaltar el hecho de que todos los autores que estudiaron el efecto del tiempo y la temperatura sobre los niveles de progesterona en muestras de sangre bovina, coinciden en que el decremento se inicia inmediatamente después de la toma de la muestra, aunque es más marcado cuando las muestras se conservan a una temperatura de 22°C que cuando se hace a 4°C.

Todos los autores consideran también importante el efecto de la temperatura a la cual se manejan las muestras de sangre de su centrifugación, como otro factor detrimental de los niveles hormonales y en especial la progesterona (2) (5) (6) (7) (10) (11) (13). Es importante mencionar para fines de éste trabajo que la progesterona es considerada como una de las hormonas más inestables (5) (7).

En todos los trabajos anteriores se ha puesto mayor interés en explicar lo que sucede con la progesterona en muestras de sangre bovina, por lo que es de esta especie de la que se tiene mayor información, sin embargo para el caso del caprino, aunque podría suponerse que el comportamiento de las muestras sea similar a las del bovino, ésto no puede asegurarse, por lo que se hace necesario determinar el efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre los niveles de progesterona detectables en las muestras de

sangre de esta especie.

Este trabajo tiene como fin el de obtener las características óptimas del manejo de muestras sanguíneas de la especie caprina y destinadas a ser procesadas por RIA, en especial dado el efecto que se presenta sobre los niveles de progesterona en las muestras por el tiempo transcurrido desde la toma de estas hasta su centrifugación, como por la temperatura en la que se conservan antes de centrifugarse, a fin de que posteriormente esta información sea de utilidad a las personas que realicen investigación en la especie, permitiéndoles así obtener resultados más representativos. Para fines de este estudio se optó por realizar el RIA para la cuantificación de progesterona en plasma, debido a la facilidad para su obtención y pronta separación del paquete celular por centrifugación, así como por ser la fracción de la muestra más utilizada al realizarse este tipo de investigación.

#### HIPOTESIS

El tiempo transcurrido entre la toma de una muestra sanguínea de cabra y su centrifugación, así como la temperatura a la que ésta se conserva tiene un efecto sobre la concentración de progesterona en la muestra.

#### OBJETIVO

Determinar si el tiempo transcurrido entre la toma de una muestra sanguínea de cabra y su centrifugación, así como la temperatura a la que ésta se conserva tienen un

efecto sobre la concentración de progesterona en la muestra. -

III. MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en una granja particular en Xochimilco, D.F., utilizando 12 hembras gestantes, de raza criolla y seleccionadas al azar. De cada una se obtuvieron 100 ml de sangre utilizando 10 tubos Vacutainer heparinizados (heparina sódica) y agujas hipodérmicas especiales para tubo Vacutainer. Se obtuvieron 10 ml con cada tubo y posteriormente se vació el contenido de cada uno de ellos en un vaso de precipitado a fin de homogeneizar la muestra. De este volumen total de extrajo una primera alícuota de 3 ml, la cual fue centrifugada (1500 rpm/10 min.) dentro de los primeros 5 minutos posteriores a la toma de la muestra, obteniéndose el plasma y colocandolo en tubos de vidrio, a fin de que ésta representara el valor inicial de progesterona o tiempo número 1. En forma inmediata se procedió a dividir el resto de la muestra en 30 alícuotas de 3 ml en tubos de ensayo; hecho esto, la mitad de ellas fue refrigerada a 4°C y la otra fue conservada a temperatura ambiente (22°C). Posteriormente una muestra de cada grupo se centrifugo cada media hora a partir de la centrifugación inicial, realizando la misma operación con el plasma y hasta completar 6 horas posteriores a la primera centrifugación; las muestras restantes se centrifugaron a las 8, 12 y 24 horas, para de ésta forma completar 16 tiempos de centrifugación incluyendo la muestra número 1, común para ambos grupos. Todas las muestras de plasma fueron congeladas en seguida de ser separadas del paquete celular, y mantenidas a -20°C hasta el momento de su análisis a

través de Radioinmunoanálisis (de fase sólida, según técnica descrita por Revah (8)), a fin de determinar con éste los niveles de progesterona presentes en cada muestra.

#### ANALISIS ESTADISTICO

Los niveles de progesterona se evaluaron mediante un Análisis Estadístico Descriptivo y un Análisis de Varianza para un diseño factorial con dos factores, el tiempo después de la toma de la muestra y la temperatura de incubación; los efectos significativos se evaluaron mediante la prueba de Tukey para comparaciones múltiples (1).

**IV. RESULTADOS**

En el análisis de varianza realizado se encontró que -  
las concentraciones de progesterona encontradas en la -  
alícuotas conservadas a 4°C fueron mayores a las encontradas  
cuando se incubaron a temperatura ambiente (22°C), siendo -  
la diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) (Cuadro 1, Figura 1).

Aunque se registró un incremento inicial en los niveles  
de progesterona detectados en las muestras que habían sido -  
incubadas durante media hora o más, en comparación con el -  
valor encontrado en la muestra inicial, las diferencias -  
debidas al tiempo de incubación no fueron significativas ni  
en las muestras incubadas a temperatura ambiente (Figura 2),  
ni en las incubadas en refrigeración (Figura 3).

**V. DISCUSSION**

Se ha demostrado que en el bovino, la desaparición de la progesterona se debe a la actividad del paquete celular - sobre la misma (2) (5) (6) (7) (10) (11) (12) (13), ya que - la incubación del plasma o suero no resultó en una baja en - el nivel de progesterona, contrastando esto con el descenso en el nivel de progesterona en sangre completa casi inmediatamente después de la colección (11).

El mecanismo mediante el cual las células sanguíneas - hacen disminuir los niveles de progesterona no se conoce con precisión. Algunos autores apoyan la idea de que la progesterona que desaparece de la muestra se adhiere a la pared - celular de los eritrocitos, donde permanece secuestrada - (13), aunque Vahdat et al. (12) en sus últimos estudios - realizados en bovinos, no lograron detectar la presencia de progesterona en la superficie celular, suposición que se - habían hecho en su primer trabajo (10). Otros descartan éste mecanismo al considerar que la unión de progesterona con - eritrocitos no parece ser tan importante como la conversión por estos mismos, de la progesterona en  $20\alpha$ -dihidroprogesterona, compuesto de menor afinidad por el anticuerpo utilizado en - el RIA (4) (5) (9) (12). Se ha visto que la transformación - de la progesterona a  $20\alpha$ -dihidroprogesterona depende de - la presencia de glucosa, en cuya ausencia este metabolito se oxida, dando lugar nuevamente a progesterona (4) (9) (12). Lo anterior podría explicar en un momento dado lo ocurrido - en el bovino, en el que se observa una recuperación en el -

nivel de progesterona pasado un cierto número de horas -  
(5) (11) (12).

La situación anterior puede ser hasta cierto grado -  
controlada de acuerdo a lo encontrado por Vahdat et al. (12) -  
en sus últimos estudios, en los que reportan que los niveles -  
de progesterona en sangre bovina se ven menos afectados por -  
el tiempo y la temperatura de incubación, cuando se usa el -  
fluoruro de sodio como anticoagulante. El fluoruro tiene un -  
efecto inhibitorio de la glicolisis a través de la inhibición -  
de la enolasa, enzima indispensable para que las células -  
sanguíneas puedan utilizar la glucosa y por tanto generar -  
ATP (9), por lo que bajo estas circunstancias los -  
eritrocitos no pueden metabolizar la hormona.

El anterior comentario confirma de alguna forma el -  
hecho de que se requiere de células sanguíneas intactas -  
para que pueda ocurrir la degradación de la progesterona, ya -  
que de hecho la glicolisis es fuertemente reducida después -  
de la hemolisis completa (12).

Respecto a otros estudios sobre el efecto de los -  
anticoagulantes sobre la progesterona, Reimers et al. (7) -  
reportan que al incubar a 4°C, la concentración media de -  
progesterona decreció 55% a las 24 horas y 73% a las 72 -  
horas en el plasma de sangre bovina tratada con EDTA y -  
41% a las 72 horas en el suero de sangre bovina conservada a -  
ésta misma temperatura. A temperatura ambiente la concentra-  
ción media de progesterona decreció 35% a las 4 horas, 61% a

las 8 horas, 92% a las 24 horas y 93% a las 72 horas en el plasma de sangre tratada con EDTA; 49% a las 4 horas, 69% a las 8 horas, 91% a las 24 horas y 83% a las 72 horas en suero de sangre conservada a ésta misma temperatura.

Según lo expuesto en el capítulo de resultados puede decirse que en el caso de la cabra, no existe metabolización de progesterona, o bien que la heparina sódica es capaz de inactivar éste fenómeno. En el caso de las muestras en refrigeración, donde se observaron valores de progesterona más altos, existe la posibilidad de que la conservación a 4°C produzca un cierto grado de hemólisis, que se traduzca en la liberación de progesterona incluida dentro de los glóbulos rojos, así como adherida a la superficie celular.

Wiseman et al. (13) suponen que en el caso del bovino la progesterona se encuentra adherida a los eritrocitos. En caso de que sucediera lo mismo con la cabra, podríamos pensar que la disminución en la temperatura favorece la separación de la progesterona en la superficie celular.

La teoría que propone la interconversión de progesterona en 20 $\alpha$  dihidroxiprogesterona y apoyada por varios autores (4) (5) (9) (12), como la forma más confiable para explicar lo ocurrido en el bovino, no parece ser aplicable en el caso de la especie caprina. Lo anterior se desprende del hecho de que en la cabra, los niveles de progesterona permanecen muy constantes y sin disminuciones drásticas, que pudieran sugerirnos un proceso de metabolización de la

hormona. Esto último puede deberse a que los eritrocitos de la cabra no metabolizan la hormona, o a que la heparina sódica es capaz de inhibir este proceso. Cabe señalar que Wiseman et al. (13) reportan un fenómeno similar en la yegua y cerda, especies en las que la forma de conservación de muestras de sangre heparinizada, entre la colección y la centrifugación, no afectaba los niveles de progesterona, sin embargo la sangre al ser conservada a 4°C presentaba niveles de progesterona más constantes a través del tiempo que al conservarla a 22°C.

El saber que los niveles de progesterona en las muestras de sangre caprina se mantienen constantes a través del tiempo, y que es sólo la temperatura a la que se conservan la que marca un cierto grado de diferencia, resulta muy ventajoso para realizar investigación en la especie. Permite al investigador una mayor libertad en su diseño experimental, así como en su trabajo de campo, ya que si por circunstancias ajenas a su voluntad no le es posible mantener las muestras en condiciones óptimas de refrigeración, o bien centrifugarlas a la brevedad posible, sus resultados no se afectaran en forma significativa.

Si bien no importa la temperatura a la que se mantengan las muestras, siempre y cuando sea dentro de un rango razonable, siempre resultara mejor mantenerlas en refrigeración (4°C), debido a que conservandolas a temperatura ambiente (22°C), no es posible medir un cierto porcentaje de

hormona, la cual aparentemente se pierde con los glóbulos - rojos al realizar la centrifugación.

## VI. LITERATURA CITADA

- 1.- Ducoing, W.A. y Romero, M.P.: La Práctica Estadística: Aplicaciones en diversos campos de investigación. - Instituto de investigaciones en matemáticas aplicadas y en sistemas - UNAM. Serie azul. Monografías 90:22-23 - (1985).
- 2.- Holdsworth, R.J.: Measurement of progesterone in bovine plasma and preserved whole blood samples by a direct - radioimmunoassay. Br. vet. J., 136:135-140 (1980).
- 3.- McDonald, L.E.: Veterinary Endocrinology and Reproduction, 3rd. ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1980.
- 4.- Molen van der, H.J. and Groen, D.: Interconversion of - progesterone and  $20\alpha$ -dihydroprogesterone and - androstenedione and testosterone in vitro by blood and erythrocytes. Acta Endocr., 58:419-444 (1968). Cited by Oltner, R. and Edqvist, L.E. (5).
- 5.- Oltner, R. and Edqvist, L.E.: Changes in plasma - progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dog and pig. Acta vet. scand., 23:1-8 (1982).
- 6.- Owens, R.E., Atkins, D.T., Rahe, C.H., Fleeger, J.L. and Harms, P.C.: Time-dependent loss of radioimmunoassayable levels of progesterone following ambient temperature - incubation of heparinized bovine blood. Theriogenology, 13:305-309 (1980).
- 7.- Reimers, T.J., McCann, J.P. and Cowan, R.G.: Effect of

- storage times and temperatures on T3, T4, LH, prolactin, insulin, cortisol and progesterone concentrations in blood samples from cows. J. Anim. Sci., 57:683-691 (1983).
- 8.- Revah, M.I.: Actividad ovárica postparto en dos hatos de ganado Holstein en Aguascalientes. Efecto de la prostaglandina F2 sobre algunos parámetros reproductivos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
- 9.- Short, R.V.: Progesterone in blood. 1. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. J. Endocr., 16:415-425 (1958). Cited by Oltner, R. and Edqvist, L.E. (5).
- 10.- Vahdat, F., Hurtgen, J.P., Whitmore, H.L., Johnston, S. D. and Ketelsen, C.L.: Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. Theriogenology, 12:371-374 (1979).
- 11.- Vahdat, F., Hurtgen, J.P., Whitmore, H.L., Seguin, B.E. and Johnston, S.D.: Decline in assayable progesterone in bovine plasma: effect of time, temperatura, anticoagulant, and presence of blood cells. Am. J. vet. Res., 42:521-522 (1981).
- 12.- Vahdat, F., Seguin, B.E., Whitmore, H.L. and Johnston, S.D.: Role of blood cells on progesterone degradations

in bovine blood. Am. J. vet. Res., 45:240-243 (1984).

- 13.- Wiseman, B.S., Vicent, D.L., Thomford, P.J., Scheffrahn, H.S., Sargent, G.E. and Kesler, D.J.: Changes in porcine, ovine, bovine and equine blood progesterone concentrations between collection and centrifugation. Anim. Reprod. Sci., 5:157-165 (1983).

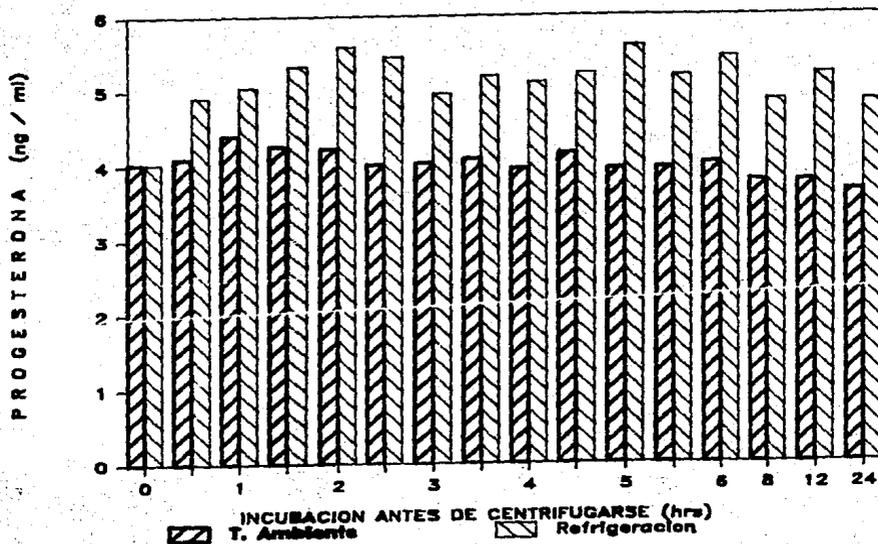


FIG. 1. CONCENTRACION PROMEDIO DE PROGESTERONA EN PLASMA PROVENIENTE DE MUESTRAS DE SANGRE INCUBADAS A TEMPERATURA AMBIENTE (22°C) O EN REFRIGERACION (4°C) DURANTE DIFERENTES INTERVALOS ANTES DE LA CENTRIFUGACION. OBSERSE QUE A PARTIR DE LAS 6 HORAS LA FRECUENCIA DE MUESTREO FUE MENOR, POR LO QUE LA ESCALA CAMBIA.

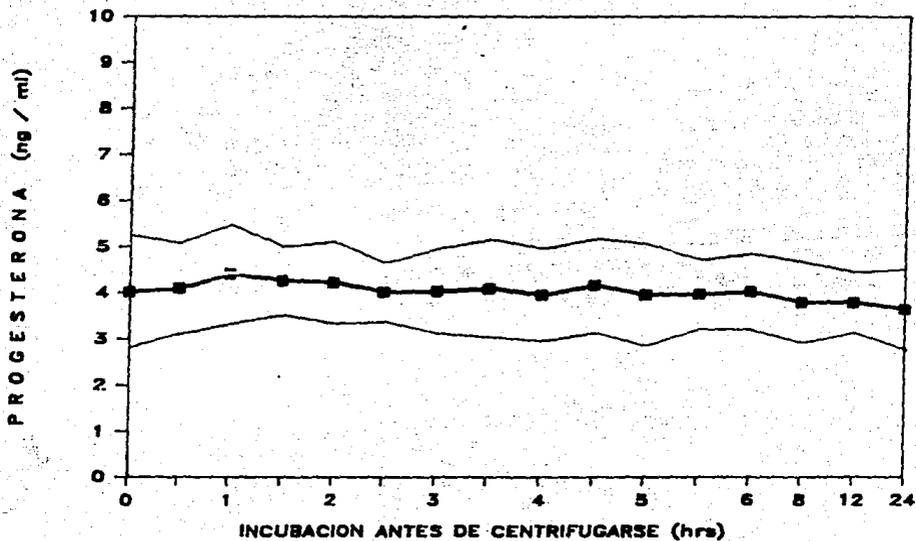
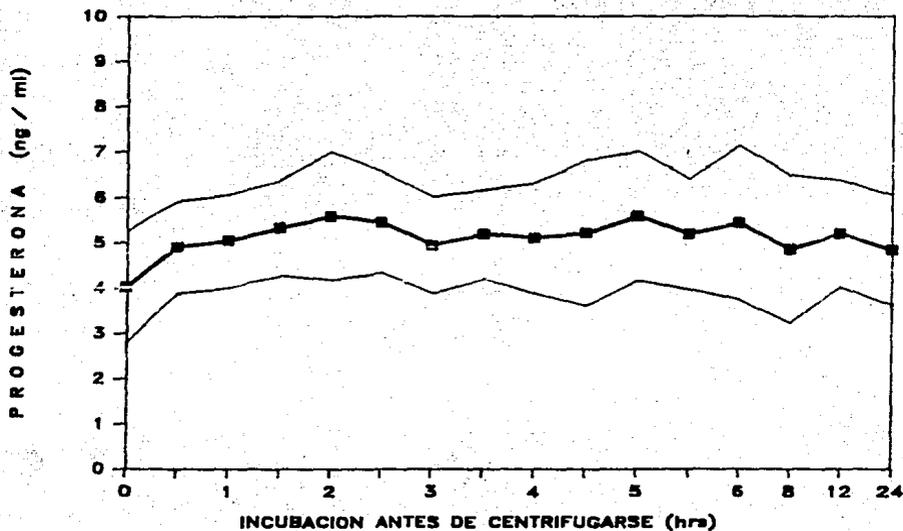


FIG. 2. CONCENTRACION DE PROGESTERONA EN PLASMA PROVENIENTE DE MUESTRAS DE SANGRE INCUBADAS A 22°C DURANTE DIFERENTES INTERVALOS ANTES DE LA CENTRIFUGACION. LAS LINEAS REPRESENTAN EL PROMEDIO (■—■—■) Y UNA DESVIACION ESTANDARD SOBRE Y BAJO EL PROMEDIO. OBSERSE QUE A PARTIR DE LAS 6 HORAS LAS MUESTRAS SE OBTUVIERON CON MENOR FRECUENCIA, POR LO QUE LA ESCALA CAMBIA.



**FIG. 3. CONCENTRACION DE PROGESTERONA EN PLASMA PROVENIENTE DE MUESTRAS DE SANGRE INCUBADAS A 4°C DURANTE DIFERENTES INTERVALOS ANTES DE LA CENTRIFUGACION. LAS LINEAS REPRESENTAN EL PROMEDIO (■—■—■) Y UNA DESVIACION ESTANDARD SOBRE Y BAJO EL PROMEDIO. OBSERSE QUE A PARTIR DE LAS 6 HORAS LAS MUESTRAS SE OBTUVIERON CON MENOR FRECUENCIA, POR LO QUE LA ESCALA CAMBIA.**

Cuadro 1. Valores promedio de progesterona (ng/ml) en -  
 muestras de sangre incubadas a 22°C o 4°C por diferentes -  
 intervalos de tiempo, antes de centrifugarse para separar  
 el plasma.

Tiempo (hrs.)	INCUBACION A TEMPERATURA					
	Ambiente (22°C)			REFRIGERACION (4°C)		
	$\bar{X}$	D.E.	C.V.	$\bar{X}$	D.E.	C.V.
0	4.0	1.2	30.5	4.0	1.2	30.5
.5	4.1	1.0	24.1	4.9	1.0	20.8
1.0	4.4	1.0	24.4	5.0	1.0	20.4
1.5	4.3	0.7	17.2	5.3	1.0	19.8
2.0	4.2	0.9	21.1	5.6	1.4	25.4
2.5	4.0	0.6	15.8	5.4	1.1	20.3
3.0	4.0	0.9	22.9	5.0	1.0	21.6
3.5	4.1	1.0	26.0	5.2	1.0	19.0
4.0	4.0	1.0	25.4	5.0	1.2	24.1
4.5	4.1	1.0	24.5	5.2	1.6	30.9
5.0	4.0	1.1	28.0	5.6	1.4	25.5
5.5	4.0	0.7	18.8	5.2	1.2	23.6
6.0	4.0	0.8	20.5	5.4	1.7	31.2
8.0	3.8	0.9	23.2	4.9	1.6	33.5
12.0	3.8	0.6	17.2	5.2	1.2	22.6
24.0	3.6	0.9	24.1	4.8	1.2	25.0

D.E. = Desviación estándar

C.V. = Coeficiente de variación