

# APLICACIONES DEL CULTIVO CELULAR EN ODONTOLOGÍA

OD. MA. ALEJANDRA GILI<sup>\*</sup>, DRA. MA. VICTORIA AGUIRRE<sup>\*\*</sup>, OD. MARIANA SEGOVIA<sup>\*\*\*</sup>,  
OD. MELISA RAQUEL LEZCANO<sup>\*\*\*\*</sup> OD. MA. SILVIA ALMIRÓN<sup>\*\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Profesora Adjunta. Histología y Embriología, FOUNNE; <sup>\*\*</sup> Profesora Titular. Química Biológica II. FACENA, UNNE; <sup>\*\*\*</sup> Auxiliar de Primera Categoría. Histología y Embriología, FOUNNE; <sup>\*\*\*\*</sup> Auxiliar de Primera Categoría. Histología y Embriología, FOUNNE; <sup>\*\*\*\*\*</sup> Prof. Adjunta. Anatomía Patológica, FOUNNE.

## RESUMEN

Las ciencias básicas, la medicina oral y los nuevos avances en biotecnología y bioinformática constituyen un gran campo de investigación dentro de la odontología actual. En este sentido, dichos avances están proporcionando un nuevo conjunto de estrategias terapéuticas para el manejo clínico de los pacientes con dolencias dentales y craneofaciales.

Es importante destacar que las disciplinas relacionadas con las ciencias básicas, la medicina oral, la biotecnología y la bioinformática, han contribuido de manera trascendental al entendimiento de la fisiología y las diversas patologías que afectan las condiciones de normalidad del sistema bucal.

La ingeniería tisular se considera como un enfoque prometedor para la odontología regenerativa, con el objetivo final de reemplazar morfológica y funcionalmente los tejidos periodontales y/o los dientes perdidos a través de la síntesis *in vitro* de sustitutos análogos tisulares, considerando que el diente y las estructuras periodontales son importantes órganos del complejo craneofacial, los tratamientos utilizados para las enfermedades que los afectan no lo restauran completamente.

La odontología clínica está incursionando en una nueva era en donde el enfoque terapéutico es el uso de terapia génica, terapia celular, ingeniería tisular y la medicina regenerativa, ampliando el arsenal de posibilidades para nuestros pacientes. Una línea de investigación fundamental en ingeniería tisular y medicina regenerativa son las células madres. Como parte de los nuevos avances de la odontología a nivel mundial, científicos e investigadores del mundo aplican la bioingeniería para lograr reconstrucciones maxilofaciales, regeneraciones óseas y reconstrucciones de piezas dentales a partir de células madre como parte de tratamientos innovador.

**Palabras claves:** cultivos celulares, medios de cultivos, ingeniería tisular.

## ABSTRACT

Basic sciences, oral medicine and new advances in biotechnology and bioinformatics are a major field of research in dentistry today. In this sense, these developments are providing a new set of therapeutic for clinical management of patients with dental and craniofacial diseases strategies.

Importantly disciplines related to basic science, oral medicine, biotechnology and bioinformatics, transcendently have contributed to the understanding of the physiology and various diseases affecting the normal conditions of the oral system.

Tissue engineering is considered as a promising approach for regenerative dentistry, with the ultimate goal of replacing morphologically and functionally periodontal tissues and / or missing teeth through the *in vitro* synthesis of analogs substitutes tissue, whereas the tooth and periodontal structures are important organs of the craniofacial complex, treatments for diseases affecting quelos not restored completely.

Clinical dentistry is moving into a new era where the therapeutic approach is the use of gene therapy, cell therapy, tissue engineering and regenerative medicine expanding the arsenal of possibilities for our patients. A line of basic research in tissue engineering and regenerative medicine are stem cells. As part of the new advances in dentistry worldwide, scientists and researchers around the world applied bioengineering to achieve maxillofacial reconstructions, bone regeneration and reconstruction of teeth from stem cells as part of innovative treatments.

**Keywords:** cell cultures, culture media, tissue engineering.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de células animales empezó a ser una técnica rutinaria de laboratorio durante los años 50, la historia de los cultivos de células animales comienza en los inicios del sigloXX. (1)

Los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener, a partir de ellas, poblaciones homogéneas que luego pueden ser analizadas, e incluso multiplicarse *in vitro*. Esto ofrece ventajas en la investigación básica, ya que permite estudiar diversos procesos que ocurren en las células, y en la investigación aplicada, para la producción de moléculas de interés, ingeniería de tejidos, entre otras.

El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux (1885) en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison (1907) cultivó tejido nervioso de rana, el cual más adelante fue reemplazada por plasma de pollo (Burrows, 1910); posteriormente, se aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente (Carrel, 1912). (2)

El empleo de técnicas de fusión celular (Barski, 1960; Littlefield, 1964) estableció las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales (incluyendo al hombre); igualmente la técnica de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975) ha permitido estudios en inmunología y su aplicación a nivel terapéutico. (2)

Se ha establecido que el objetivo principal del cultivo de células animales y humanas es estandarizar e implementar procedimientos que permitan mantener y expandir una población de células de interés, aplicando una rigurosa evaluación y monitoreo de dicho cultivo de manera constante y/o rutinaria. (3)

El diente y las estructuras periodontales, son importantes órganos del complejo craneofacial, por esto las enfermedades dentales y periodontales se consideran una amenaza que contribuyen a la pérdida dental.

Hace unos años se pensaba que los tejidos humanos solo podían tratarse quirúrgicamente mediante injertos, por trasplantes procedentes de donantes, con la aplicación de biomateriales sintéticos o mediante dispositivos artificiales. Era difícil vislumbrar que se diseñarían tejidos y órganos sintetizados en el laboratorio como opción para el tratamiento para el alivio del sufrimiento causado por el daño irreparable de los tejidos. (4)

## DESARROLLO

El cultivo celular se define como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento, la supervivencia y/o multiplicación *in vitro* de células provenientes de órganos específicos o de linajes celulares tratando de conservar al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. (5)

En la práctica el término “cultivo celular” se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de eucariotas pluricelulares, especialmente células animales.

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse, e incluso presentar ciertas propiedades diferenciales, si se las cultiva en placas de plástico y con medios de cultivo adecuados. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, para estudiar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento. Además, se pueden estudiar las interacciones entre células, cultivando en la misma placa más de un tipo celular. (4) Los cultivos se establecen principalmente a partir de suspensiones celulares generadas por disgregación de tejidos.

El término “cultivo de tejidos” suele ser usado como un término genérico que incluye el de cultivo de órganos y el de cultivo de ‘*in vitro*’, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Se distinguen cuatro tipos de cultivos celulares.

**1.** Cultivo de órganos: El mismo representa una buena réplica del tejido de origen ya que se conservan las interacciones histológicas, como desventaja nos encontramos con el crecimiento del mismo es limitado y también se necesita un nuevo explante para cada experimento.

**2.** Explantes primarios: están constituidos por fragmentos pequeños de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie en la que generalmente crecen las células de la periferia del explante. Se utiliza para pequeñas cantidades de tejidos, como biopsias de piel.

**3.** Cultivo celular primario. Es aquel cultivo que se establece a partir de un tejido u órgano (5) no prolifera *in vitro*, en la cual se pueden o no separar los tipos celulares y además se puede iniciar un cultivo secundario. Su crecimiento *in vitro* es limitado y presentan inhibición por contacto generada por vías de señalización

intra e intercelulares. (4) Existen dos tipos de cultivo celular primario:

- Cultivos en monocapa: se detiene temporalmente su proliferación, como consecuencia del contacto entre las células hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco; así podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades en función de su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno.
- Cultivos en suspensión: las líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un periodo de adaptación. Estos tipos de cultivos requieren protectores de superficie. se presenta en células cuya naturaleza es de ese tipo como en el caso de células hematopoyéticas o en células que o han desarrollado el no desarrollan el proceso de quiascencia.

**4.** Cultivos secundarios se establece cuando se hace el subcultivo exitoso a partir de un cultivo primario. Se obtienen por triplicación de un cultivo primario y la solución obtenida se cultiva posteriormente. Estas células si son normales no sobreviven por mucho tiempo luego de varios subcultivos dejan de dividirse. Generalmente son cultivos que contienen un único tipo de célula y éstas suelen ser homogéneas genéticamente. Es el tipo de cultivo más utilizado en la actualidad debido a su capacidad de propagación, es decir de crecimiento mantenido.

**5.** Cultivos histotípicos y organotípicos. Los cultivos histotípicos se dan cuando las células son reagrupadas para recrear una estructura tridimensional parecida al tejido original. Se busca mantener la arquitectura in vivo del tejido de origen. Implica los mismos procedimientos anteriores pero combinando células de diferentes linajes que constituyen un órgano. En el caso del epitelio, los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación, morfología e interacciones intra e inter celulares. (6)

Las células se cultivan y mantienen a una apropiada temperatura y mezcla de gases (habitualmente, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>) en un incubador celular. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular y la variación de las condiciones para un tipo celular concreto pueden dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos.

Los medios de crecimiento pueden variar en pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos. La adición de antibióticos de doble concentración, por ejemplo, penicilina y estreptomina es opcional, pero aconsejable. Cuando un diente deciduo es exfoliado inesperadamente y no se puede mantener en solución estéril como se describió anteriormente, debe ser desechado por la alta probabilidad de contaminación. Luego debe ser almacenado a 4°C para mantener la viabilidad celular. Cuando la obtención de la muestra se efectúe en forma inmediata, el aislamiento de la población celular de células troncales mesenquimales dentales en el laboratorio será mayor.(3)

Una limitación en el cultivo de células es el gasto de esfuerzo y materiales para la producción de una pequeña cantidad de células o de tejido. Los costos de producir células en cultivo son diez veces más que el uso de tejido animal, ya que se invierte bastante en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación, volúmenes de muestra, tiempos de centrifugación, etc

Con las técnicas de cultivo de tejidos se pueden abordar distintas aproximaciones al estudio de la célula desde diferentes puntos de vista. Se destacan los estudios y procesos relacionados con: actividad intracelular, movimiento intracelular de moléculas, interacción célula-célula, genética, productos celulares y tisulares, entre otros.

Los cultivos celulares se utilizan tanto en la investigación básica como en la aplicada. En la investigación básica, permiten estudiar fenómenos complejos como, por ejemplo: la actividad intracelular, el flujo intracelular de biomoléculas, genómica y proteómica, ecología celular y las interacciones celulares.

En la investigación aplicada, las técnicas de cultivo celular se utilizan en diferentes áreas como: virología, biotecnología, inmunología, farmacología, ingeniería de tejidos y toxicología.

Se considera a la ingeniería tisular basada en las células madres de pulpa dental como un enfoque prometedor para la odontología regenerativa, cuyo objetivo es reemplazar morfológica y funcionalmente los tejidos periodontales y/o los dientes perdidos a través de la síntesis in vitro de sustitutos análogos tisulares o incluso, de un diente humano denominado biodiente.

Recientemente, los logros obtenidos a partir de múltiples investigaciones han permitido contemplar las posibles aplicaciones terapéuticas de las células madres de la pulpa dental, las cuales son capaces de producir tejidos dentales in vivo, incluyendo la dentina, la pulpa dental y las estructuras de la corona. Mientras que otras investigaciones han demostrado que estas células troncales se diferencian in vitro e in vivo, por ejemplo, en osteoblastos, neuroblastos, condrocitos, fibroblastos y endotelio.

Durante años la odontología se ha preocupado por restaurar los dientes de manera tradicional o convencional donde se restaura el diente con materiales sintéticos, también vemos como a través del tiempo se empezó a hablar de la generación de un biodiente. Es evidente que en los últimos años de estudio de las células madres dentales, estas han proporcionado una base importante sobre la cual podríamos comenzar a explorar su potencial terapéutico en el ámbito clínico. (6)

Hoy en día el conocimiento en la bioingeniería tisular para lograr regenerar un tejido después de una lesión o de un daño causado por un ataque bacteriano han llevado a la identificación y aislamiento de poblaciones de células progenitoras que bajo estímulos específicos pueden diferenciarse en una población específica. Con referencia al área dental, existen reportes incipientes donde las células madre aisladas son a partir de extractos de ligamento periodontal y de pulpas de órganos dentarios exfoliados. (7)

## **CONCLUSIÓN**

La aplicación del cultivo de células animales dentro de la biotecnología se ha incrementado en los últimos años, ya que las ventajas ofrecidas por este son permitir el plegamiento correcto, brindar una glicosilación compleja adecuada y totalmente relacionada con la actividad farmacológica y, en el caso de su producción, secretar los productos al medio de cultivo.

El cultivo celular es la técnica que ha permitido conocer el comportamiento in vitro de todo tipo de células. En la actualidad esta técnica es utilizada para la producción de biofármacos. Junto con la estandarización de algunos protocolos que facilita su manejo, ha permitido grandes avances en la búsqueda de nuevas curas ha enfermedades que antes se creían incurables.

Una de las aplicaciones más interesantes del cultivo celular ha consistido en la obtención de productos de uso terapéutico que ya han alcanzado el mercado farmacéutico. (8)

El desarrollo de la investigación básica en odontología a través de las distintas áreas de conocimiento como la medicina oral, la biotecnología y la bioinformática sobre los diversos aspectos de la fisiología y patología en la práctica odontológica, deben ser visualizados entre los diversos grupos e investigadores afines, con el propósito de crear condiciones apropiadas para el establecimiento de redes de transferencia del conocimiento y líneas de investigación que representen un avance significativo de la investigación odontológica para el responsable ejercicio profesional en bienestar de los pacientes y con miras hacia una odontología terapéutica del siglo XX.

Actualmente, la investigación en células madres se considera como una de las líneas de investigación más atractiva para modular la reparación y regeneración de tejidos u órganos como el tejido dental y periodontal.

En la actualidad, el abordaje sobre cultivos celulares aplicado a las ciencias odontológicas se puede catalogar como uno de los proyectos más innovadores, con un fuerte potencial para revolucionar el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades odontológicas; así como para la regeneración tisular, y para impulsar líneas de investigación que contribuyan a la generación de procedimientos y terapéuticas en beneficio de la sociedad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Morier Luis, Gómez Margarita, Rodríguez Juan J., Pérez Lisette. Obtención y caracterización de una línea celular diploide de riñón humano. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2004 Abr [citado 2016 Mar 28]; 56(1): 42-48. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=So375-07602004000100008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=So375-07602004000100008&lng=es).
2. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultivos.htm>.
3. Martínez Salazar Mauricio. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. colomb. biotecnol* [serial on the Internet]. 2009 June [cited 2016 Mar 29]; 11(2): 152-166. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=So123-34752009000200016&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=So123-34752009000200016&lng=en).

4. Munévar Niño Juan Carlos, Becerra Calixto Andrea del Pilar, Bermúdez Olaya Claudia. Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica. *Acta odontol. venez* [Internet]. 2008 Dic [citado 2016 Mar 18]; 46(3):361-369. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-63652008000300023&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652008000300023&lng=es).
5. CABANÉ T PATRICIO, DÍAZ J JUAN CARLOS, ROJAS C JORGE, MALUENDA G FERNANDO, RENCORET P GUILLERMO, SAUD L KATHERINE et al. Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad. *Rev Chil Cir* [Internet]. 2007 Abr [citado 2016 Mar 28]; 59(2):116-121. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-40262007000200006&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-40262007000200006&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-40262007000200006>.
6. Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología Vol. 18, Núm. 2 Abril-Junio 2014 pp 156-163 *Revista Odontológica Mexicana*
7. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental Miriam Magallanes Fabián, Bruno Carmona Rodríguez, § Marco Antonio Álvarez Pérez II Vol. 14, Núm. 1 Marzo 2010 pp 15-20 Vol. 14, Núm. 1 Marzo 2010 pp 15-20 *Revista Odontológica Mexicana*.
8. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912962006> *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* ISSN: 1870-0195 [rmcf@afmac.org.mx](mailto:rmcf@afmac.org.mx) Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México
9. Romero Stefanny, Córdoba Katherine, Martínez Valbuena Carlos A., Gutiérrez Quintero Juan G., Durán Riveros Juan Y, Munévar Niño Juan Carlos. Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología. *Rev. Odont. Mex* [revista en la Internet]. 2014 Sep [citado 2016 Feb 18]; 18(3):156-163. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-199X2014000300002&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-199X2014000300002&lng=es)
10. Brizuela C Claudia, Galleguillos G Sussy, Carrión A Flavio, Cabrera P Carolina, Luz C Patricia, Inostroza S Carolina. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *Int. J. Morphol.* [Internet]. 2013 Jun [citado 2016 Mar 18]; 31(2):739-746. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022013000200063&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022013000200063&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200063>.
11. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales) Lic. María Eugenia Segretín INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyc, FCEyN-UBA.
12. Garzón IJ, Martínez CE, Castellanos JE. Dossier temático ciencias básicas, medicina oral, biotecnología y bioinformática en odontología. *Univ Odontol.* 2014 Jul-Dic; 33(71): 17-18. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-70.dtcb>
13. Mérida I. "BIOINGENIERÍA Y SU APLICACIÓN EN LA ORTODONCIA". *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría* "Ortodoncia.ws edición electrónica Abril 2011. Obtenible en: [www.ortodoncia.ws](http://www.ortodoncia.ws).
14. González Mendez S., Junquera Gutiérrez L.M., Peña González I., García Díaz V., Gallego López L., García Pérez E. et al. Cultivo in vitro con colágeno y fibroblastos humanos de un equivalente de mucosa oral de espesor total. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* [revista en la Internet]. 2009 Abr [citado 2016 Mar 28]; 31(2):98-106. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-05582009000200002&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582009000200002&lng=es).
15. Arvelo Francisco. Ingeniería de tejidos y producción de piel humana in vitro. *Invest. clín* [Internet]. 2007 Sep [citado 2016 Mar 28]; 48(3):367-375. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332007000300011&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332007000300011&lng=es)
16. Trejo-Tapia Gabriela, Rodríguez-Monroy Mario. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *INCI* [Internet]. 2007 Oct [citado 2016 Mar 29]; 32(10):669-674. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007001000006&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007001000006&lng=es).
17. Luis Ernesto López Rojas, Felipe García Quiroz, Carolina Londoño Peláez. La Biotecnología y el desarrollo de investigación aplicada en el programa de Ingeniería Biomédica de la EIA y el CES. *Revista Ingeniería Biomédica* ISSN 1909-9762, número 1, mayo 2007, págs. 11-13
18. González Mendez S., Junquera Gutiérrez L.M., Peña González I., García Díaz V., Gallego López L., García Pérez E. et al. Cultivo in vitro con colágeno y fibroblastos humanos de un equivalente de mucosa oral de espesor total. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* [revista en la Internet]. 2009 Abr [citado 2016 Mar 29]; 31(2):98-106. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-05582009000200002&lng=e](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582009000200002&lng=e)
19. *Acta Odontológica Venezolana - VOLUMEN 46 N° 3 / 2008 ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LAS CÉLULAS MADRES INVOLUCRADOS EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS CON APLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA ODONTOLÓGICA*
20. Oláez D, Salmen S, Padrón K, Lobo C, Díaz N, Berrueta L, Solórzano E. Aislamiento y cultivo de células madre posnatales de dientes primarios. *Univ Odontol.* 2014 Ene-Jun; 33(70):187-193. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.UO33-70.accm> Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

Correo electrónico: [melisa\\_jezcano@hotmail.com](mailto:melisa_jezcano@hotmail.com)

[magili@odn.unne.edu.ar](mailto:magili@odn.unne.edu.ar)