

Revista Cubana de Obstetricia y
Ginecología, Vol. 44, No. 3 (2018)

GINECOLOGÍA Y RIESGO REPRODUCTIVO

**Presencia de *Ochrobactrum anthropi* en
muestras de semen**

**Presence of *Ochrobactrum Anthropi* in Semen
Samples**

Jenniffer Puerta Suárez, Walter Dario Cardona Maya

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y
Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia,
Medellín, Antioquia, Colombia.

RESUMEN

Introducción: El semen es una mezcla compleja de fluidos y células que posee las condiciones adecuadas para albergar microorganismos, especialmente bacterias.

Objetivo: Evaluar la presencia de bacterias en el semen de individuos normozoospermicos asintomáticos para infecciones urogenitales.

Métodos: Se realizó una secuenciación estándar posterior a la amplificación por PCR con el uso de los cebadores universales 27F y 1492R para identificación de bacterias, en 10 muestras de semen de voluntarios normozoospermicos asintomáticos para infecciones urogenitales.

Resultados: Se identificó a *Ochrobactrum anthropi* en 8 de las 10 muestras seminales evaluadas y a *Haemophilus paraurethrae* o *Escherichia coli* en los dos restantes. *O. anthropi* es una bacteria comensal, ampliamente distribuida en la naturaleza, especialmente en las fuentes de agua que, a pesar de su baja virulencia, ocasionalmente causa infecciones en individuos inmunocomprometidos.

Conclusión: La alta frecuencia de *O. anthropi* en las muestras de semen de individuos normozoospermicos asintomáticos para infecciones urogenitales puede asociarse a procesos de contaminación durante la recolección de la muestra, debido a la

amplia distribución de esta bacteria, especialmente en las fuentes de agua.

Palabras clave: secuenciación; bacterias; semen; *Ochrobactrum anthropi*; *Escherichia coli*; *Haemophilus paraurethrae*.

ABSTRACT

Introduction: Semen is a complex combination of fluids and cells that can harbor microorganisms, especially bacteria.

Objective: To assess the presence of bacteria in semen samples from asymptomatic normozoospermic individuals, for urogenital infections.

Methods: Standard sequencing after PCR amplification was performed with the use of the universal primers 27F and 1492R for bacterial identification, in 10 semen samples of asymptomatic normozoospermic volunteers for urogenital infections.

Results: This identified *Ochrobactrum anthropi* in 8 out of 10 samples assessed. In the remaining two samples, we identified *Haemophilus paraurethrae* and *Escherichia coli*. *O. anthropi* is a commensal bacterium, widely spread in nature, especially in water sources that, despite its low virulence, occasionally cause infections in immune compromised individuals.

Conclusion: The high frequency of *O. anthropi* in semen samples from asymptomatic normozoospermic individuals, for urogenital infections can be associated with contamination during the collection of the sample, due to the wide distribution of this bacterium, especially in water sources.

Keywords: sequencing, bacteria, semen, *Ochrobactrum anthropi*, *Escherichia coli*, *Haemophilus paraurethrae*.

INTRODUCCIÓN

El semen es una mezcla compleja de fluidos y células, entre las que se incluyen los espermatozoides que tienen como objetivo atravesar el tracto reproductivo femenino y fecundar al oocito.¹ Al compartir porciones anatómicas con el tracto urinario, el tracto reproductivo y el urinario comparten microbiota que puede ser detectada en el semen; además, transmite microorganismos a través de las relaciones sexuales.² Dentro de los microorganismos que se encuentran en el semen por las condiciones adecuadas para su crecimiento, se incluyen: virus, parásitos, hongos, pero principalmente bacterias. Nuestro grupo ha evaluado la presencia

de diferentes bacterias tanto de interés clínico por ser responsables de infecciones de transmisión sexual, como de microorganismos considerados microbiota genitourinaria³⁻⁸ y se trató de establecer su efecto sobre la calidad seminal.⁹

El principal obstáculo para evaluar los microorganismos presentes en el eyaculado radica en la imposibilidad de establecer el sitio de donde se originan (próstata, epidídimo, glándulas bulbouretrales o vesículas seminales).¹ Además, las técnicas microbiológicas de cultivo tradicionales entre las que se incluye el espermocultivo, sólo permiten el crecimiento de bacterias aerobias no exigentes nutricionalmente e incluso el crecimiento rápido de algunos géneros bacterianos podría limitar el crecimiento de otros.¹⁰

Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, es posible ampliar la búsqueda de microorganismos en el fluido seminal, especialmente a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas de secuenciación.^{2,5}

El objetivo del presente artículo es evaluar la presencia de bacterias en el semen de individuos normozoospermicos asintomáticos para infecciones urogenitales, mediante la técnica de secuenciación estándar posterior a la amplificación por PCR con el uso de los cebadores universales 27F y 1492R para identificación de bacterias.

MÉTODOS

Muestras de semen

Se tomaron diez muestras de semen de voluntarios aparentemente sanos, mayores de edad, sin signos ni síntomas de infección urogenital o alteraciones del tracto reproductivo fueron obtenidas mediante masturbación y colectadas en un recipiente estéril después de una abstinencia sexual de 2 a 5 días desde abril hasta mayo de 2016.

Se realizó la evaluación de los parámetros seminales convencionales de acuerdo a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹¹ y la concentración espermática se determinó empleando la cámara de *Makler*.¹² El volumen seminal se cuantificó al medir el peso del frasco colector de semen en una balanza, se restó el peso del volumen del frasco colector previamente pesado, y se asumió la densidad del semen igual a la del agua (1g = 1mL).¹¹ La movilidad espermática se determinó mediante el recuento de 10µL de semen en un microscopio de luz con objetivo de 40X. Los espermatozoides fueron clasificados en tres tipos de movilidad:

- tipo I, espermatozoides móviles que se desplazan;
- tipo II espermatozoides móviles que no se desplazan y
- tipo III, espermatozoides inmóviles.

La viabilidad se determinó mezclando 10µL de semen y 10µL de eosina-Y (*Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA*) en un portaobjetos y clasificando los espermatozoides que excluyan el colorante como vivos. Finalmente, la morfología espermática fue cuantificada en placas coloreadas con el colorante *STAT III (Origio, Dinamarca)*.

Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN de la muestra seminal usando el protocolo fenol cloroformo previamente estandarizado en nuestro grupo.¹³ De forma sintética, las muestras de semen fueron centrifugadas a 200g/10 min, se adicionaron 0,5mL de solución de lisis (Tris 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M, SDS 10 % y tritón 0,1 %) y 5µL de proteinasa K (20mg/mL, *Thermo-Scientific, MA, EE.UU.*) durante 12 h a 54°C. Se adicionó 1mL de fenol cloroformo isoamílico (*Amresco, Ohio, EE. UU.*) y se centrifugó a 5,000g/10min. Al sobrenadante recuperado se le adicionó 1mL de etanol absoluto (-20°C), 50µL de acetato de sodio 3M y se dejó a -20°C toda la noche para precipitar el ADN. Se lavó con 1mL de etanol al 70 %, se dejó secar el etanol y finalmente, el ADN fue resuspendido en agua libre de DNAsa/RNAsa (*Gibco, Life Technologies, EE. UU.*) y cuantificado mediante espectrofotometría (*Nanodrop, ND1000 Spectrophotometer, Thermo-Scientific, EE. UU.*).

Reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar una región de 1500pb que codifica para el ARNr 16S bacteriano se realizó una PCR empleando los cebadores universales 27F y 1492R. Brevemente, se empleó un volumen final de reacción de 50µL que contenía 25µL de Master Mix (*Thermo-Scientific, EE. UU.*, 0,05U/µL de Taq DNA polimerasa, 4mM de MgCl₂ y 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) diluidos en solución tampón de reacción. A cada reacción se le adicionó 2µM de cada cebador, 200ng de ADN y agua. La PCR se realizó en un termociclador (T3000, Whatman, Biometra, Goettin-gen, Alemania) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C/3min, 40 ciclos de 95°C/30s; 52°C/30s; 72°C/30s y un paso final de elongación a 72°C/1min.

Como controles positivos se empleó el ADN extraído de los aislados clínicos de *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* identificadas en el laboratorio de Microbiología de la IPS Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. El control negativo consistió en la mezcla de reacción sin ADN. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3 % con Sybr Safe (*Invitrogen Life Technologies, EE.*

UU.) en solución tampón TAE durante 23 min a 135 V. Los productos de la reacción fueron comparados con el marcador de peso molecular de 100pb (*Hyperladder II 100 lines, Biotline, Life Science Company, Londres, Reino Unido*) y visualizados en un fotodocumentador Molecular Image Gel Doc TM XR (*Bio-Rad, CA, EE. UU.*) bajo iluminación ultravioleta con el programa Image Lab 5.1 (*BioRad, CA, EE. UU.*) (**Fig. 1**).

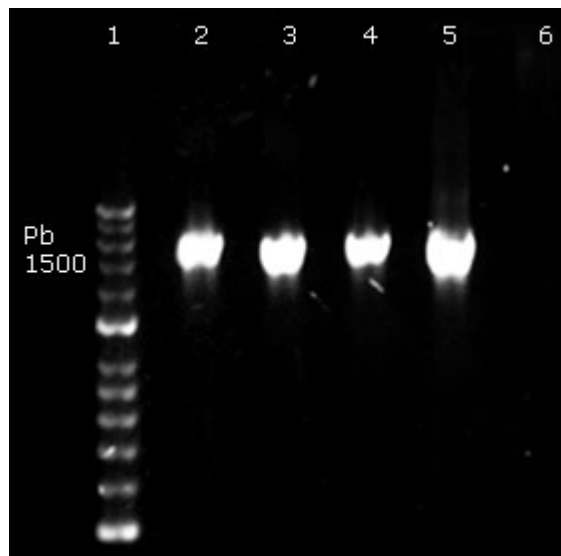


Fig. PCR representativa para la amplificación de 1500pb que codifica para el ARNr 16S bacteriano, obtenido de los cebadores 27F y 1492R.

Línea 1: Marcador de peso molecular de ADN; Línea 2 y 3: controles positivos *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*; Línea 4 y 5: muestras de voluntarios; Línea 6: control negativo.

Secuenciación

Los productos de la amplificación de la PCR tanto de las muestras como de los cuatro controles positivos fueron enviados para una secuenciación estándar a (Macrogen -dna.macrogen.com-, Corea del Sur) con los cebadores 27F,337F, 518F, 785F, 800R, 907R,1100R y 1492R. Los datos obtenidos de la secuenciación fueron analizados en el programa Seqman II versión 5.01 (DNASTAR, WI, EE. UU). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas en la página de acceso libre al programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local -BLAST- (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) para la identificación bacteriana.

RESULTADOS

Se realizó una secuenciación estándar del ADN producto de la amplificación con los cebadores universales para detección del

ARNr 16S bacteriano en 10 muestras de individuos asintomáticos para infecciones urogenitales de 19 a 38 años (media: 25,7, DS: 5,9) con parámetros espermáticos superiores al límite inferior de referencia establecido por la OMS (Tabla) y de cuatro aislados clínicos empleados como controles positivos. Los resultados de la secuenciación permitieron verificar la identificación microbiológica de los aislados clínicos, de las 10 muestras de semen de los voluntarios, la secuenciación permitió identificar a *Ochrobactrum anthropi* en 8 muestras, y *Haemophilus paraurethrae* y *Escherichia coli* en las dos muestras restantes.

DISCUSIÓN

El semen es un fluido rico en proteínas y elementos provenientes de los diferentes órganos que pertenecen al tracto reproductivo masculino, el cual comparte porciones anatómicas con el tracto urinario y permite el crecimiento, transporte y transmisión de microorganismos que pueden alterar la calidad seminal y afectar el éxito reproductivo.^{1,2,9}

La interpretación de la presencia de bacterias en el eyaculado y su efecto sobre la fertilidad es controversial pues individuos fértiles pueden presentar en el eyaculado un alto recuento bacteriano, tanto en técnicas tradicionales de cultivo bacteriano como el espermocultivo, con el uso de técnicas moleculares como la PCR, sin asociarse a signos o síntomas clínicos de infección urogenital.^{5,10}

A diferencia del espermocultivo, las técnicas moleculares permiten identificar los microorganismos que están en bajas concentraciones o que son de difícil crecimiento en los métodos de cultivo tradicionales.¹⁴ En este estudio, empleamos el uso de cebadores universales para la amplificación de una región de 1500pb del ARNr 16S bacteriano a través del uso de PCR y la secuenciación estándar del producto de amplificación. Con esta metodología, sólo podíamos identificar el microorganismo con mayor concentración, presente en las muestras de semen de los voluntarios normozoospermicos asintomáticos para infecciones urogenitales.

Para asegurar el uso adecuado de las técnicas, se incluyeron controles positivos de cepas identificadas en un Laboratorio Clínico a través de técnicas microbiológicas tradicionales y, como control negativo, se incluyó la mezcla de reacción de la PCR sin ADN, para asegurar que ningún reactivo estuviera contaminado con ADN bacteriano.

El presente estudio permitió en 8 de las 10 muestras seminales evaluadas la secuenciación de *O. anthropi*, un bacilo Gram-

negativo, móvil, no fermentador de lactosa, positivos para oxidasa y ureasa; perteneciente a la familia *Achromobacter* y está estrechamente relacionado con el género *Brucella* spp.^{15,16}

El género *Ochrobactrum* fue descrito por primera vez por Holmes y otros en 1988. Actualmente comprende cinco especies descritas, *O. anthropi*, *O. intermedium*, *O. tritici*, *O. grignonense* y *O. gallinifacis*.¹⁷ Las especies de *Ochrobactrum* son raras y usualmente son microorganismos oportunistas en hospederos inmunocomprometidos.¹⁸ Esta bacteria crece rápidamente en agar nutritivo, las colonias tienen un diámetro de 1,2µm son circulares, lisas, poco convexas y no pigmentadas.^{19,20}

O. anthropi es capaz de colonizar una variedad de ambientes (la microbiota del intestino grueso) y está reportado como un patógeno oportunista humano emergente en infecciones intrahospitalarias a pesar de su baja virulencia, aunque presenta notable resistencia antimicrobiana. Su hábitat natural es el suelo y las fuentes de agua incluida la solución salina, soluciones antisépticas, líquidos de diálisis y piscinas.^{15,21}

El primer caso de infección humana por *O. anthropi*, fue un absceso pancreático informado en 1980.²¹ En la literatura, se han reportado casos clínicos en los cuales se determina esta bacteria como responsable de endocarditis, meningitis, infecciones del tracto urinario, osteomielitis, bacteriemia o septicemia,^{16,22} abscesos hepáticos, pélvicos y pancreáticos.²³ Sin embargo, la infección relacionada con más frecuencia con este microorganismo es la bacteriemia asociada a catéter intravascular, debido a la fácil adherencia de esta bacteria a materiales sintéticos de uso hospitalario.¹⁵

O. anthropi causa pseudobacteriemia, definida como la presencia de bacterias en hemocultivos en ausencia de evidencia clínica de infección y puede ser responsable de hasta 50 % de todos los hemocultivos positivos, ocasionados por contaminaciones o fallas en el protocolo de cultivo.²⁰

Las cepas de *O. anthropi* son resistente a los β-lactámicos y antibióticos de amplio espectro como penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. La resistencia es mediada en parte por la presencia de β-lactamasas de tipo AmpC inducibles. Son sensibles a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, carbapenems, tetraciclinas y trimetoprim/ sulfametoxazol y se han reportado fallas terapéuticas con imipenem.^{15,20-24}

Al ser una bacteria estrechamente relacionada con las especies de *Brucella*, se han realizado ensayos para emplear esta bacteria como vector de vacuna para el suministro de antígenos de

Brucella. Esto se debe a que en la actualidad no hay una vacuna útil en humanos contra esta enfermedad, una zoonosis que se adquiere a través del consumo de productos lácteos contaminados o al entrar en contacto con secreciones de animales infectadas.²⁵

*Bielanski y otros*²⁶ reportaron contaminación de embriones bovinos y muestras de semen criopreservadas en tanques de nitrógeno por 6 a 36 años en los cuales fueron identificadas 32 especies bacterianas y una especie micótica. Entre ellas se incluyen especies comensales, principalmente *Stenotrophomonas maltophilia* y *Escherichia coli*. Estos investigadores también reportaron la presencia de ADN de *O. anthropi*.²⁶

En cuanto a las dos muestras adicionales de los voluntarios normozoospermicos asintomáticos para infecciones urogenitales, los resultados de la secuenciación identificaron a *Escherichia coli* y a *Haemophilus paraurethrae*, ambos microorganismos son reportados en múltiples estudios por ser colonizadores frecuentes del tracto genitourinario.^{6,8,10,27-29}

La presencia de bacterias en el semen cobra vital importancia en las técnicas de reproducción asistida, por lo que monitorear su inocuidad debe ser fundamental para evitar la transmisión de microorganismos que alteren el éxito de estas técnicas.²⁶

CONCLUSIÓN

La presencia de bacterias en las muestras de semen es común. La interpretación de la bacteriospermia es un asunto que aún presenta dificultad debido a la necesidad de realizarse relacionando los síntomas clínicos. La alta frecuencia de *O. anthropi* en las muestras de semen de individuos normozoospermicos asintomáticos para infecciones urogenitales puede asociarse a procesos de contaminación durante la recolección de la muestra, debido a la amplia distribución de esta bacteria, especialmente en las fuentes de agua.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol*. 2016;13(7):379-86.
2. Aragon IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuno MI, Castillo E, Del Moral JS, Gomez-Millan J, et al. The Urinary Tract Microbiome

in Health and Disease. Eur Urol Focus. 2016.

3. Galarzo Pardo S, Cano Chaves M, Puerta Suarez J, Giraldo M, Mayorga Torres B, Cadavid AP, et al. Efecto de los factores solubles de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus epidermidis* sobre la funcionalidad espermática. Revista chilena de obstetricia y ginecología. 2015;80(4):316-23.

4. Puerta Suarez J, Sanchez LR, Salazar FC, Saka HA, Molina R, Tissera A, et al. *Chlamydia trachomatis* neither exerts deleterious effects on spermatozoa nor impairs male fertility. Sci Rep. 2017;7(1):1126.

5. Puerta Suárez J, Cardona Maya WD. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma urealyticum* en muestras de semen: efectos sobre la calidad espermática. Revista Urología Colombiana. 2016;25(3):219-24.

6. Cano-Chaves A, Galarzo-Pardo S, Puerta-Suarez J, Giraldo M, Cadavid AP, Cardona-Maya WD. Efecto de las bacterias uropatógenas y de los factores solubles de su metabolismo sobre la calidad espermática: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia. 2017;44(3):106-12.

7. Puerta Suárez J, Maya C, Walter D. Evaluación in vitro del efecto de *Neisseria gonorrhoeae* y los factores solubles producto de su metabolismo sobre la calidad espermática. Revista chilena de obstetricia y ginecología. 2016;81(3):211-7.

8. Guerrero-Hurtado LS, Puerta-Suárez J, Cardona-Maya WD. Papel de los espermatozoides en la transmisión de bacterias uropatógenas: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia. 2016.

9. Puerta-Suárez J, Giraldo M, Cadavid AP, Cardona-Maya W. Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. Revista chilena de obstetricia y ginecología. 2014;79(3):209-17.

10. Puerta Suárez J, Villegas Castaño A, Serna Quintana GJ, Martínez A, Romero Palacio J, Giraldo M, et al. Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales. Revista chilena de obstetricia y ginecología. 2015;80(1):33-40.

11. World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization: Ginebra, Suiza. 2010.

12. Cardona-Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparacion de la concentracion espermatica usando la camara de Makler y la camara de Neubauer. Actas Urol Esp. 2008;32(4):443-5.

13. Puerta Suárez J, Cardona Maya WD. Prevalencia de Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y Ureaplasma urealyticum en muestras de semen: efectos sobre la calidad espermática. *Revista Urología Colombiana*. 2016;25(3).
14. Manterola L, Tejero-Garces A, Ficapal A, Shopayeva G, Blasco JM, Marin CM, et al. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of Brucella ovis infection in semen samples from rams. *Veterinary microbiology*. 2003;92(1-2):65-72.
15. Ospina S, Muñoz SA, Zapata J. Bacteraemia by Ochrobactrum anthropi in patient with biliary obstruction. *Infectio*. 2009;13(4):293-5.
16. Varano M, Gaspari M, Quirino A, Cuda G, Liberto MC, Foca A. Temperature-dependent regulation of the Ochrobactrum anthropi proteome. *Proteomics*. 2016;16(23):3019-24.
17. Meng X, Yan D, Long X, Wang C, Liu Z, Rengel Z. Colonization by endophytic Ochrobactrum anthropi Mn1 promotes growth of Jerusalem artichoke. *Microb Biotechnol*. 2014;7(6):601-10.
18. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*. 2002;90(1-4):435-46.
19. Wang GH, Cheng CY, Liu MH, Chen TY, Hsieh MC, Chung YC. Utility of Ochrobactrum anthropi YC152 in a Microbial Fuel Cell as an Early Warning Device for Hexavalent Chromium Determination. *Sensors (Basel)*. 2016;16(8).
20. El-Zimaity D, Harrison GA, Keen AP, Price S, Evans SE, Lewis AM, et al. Ochrobactrum anthropi Pseudobacteraemia. *J Infect*. 2001;43(3):217-8.
21. Wi YM, Sohn KM, Rhee JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY, et al. Spontaneous bacterial peritonitis due to Ochrobactrum anthropi: a case report. *J Korean Med Sci*. 2007;22(2):377-9.
22. Gill MV, Ly H, Mueenuddin M, Schoch PE, Cunha BA. Intravenous line infection due to Ochrobactrum anthropi (CDC Group Vd) in a normal host. *Heart Lung*. 1997;26(4):335-6.
23. Quirino A, Pulcrano G, Rametti L, Puccio R, Marascio N, Catania MR, et al. Typing of Ochrobactrum anthropi clinical isolates using automated repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction DNA fingerprinting and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2014;14:74.
24. Al-Naami AQ, Ali Khan L, Ali Athlawy Y, Sun Z. Ochrobactrum anthropi induced retropharyngeal abscess with mediastinal extension complicating airway obstruction: a case report. *J Med Radiat Sci*. 2014;61(2):126-9.

25. He Y, Vemulapalli R, Schurig GG. Recombinant *Ochrobactrum anthropi* expressing *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase protects mice against *B. abortus* infection only after switching of immune responses to Th1 type. *Infect Immun*. 2002;70(5):2535-43.
26. Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2003;46(2):146-52.
27. Khan FU, Ihsan AU, Khan HU, Jana R, Wazir J, Khongorzul P, et al. Comprehensive overview of prostatitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:1064-76.
28. Mändar R. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacological research*. 2013;69(1):32-41.
29. Virecoulon F, Wallet F, Fruchart-Flamenbaum A, Rigot JM, Peers MC, Mitchell V, et al. Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility. *Andrologia*. 2005;37(5):160-5.

Recibido: 24 febrero de 2018.

Aprobado: 26 marzo 2018.

Walter Dario Cardona Maya. Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia.

Correo electrónico: wdario.cardona@udea.edu.co