



---

**ANÁLOGO DE TEJIDO CONECTIVO A PARTIR DE FIBROBLASTOS  
GINGIVALES SEMBRADOS EN MEMBRANAS DE COLÁGENO COMERCIAL**

**Daniela Olávez<sup>1</sup>. Lisbeth Sosa<sup>2</sup>. Karla Padrón<sup>1</sup>. Siham Salmen<sup>3</sup>. Lisbeth Berrueta<sup>3</sup>.  
Lorena Dávila<sup>2</sup>. Gladys Velazco<sup>4</sup>. Susana Arteaga<sup>2</sup>. Leonel Castillo<sup>2</sup>. Eduvigis  
Solórzano<sup>1</sup>**

- 1. Grupo de Investigaciones Biopatológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (GIBFO-ULA).**
- 2. Grupo de Investigaciones en Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes**
- 3. Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de Los Andes (IDIC)**
- 4. Centro de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología Universidad de Los Andes.**

**CORRESPONDENCIA:** Dra. Eduvigis Solórzano, Facultad de Odontología, Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular LIBCEM-ULA. Universidad de Los Andes. Mérida Venezuela Tel/Fax 00(58)274-2402383

**Email:** [eduvigis@ula.ve](mailto:eduvigis@ula.ve).

**Recibido: 10-11-2012**  
**Aprobado: 09-01-2013**



---

**RESUMEN**

La Odontología moderna está haciendo uso de la regeneración tisular guiada y la ingeniería tisular para el tratamiento de defectos periodontales como las recesiones gingivales, usando técnicas quirúrgicas como los injertos autólogos que han demostrado excelentes resultados. El objetivo del estudio consistió en comprobar la eficiencia de análogos de tejido conectivo gingival, a partir de membranas de colágeno comercial con fibroblastos cultivados para injertos en recesiones gingivales inducidas en ratas Wistar. En la metodología se desarrolló el análogo de tejido conectivo sembrando un cultivo de fibroblastos gingivales humanos sobre una membrana de colágeno comercial Membracel®-O, paralelamente se indujo una recesión gingival de 2 mm a nivel de los incisivos centrales de 3 ratas Wistar levantando un colgajo de Newman para crear una dehiscencia en el hueso marginal, pasados 45 días, se procedió a injertar el análogo de conectivo en la rata 2, la rata 3 recibió un injerto de Membracel®-O sin células y la rata 1 no recibió injerto dejándose como control, finalmente se evaluaron clínicamente cada semana antes de la eutanasia. En los resultados la rata 1 mantuvo una recesión de 2mm, la rata 2 logró una ganancia de inserción de 2 mm presentando además un aumento del biotipo y la rata 3 presentó una recesión de 1,5 mm. Se sugiere el uso de Membracel®-O para elaborar análogos de tejido conectivo como alternativa de tratamiento a las recesiones gingivales ya que se logró ganancia de inserción sin evidenciarse signos clínicos de rechazo.

**PALABRAS CLAVE:** Ingeniería Tisular, Malla de colágeno comercial, Recesiones Gingivales inducidas.

*Recibido: 10-11-2012*

*Aprobado: 09-01-2013*



---

## ANALOG CONNECTIVE TISSUE FROM GINGIVAL FIBROBLASTS SEEDED ON COMMERCIAL COLLAGEN SCAFFOLDS

### ABSTRACT

Modern dentistry using guided tissue regeneration and tissue engineering in periodontal defects and gingival recession treatment, applying surgical techniques such autologous grafts have shown excellent results. The objective was to determine the efficiency of gingival connective tissue analogs, obtained from cultured fibroblasts seeded on a commercial collagen scaffold, for grafting in Wistar rats induced gingival recession. The methodology Connective tissue analog was developed sowing a human gingival fibroblasts culture on a collagen scaffold Membracel®-O, at the same time it was induced a 2 mm gingival recession in the central incisors of three Wistar rats, lifting a Newman flap to create a marginal bone dehiscence; 45 days after, the connective analog graft was inserted in rat 2, rat 3 received a Membracel ®-O graft without cells and rat 1 didn't received any graft leaving it as a control, finally the animals were clinically evaluated every week before euthanasia. The results: Rat 1 maintained the 2mm gingival recession, rat 2 achieved an insertion gain of 2 mm also presenting increased biotype and rat 3 presented a 1.5 mm gingival recession. It can be suggested that using Membracel ®-O to produce connective tissue analogues may be an alternative to gingival recession treatment since insertion gain was achieved with no evidence of clinical signs of rejection.

**KEY WORDS:** Tissue Engineering, commercial collagen scaffolds, induced gingival recessions

**Recibido:** 10-11-2012

**Aprobado:** 09-01-2013



## INTRODUCCIÓN

Los injertos son procedimientos que se realizan comúnmente en cirugía mucogingival para corregir defectos ocasionados por procesos infecciosos y patológicos que afectan la encía y los tejidos de soporte del diente, por factores mecánicos como el cepillado inadecuado y por alteraciones anatómicas como en casos de malposición dentaria muchas veces asociada con un periodonto delgado (1). Entre estos defectos, la primera indicación de cirugía mucogingival y uno de los motivos de consulta más frecuentes en la clínica periodontal son las recesiones gingivales, conocidas como el desplazamiento del margen gingival apical a la unión cemento-esmalte, que genera hipersensibilidad en la mayoría de los casos por la exposición de la superficie radicular al medio bucal, dificultando la higiene y aumentando la susceptibilidad a la caries (2).

Existe un aumento sustancial en la prevalencia de las recesiones gingivales a nivel mundial, ya que estas se presentan incluso en países donde se ha comprobado que sus habitantes cumplen con un buen control de placa, más frecuentemente en individuos mayores de 50 años de edad como consecuencia de los efectos acumulativos de los factores desencadenantes de recesiones sobre los tejidos periodontales (1). De allí que la cirugía mucogingival se haya dedicado a corregir morfología, posición y/o cantidad de encía en torno a los dientes, de modo preventivo, en aquellas situaciones en que por escaso grosor del tejido se pueda crear migración del margen gingival hacia apical durante el movimiento ortodóntico, de modo funcional o por razones predominantemente estéticas; buscando lograr un recubrimiento radicular completo cuando el margen gingival se sitúa a nivel del límite amelo-cementario después de la cicatrización total de la zona tratada de forma primaria inmediata

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**



o de forma secundaria en los meses posteriores a la cicatrización (3).

Entre las técnicas quirúrgicas para cubrir las recesiones gingivales, los injertos autólogos han demostrado grandes ventajas y excelentes resultados, específicamente el injerto de tejido conectivo subepitelial, técnica popularizada por Langer y Langer en 1985, ya que permiten alcanzar un recubrimiento radicular total que se evidencia inmediatamente después de la cirugía y se mantiene a largo plazo; no obstante, presenta una serie de inconvenientes que deben ser considerados antes de realizar el procedimiento quirúrgico, tales como el escaso espesor de tejido conectivo en el paladar, que generalmente se usa como mucosa donante, y la incomodidad para el paciente porque es intervenido en dos zonas de la cavidad bucal, la zona donante que generalmente es el paladar, el cual se deja cicatrizando por segunda intención con las complicaciones y

molestias que eso implica, y la zona receptora (3,4); motivo por el cual en la actualidad se ha propuesto la aplicación de los principios de la regeneración tisular guiada por sí sola o combinada con otras técnicas para el tratamiento de las recesiones gingivales, especialmente en esos pacientes con recesiones múltiples, escaso tejido donante o que no es posible la obtención de injertos de la mucosa palatina (1,3,4).

Al respecto, la regeneración tisular guiada se define como la colocación de barreras entre el tejido conectivo gingival y la superficie radicular para favorecer la proliferación de las células del ligamento periodontal y el conectivo subyacente de manera que el organismo forme nuevo tejido que cubra el defecto, impidiendo que el epitelio de unión migre hacia apical. Dichas barreras pueden ser membranas reabsorbibles por la actividad de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, como las de colágeno o no reabsorbibles como las de

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**



politetrafluoretileno que requieren de una segunda cirugía para ser retiradas, por lo que son menos aceptadas por los pacientes (5).

Entre las principales fuentes para la obtención de colágeno se encuentran las especies bovinas y porcinas, es de destacar que también ha sido extraído de modelos animales reportándose el desarrollo de membranas de colágeno a partir de tendones de la cola de ratas Wistar (6), además se ha verificado su viabilidad para desarrollar análogos de tejido conjuntivo a partir de cultivo de fibroblastos gingivales (7).

Los fibroblastos, por sus propiedades de formación de los componentes de la matriz extracelular, cuando son aislados y cultivados *in vitro* sobre membranas o andamios como el colágeno, pueden ser utilizados con éxito como análogos de tejido conectivo para la reposición de los tejidos periodontales alterados y en casos de retracción postquirúrgica de la encía,

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**

mostrando resultados prometedores en la regeneración de heridas (8,9).

Existen en el mercado membranas de colágeno reabsorbibles de uso odontológico como Membracel®-O obtenidas a partir de colágeno bovino que se ofrecen como complemento en el tratamiento de patologías periodontales y por su espesor adecuado, resistencia, semiporosidad, adherencia pudieran funcionar como soporte o matriz de crecimiento de fibroblastos para ser utilizados como injertos en casos de recesiones gingivales, es por eso que el objetivo de este trabajo es comprobar la eficiencia de análogos de tejido conectivo gingival, a partir de membranas de colágeno comercial con fibroblastos cultivados para injertos en recesiones gingivales inducidas en ratas Wistar.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **- Siembra de fibroblastos:**



En la presente investigación de tipo experimental con diseño a 2 grupos, uno con pretest postest y el segundo grupo como control, se empleó un cultivo de fibroblastos gingivales obtenidos y caracterizados fenotípicamente según protocolo previamente establecido (7). Las células cultivadas fueron sembradas e incubadas por 3 semanas en atmósfera húmeda a 35 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en un fragmento de 2 cm<sup>2</sup> de malla de colágeno comercial de uso odontológico Membracel®-O. Al cabo de este tiempo, se evaluaron nuevamente las características morfológicas de los fibroblastos adosados a la malla de colágeno mediante análisis microscópico y citometría de flujo utilizando el marcador específico de fibroblastos Anticuerpo ER-TR7 sc-73355 PE de Santa Cruz Biotechnology.

**- Inducción de recesiones gingivales en ratas Wistar:**

Se seleccionaron 03 ratas machos no consanguíneas de la cepa Wistar, de 200 gramos de peso aproximadamente que

fueron tratadas de acuerdo a las normas bioéticas establecidas internacionalmente para el manejo de animales de experimentación, bajo protocolo previamente aprobado por el comité de ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes, institución que suministró y mantuvo los animales en sus instalaciones durante el desarrollo del experimento. A cada animal se le aplicó 0,3 ml del anestésico Tiopental por vía intraperitoneal a una concentración de 5 mg/ml que permitió evaluar las características clínicas periodontales iniciales (biotipo, color, posición, textura, contorno, consistencia, sondaje y sangrado) previo a la realización de un colgajo periodontal en la encía del incisivo superior derecho quitando la papila interdental con una hoja de bisturí N° 15 para permitir la comparación con el lado izquierdo y crear una dehiscencia en el hueso marginal vestibular del incisivo superior derecho con micromotor y fresa redonda N° 5 irrigando constantemente

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**

con solución fisiológica y suturando con seda negra 4.0 que se retiró a los 8 días.

**- Injerto de análogo de tejido conectivo:**

Pasados 45 días se procedió a la evaluación clínica, para ello se anestesiaron y observaron los mismos parámetros iniciales, principalmente la posición de la encía constatando la presencia de recesiones gingivales inducidas de 2mm. La rata asignada con el número 1 no fue intervenida quedando como control, en las otras dos se levantó colgajo en la zona de recesión, colocando el análogo de tejido conectivo (Membracel®-O con fibroblastos) en la rata 2 y la malla de colágeno sin células (sólo Membracel®-O) en la rata 3, ambas fueron suturadas con seda negra 4.0.

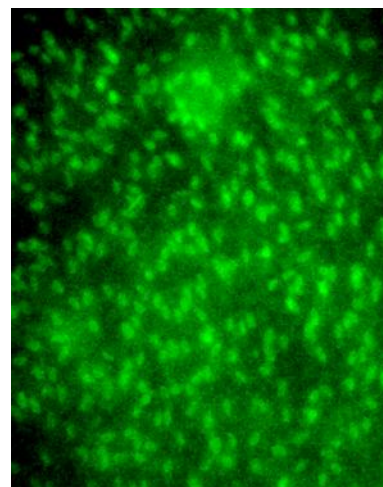
Semanalmente se realizó evaluación clínica hasta cumplirse las 10 semanas. Al culminar el experimento los animales se colocaron en una campana de eutanasia con CO<sub>2</sub> para su sacrificio.

## RESULTADOS

*Recibido: 10-11-2012*

*Aprobado: 09-01-2013*

Las microfotografías obtenidas al analizar el fragmento de malla de colágeno luego de la siembra celular y de su inmunotinción revelan la presencia de marcada fluorescencia en toda la superficie de la malla, permitiendo evaluar la morfología típica fusiforme de fibroblastos, así como el patrón de localización intracelular del antígeno ER-TR7 en la población de las células adheridas a la malla de colágeno, con lo que se demuestra que efectivamente las células sembradas mantuvieron las características fenotípicas de fibroblastos.



**Figura. 1: Observación al Microscopio de Fluorescencia de la malla de**





**colágeno comercial sembrada donde se observa la presencia de células confluentes después de 4 semanas de cultivo.**

Un evento importante de resaltar es que la tinción del fragmento de malla Membracel®-O sembrada con fibroblastos (injerto análogo de conectivo) requirió ciertos lavados con PBS, este paso podría haber comprometido la resistencia a la solubilidad de la membrana o la adhesión celular; sin embargo la figura 1 (tomada posterior a la tinción) evidencia la presencia de fibroblastos adheridos a la malla y entre si. La malla Membracel®-O se mantuvo como andamio (scaffold) durante tres (3) semanas, tiempo en el cual permaneció inmersa en el medio de cultivo, sin observarse disolución de la membrana, ni cambios en su estructura, facilitando además la proliferación celular, hecho que se puede corroborar en la figura 1 que revela la presencia de una verdadera monocapa celular con un

número importante de fibroblastos, incluso superpuestos entre sí, con lo que es posible inferir que la superficie semiporosa de la malla permite la correcta adhesión celular y la subsecuente unión intercelular. Asimismo, se evidenció que la malla Membracel®-O es resistente y además presenta cierta elasticidad, características que la hicieron de fácil manipulación a la hora del injerto propiamente dicho.

En relación a la valoración clínica periodontal (inicial) del modelo animal utilizado, fue posible establecer como características normales que la encía presentó un color rosado, la posición del margen gingival es a nivel del límite amelocementario (LAC), sondaje de 0.5 mm, biotipo delgado, textura con el puntillado de cáscara de naranja y consistencia firme. Antes del acto quirúrgico de injerto, en la zona de la recesión inducida, el margen gingival para los tres especímenes estaba 2 mm por encima del L.A.C, mientras que las

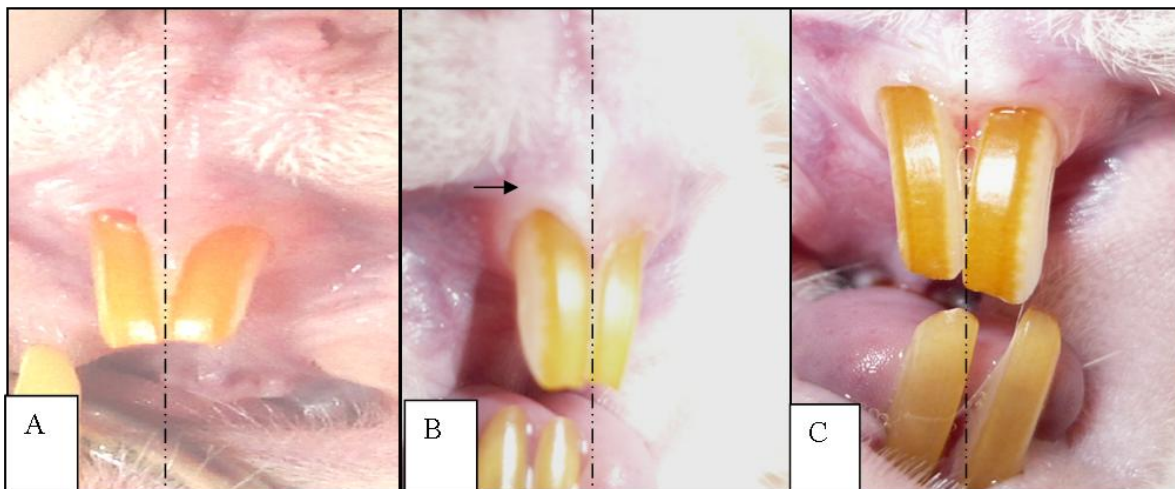
***Recibido: 10-11-2012***

***Aprobado: 09-01-2013***

demás características clínicas presentadas se describieron entre los valores normales.

Al realizar examen clínico una semana luego de la adaptación del injerto, las características periodontales observadas en la Rata 1 (control) y Rata 3 (sólo Membracel®-O) presentaron los signos característicos de inflamación, encía de color rojo, lisa, brillante y

delgada y la Rata 2 (Membracel®-O con fibroblastos) presentó las mismas características iniciales (periodonto sano), al finalizar el experimento, fue posible describir un hallazgo importante de resaltar es que en la Rata 2 se observó además un aumento del biotipo, por lo cual se describe como biotipo grueso. (Fig. 2A y 2B). Las características clínicas evaluadas se resumen en la tabla 1



**Figura. 2:** Imágenes tomadas de la encía luego de 10 semanas del Injerto

**A:** Rata 1 Sin injerto, Se observa marcada recesión gingival.

**B:** Rata 2 Injerto de Membracel®-O más fibroblastos, nótese el biotipo más grueso

que el lado opuesto. **C:** Rata 3 Injerto de Membracel®-O sin células, presenta recesión gingival.

*Recibido: 10-11-2012*

*Aprobado: 09-01-2013*

Tabla 1- Evaluación Clínica									
Sem	Rata	Color	Contorno	Consistencia	Posición	Sondaje	Hemorragia	Textura	Biotipo
1	1	Rosado	Festoneado	Firme	LAC	0,5 mm	Negativo	Puntillado	Delgado
	2	Rosado	Festoneado	Firme	LAC	0,5 mm	Negativo	Puntillado	Delgado
	3	Rosado	Festoneado	Firme	LAC	0,5 mm	Negativo	Puntillado	Delgado
6	1	Rojo	Festoneado	Blanda	Rec 2mm	1mm	Hemorragia	Liso	Delgado
	2	Rosado	Festoneado	Firme	Rec 2mm	1 mm	Negativo	Puntillado	Grueso
	3	Rojo	Festoneado	Blanda	Rec 2mm	1mm	Hemorragia	Liso	Delgado
10	1	Rosado	Festoneado	Firme	Rec 2mm	1mm	Negativo	Puntillado	Delgado
	2	Rosado	Festoneado	Firme	LAC	0,5 mm	Negativo	Puntillado	Grueso
	3	Rosado	Festoneado	Firme	Rec 1,5mm	1mm	Negativo	Puntillado	Delgado

**Tabla 1: Resumen de los hallazgos clínicos durante las semanas 1, 6 y 10.**

**- Sem: Semana - Rec: Recesión - LAC: Límite Amelocementario.**

**1: Evaluación clínica inicial.**

**6: Evaluación clínica 45 días posteriores a la inducción de recesiones.**

**10: Evaluación clínica 30 días posteriores a la colocación de los injertos.**

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La ingeniería tisular parte del principio de que la regeneración de nuevo tejido puede ser guiada a través de la combinación de células, biomateriales y moléculas bioactivas, denominado también como la tríada de la ingeniería de tejidos (10). Siguiendo esta teoría, para el desarrollo de un tejido nuevo es imprescindible

disponer de células ya caracterizadas y un andamio donde las mismas puedan crecer, en este trabajo se utilizaron fibroblastos gingivales como las células, y la membrana de colágeno Membracel®-O como el biomaterial que cumplió funciones de andamio, metodología similar a la utilizada en estudios anteriores (11) que desarrollaron la construcción y caracterización de un

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**



cultivo de queratinocitos orales caninos, para generar una mucosa oral equivalente, observándose mediante microscopía confocal laser que el tejido obtenido presentaba características análogas a la mucosa bucal de origen.

Durante el tiempo de observación clínica de éste experimento no se presentó ningún signo clínico de rechazo del injerto, haciéndose evidente que el uso combinado de membrana de colágeno más fibroblastos gingivales como injerto disminuye el tiempo de cicatrización a 1 semana en relación a los otros animales en estudio que presentaron características clínicas de cicatrización entre la tercera y cuarta semana posterior al injerto, tan fundamental para lograr el éxito en una cirugía periodontal, estos resultados coinciden con otros ensayos clínicos (12) los cuales señalan que con cultivos de tejido autólogo y la ingeniería tisular los injertos pueden ser aplicados con éxito en la reconstrucción bucal y maxilofacial sin rechazo.

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**

Otro hallazgo importante es que el modelo 2 que recibió el injerto de Membracel®-O con fibroblastos, presentó un cubrimiento total de la recesión, incluso la zona injertada presentó características de completa salud periodontal, evidenciándose un aumento del grosor de la encía marginal en contraste con sus mediciones iniciales o incluso con el lado no tratado, lo que podría ser una futura aplicación clínica para estos tejidos desarrollados *in Vitro*, empleando un cultivo de fibroblastos injertados en ratas lográndose la reparación de defectos de la mucosa bucal sin reacción alérgica (13).

Al describir los resultados obtenidos, es posible sugerir que el uso de la malla de colágeno comercial Membracel®-O como andamio para elaborar un análogo de tejido conectivo fue exitoso, dado que desde el punto de vista del cultivo la membrana permitió el crecimiento de una monocapa celular, adhesión intercelular y



una buena adhesión de las células a la malla. Asimismo, desde el punto de vista clínico, la recesión gingival inducida en ratas Wistar fue cubierta en su totalidad con este análogo de conectivo en una semana, sin evidenciarse los signos típicos de reacciones desfavorables.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes por el financiamiento otorgado bajo el código O-266-11-07-C.

#### REFERENCIAS

1. Ardila C. Recesión gingival: una revisión de su etiología, patogénesis y tratamiento. *Av Periodon Implantol* 2009;21(2):35-43.

2. The American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontal

Terms. 4a ed. Chicago: The American Academy of Periodontology, 2001.

3. Blanco J, Villaverde G, Ramos I, Bascones J, Bascones A. Tratamiento de las recesiones gingivales mediante injertos de tejido conectivo (Técnica del injerto de tejido conectivo subepitelial). Resultados tras cinco años de evolución. *Avances en Periodoncia* 200; 12(1):35-42.

4. Caballero A, Fonseca M, Arévalo L. Cobertura radicular mediante la utilización de un injerto subepitelial de tejido conectivo combinado con un colgajo pediculado avanzado coronalmente. *Salud Uninorte* 2010; 26(1):155-164;. (Citado 15 sept 2012). Disponible en: URL: <http://www.redalyc.org/redalyc/pdf/817/81715089015.pdf>.

5. Bascones A, Ibero I, Castro J, Lazaro P. Revisión de los estudios comparativos entre regeneración tisular guiada y cirugía

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**



mucogingival en el tratamiento de recesiones gingivales. Avances en Periodoncia 2000.; 12(1):9-27; (Citado 19 jul 2012). Disponible en: URL: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1699-65852000000100002&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1699-65852000000100002&script=sci_arttext)

6.González E, Padrón K, Dávila L, González A, Sosa L, Palacios M, Velazco N, Olávez D, Solórzano E. Elaboración de mallas de colágeno como alternativa de soporte para la siembra de fibroblastos. Dentum 2011;11(1):17-19;. Disponible en: URL: <http://www.nexusmedica.com/web/visor.php?id=8>

7.Padrón K, Salmen S, Berrueta L, González E, Dávila L, Rojas J, Sosa L, Olávez D, Solórzano E. Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal. Avances en Biomedicina 2012; 1(1):4-8;. Disponible en URL:

<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3988906>

8.Saito A, Saito E, Kawanami M, Shimada A. Healing in transplanted teeth with periodontal ligament cultured in vitro. Cell Transplant 2003;12(5):19-25;. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953926>

9.Stepanova I. The use of fibroblasts in Periodontology and Implantology. Bull Exp Biol Med 2007; 144:147-50;.

10. Bonassar L, Vacanti C. Tissue engineering : the first decade and beyond. J Cell Biochem Suppl 1998; 30: 297-303;.

11. Song J, Izumi K, Lanigan T, Feinberg S. Development and characterization of a canine oral mucosa equivalent in a serum-free environment. J Biomed Mater Res A 2004; .71(1):143-153; Disponible en URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?ter>

**Recibido: 10-11-2012**

**Aprobado: 09-01-2013**



m=.%20Development%20and%20charact  
erization%20of%20a%20canine%20oral  
%20mucosa%20equivalent%20in%20a%  
20serum-free%20environment

12. Sauerbier S, Gutwald R, Wiedmann-Al-Ahmad M, Lauer G, Schmelzeisen R. Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa. Clinical Oral Implants Research, 2006.; 17:625–632.

13. Lotfi G, Shokrgozar M, Mofid R, Abbas F, Ghanavati F, Bagheban A, Shariati R. Clinical and Histologic Evaluation of Gingival Fibroblasts Seeding on a Chitosan-Based Scaffold and Its Effect on the Width of Keratinized Gingiva in Dogs. Journal of periodontology 2011; 82(9):1367-1375.

**Recibido: 10-11-2012**  
**Aprobado: 09-01-2013**