

# Susceptibilidad Antimicrobiana de Microorganismos Anaerobios Aislados de Infecciones Endodónticas Primarias a Amoxicilina y Metronidazol y su Asociación con los Parámetros Clínicos: Serie de Casos

Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Microorganisms Isolated from Primary Endodontic Infections to Amoxicillin and Metronidazole and its Association with Clinical Parameters: Case series

Luis Felipe Upegui Jiménez\* & Diana Yuledi Molina Colorado\*\*

---

UPEGUI, J. L. F. & MOLINA, C. D. Y. Susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos anaerobios aislados de infecciones endodónticas primarias a amoxicilina y metronidazol y su asociación con los parámetros clínicos: Serie de casos. *Int. J. Odontostomat.*, 10(1):149-159, 2016.

**RESUMEN:** El objetivo de este estudio es describir la composición de la microbiota anaerobia estricta/aerotolerante en infecciones endodónticas primarias, su susceptibilidad antimicrobiana, y la asociación con los parámetros clínicos. Se tomaron muestras de siete pacientes con necrosis pulpar sintomática o asintomática. Se utilizaron técnicas para la conservación, cultivo, incubación e identificación de anaerobios estrictos/aerotolerantes. Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana a amoxicilina y metronidazol, se utilizó el método de dilución en agar. Se aislaron un total de 32 cepas, 20 (62,5 %) fueron anaerobios estrictos/aerotolerantes, y 8 (25 %) anaerobios facultativos. El microorganismo anaerobio estricto/aerotolerante más frecuente fue *Fusobacterium nucleatum*, se aisló en tres casos, todos relacionados con algún tipo de dolor, y en dos casos estuvo relacionado con *Prevotella* spp. Se encontró una colonia de *F. nucleatum* resistente a amoxicilina y con producción de  $\beta$ -lactamasa, y otra de *F. nucleatum* resistente a metronidazol. Una colonia de *P. propionicum/avidus* presentó resistencia intermedia a amoxicilina y con producción de  $\beta$ -lactamasa. Se encontró la presencia de bacterias anaerobias estrictas/aerotolerantes en los pacientes con infecciones endodónticas primarias. Existen algunos microorganismos relacionados con algún tipo de dolor, como *F. nucleatum* y *P. micra*. Los hallazgos muestran presencia de *F. nucleatum* resistentes a los antimicrobianos evaluados.

**PALABRAS CLAVE:** periodontitis periapical, necrosis pulpar, resistencia bacteriana a antibióticos.

---

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones endodónticas son infecciones del sistema de canales radiculares, que se desarrollan cuando este carece del tejido pulpar y de su sistema de defensas, como consecuencia de una necrosis pulpar o remoción de la pulpa para el tratamiento. El hábitat endodóntico provee un ambiente adecuado para el establecimiento de una microbiota mixta, predominantemente anaerobia, donde las bacterias son los principales microorganismos implicados. Las bacterias y sus productos con sus pro-

iedades patogénicas, pueden llegar al tejido periradicular a través del foramen apical y canales laterales, creándose una serie de reacciones inmunológicas, e inflamatorias entre las bacterias y el sistema de defensa del hospedero, cuyo resultado es la destrucción del tejido periapical y la formación de la periodontitis periapical, que dependiendo de varios factores relacionados con el hospedero y con las bacterias puede ser sintomática o asintomática (Nair, 2004; Siqueira, 2011).

\* Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

\*\* Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.  
Subvención: este proyecto fue financiado por la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Las infecciones endodónticas se pueden clasificar de acuerdo a la localización anatómica, en intraradiculares o extraradiculares. Las infecciones intraradiculares son aquellas en las que los microorganismos colonizan el sistema de canales radiculares. Se dividen en i) Infección primaria, causada por microorganismos que inicialmente invaden y colonizan el tejido pulpar necrótico; ii) Infección secundaria, causada por microorganismos que no estuvieron presentes durante la infección primaria pero invadieron el canal radicular después de la intervención del profesional y iii) Infección persistente, cuando los microorganismos comprometidos en la infección primaria o secundaria de alguna manera resisten los procesos antimicrobianos en el canal radicular y perduran por tiempo en los canales tratados. Las infecciones secundarias y persistentes la mayoría de las veces no se pueden diferenciar clínicamente. La infección extraradicular ocurre cuando hay invasión de los microorganismos hacia el tejido periradicular como consecuencia de la infección intraradicular (Siqueira).

Todas las bacterias de la cavidad oral tienen las mismas posibilidades de llegar al canal radicular, pero solo lo consigue un grupo restringido de especies, ya que es un ambiente único, donde la falta de oxígeno, la interacción entre los factores microbianos y la disponibilidad de nutrientes son los factores que definen la composición microbiana (Sundqvist & Figdor, 2003). Las diferencias que se pueden encontrar entre los diferentes estudios sobre cuáles son las especies más prevalentes, se deben a varios factores como: sensibilidad y especificidad en el método de identificación, técnica para obtener la muestra, el lugar geográfico, el régimen de prescripción, y divergencias en el diagnóstico clínico (Siqueira). No se puede considerar a una especie como el principal patógeno endodóntico, múltiples combinaciones de bacterias son las que actúan como las causantes de la periodontitis periapical. Las infecciones endodónticas se componen por una microbiota mixta, con diferencias en las bacterias más prevalentes de acuerdo al tipo de infección; en las infecciones primarias los hallazgos han mostrado un predominio de bacterias anaerobias estrictas/aerotolerantes, mientras que en las secundarias/persistentes hay mayor prevalencia de anaerobios facultativos, especialmente *Enterococcus faecalis*. También se han encontrado diferencias en la composición de la microbiota endodóntica entre los pacientes sintomáticos y los asintomáticos. En los pacientes con infecciones endodónticas sintomáticas se ha encontrado una mayor diversidad bacteriana, que las asintomáticas, con un predominio de bacterias

anaerobias estrictas/aerotolerantes gramnegativas (Tennert *et al.*, 2014).

El tratamiento de las infecciones endodónticas consiste en eliminar la infección del sistema de canales radiculares y prevenir su reinfección proporcionando un sello del espacio del canal radicular, el cual se logra con la endodoncia (Nair). La mayoría de las infecciones endodónticas se curan con el tratamiento endodóntico, sin embargo hay casos en los que las bacterias y sus productos salen al tejido periapical, y otros órganos del cuerpo, produciendo abscesos, celulitis, infecciones en los espacios profundos del cuello, endocarditis bacteriana en pacientes de riesgo, incluso se han reportado casos de abscesos cerebrales originados en infecciones odontológicas, hasta amenazar la vida del paciente; en estos casos es necesaria la ayuda de agentes antimicrobianos, además de la endodoncia y el drenaje del tejido periapical para el tratamiento (Caplan *et al.*, 2006; Corson *et al.*, 2001).

La escogencia del antimicrobiano apropiado, debe ser lo más racional posible, basándose en el conocimiento de los microorganismos causantes y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos, para que el tratamiento sea exitoso (Poeschl *et al.*, 2011). Los agentes antimicrobianos de primera elección recomendados para el tratamiento de infecciones endodónticas son la penicilina y amoxicilina. Se prefiere la amoxicilina por su rápida absorción, vida media prolongada, lo que permite intervalos de dosis más largos, y buena tolerancia (Jacinto *et al.*, 2008). El metronidazol es un agente que se ha encontrado efectivo solamente contra microorganismos anaerobios, como las infecciones endodónticas primarias están constituidas principalmente por este tipo de microorganismos, es que se recomienda para su tratamiento (Khemaleelakul *et al.*, 2002).

Desde que Fleming (1945) descubrió la penicilina, advirtió sobre el desarrollo de resistencia antimicrobiana. Cuando un microorganismo está expuesto a presiones químicas o de otro tipo que amenazan su vida, desarrolla diferentes tipos de mecanismos, como lo es la resistencia antimicrobiana para poder sobrevivir, esta evolución es ayudada por las pobres prácticas terapéuticas (Goodman *et al.*, 2011). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Dental Americana (ADA) han advertido sobre la presencia cada vez mayor de resistencia antimicrobiana, llegando a considerarla como un problema de salud pública. La selección de cepas resis-

tentes esta facilitada por factores como, el uso inapropiado de los antimicrobianos, la terapia empírica con antibióticos de amplio espectro y sin pruebas de susceptibilidad, el régimen de prescripción utilizado, la venta de antimicrobianos sin fórmula, y pacientes que no terminan la dosis. Además el no conocer los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, lleva al uso de terapias inadecuadas y falla del tratamiento con consecuencias no solo para la salud del paciente, sino también económicas para el sistema de salud como son: el aumento en los costos de la terapia, mayor tiempo de hospitalización y pérdida de productividad por incapacidad (ADA Council on Scientific Affairs, 1997; WHO, 2014).

Los estudios han demostrado que la resistencia antimicrobiana en las especies anaerobias estrictas/aerotolerantes presentes en infecciones endodónticas primarias ha aumentado con el paso del tiempo (Gomes *et al.*, 2011; Khemleelakul *et al.*; Skucaite *et al.*, 2010) una de las causas es que los odontólogos prescriben grandes cantidades de antimicrobianos cada año, muchas veces innecesariamente (Sweeney *et al.* 2004).

Se ha reportado que la microbiota es diferente en cada región, aunque esas diferencias se pueden atribuir a variaciones en la técnica de identificación, los hallazgos indican que la prevalencia de algunas especies en las infecciones endodónticas pueden ser significativamente diferentes de un lugar geográfico a otro (Baumgartner *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2005). Estudios demuestran que en nuestro medio es común la automedicación y la falta de control a la venta de antibióticos, por lo que se podría pensar en la presencia de algunas cepas resistentes (Martínez-Domínguez *et al.*, 2013; Vacca *et al.*, 2011). El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) recomienda monitoreos periódicos de los cambios en la resistencia antimicrobiana, en Colombia, en odontología no se hacen estudios de vigilancia epidemiológica sobre la evolución de la resistencia antimicrobiana. Por todo lo anterior es prudente estudiar la composición de la microbiota endodóntica y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en nuestro medio para conocer sus niveles de resistencia, y así utilizar la terapia apropiada cuando sea necesario.

Los objetivos son describir la composición de la microbiota anaerobia estricta/aerotolerante en infecciones endodónticas primarias, su susceptibilidad antimicrobiana a dos antibióticos, y su asociación con los parámetros clínicos.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se atendieron un total de siete (7) pacientes, que asistieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia, con necesidad de tratamiento endodóntico. Los pacientes firmaron consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología antes de su atención. A cada paciente se le realizó una historia dental detallada.

Los pacientes para ser incluidos en el estudio debían estar en buenas condiciones de salud, no haber recibido terapia antibiótica en los últimos 3 meses, mayores de 18 años, con diagnóstico de necrosis pulpar sintomática o asintomática y la cámara pulpar intacta. Se excluyeron pacientes con enfermedad sistémica, sondaje mayor a 3 mm, dientes con ápice inmaduro, mujeres en embarazo y dientes que no se pudieran aislar con el dique de goma.

Se registraron las siguientes características clínicas para correlacionar con los hallazgos microbiológicos: edad, sexo, diente, diagnóstico pulpar, tipo y características del dolor, presencia de dolor previo, percusión, palpación, tracto sinuoso, edema, movilidad, sondaje, tamaño de la imagen radiolúcida periapical, estado del canal (húmedo o seco), tipo de exudado, y fiebre.

Las muestras se tomaron bajo estrictas condiciones de asepsia (Fig. 1). Se limpió el diente con piedra pómez para proceder hacer el aislamiento con el dique de goma. El diente y el campo se limpiaron con peróxido de hidrógeno al 30 %, y se descontaminó con hipoclorito de sodio al 5 %, por 30 s cada uno. La solución se inactivó con tiosulfato de sodio al 5 %. La apertura se realizó con fresa estéril, usando irrigación manual con solución salina estéril. Se tomó muestra del campo operatorio para verificar su esterilidad. Se utilizó una técnica aséptica para la instrumentación, remoción del contenido de la cámara pulpar y la toma de la muestra. Con una lima de acuerdo al diámetro del canal se realizó instrumentación mínima para desorganizar el contenido del canal y romper la biopelícula, sin el uso de irrigante químico. Se introdujo una punta de papel estéril, por 60 s, hasta el tercio apical del canal, previa determinación de la longitud por medio de la radiografía, si el canal estaba seco se humedeció la punta con solución salina. La lima se cortó y junto con la punta de papel se introdujeron inmediatamente al medio de transporte Viability Medium Goteborg Agar III (VMGA III), y fueron llevadas al

laboratorio en menos de 1 h para la siembra en la cámara de anaerobiosis (Jungermann *et al.*, 2011).

Dentro de la cámara de anaerobiosis, el medio de transporte fue homogenizado en vórtex por 60 s. Se hicieron diluciones seriadas de la muestra así:  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-5}$  en tubos con caldo tioglicolato, se sembraron con asa Digrafsky 50  $\mu\text{L}$  de cada dilución en agar brucella (BD, USA) suplementado con sangre desfibrinada de cordero al 5 %, hemina (Alfa Aesar, United States) y vitamina K, asegurando homogeneidad, este medio es empleado para cultivar anaerobios facultativos, y anaerobios estrictos/aerotolerantes. Se incubaron a 37 °C en atmosfera de 90 % de  $\text{N}_2$ , 5 % de  $\text{H}_2$ , y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se realizaron lecturas diarias por 14 d para evaluar crecimiento bacteriano. La dilución de  $1 \times 10^{-2}$  se incubó en aerobiosis, para la prueba de aerotolerancia.

Por estereomicroscopio se hizo caracterización preliminar y recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC), basada en características como: tamaño, color, forma, altura, consistencia, superficie, brillo, y hemolisis. Las colonias de interés fueron aisladas puras en subcultivos, se les realizó tinción de Gram, y prueba de aerotolerancia. Basados en esta información se procedió a la identificación de anaerobios estrictos/aerotolerantes con el sistema Vitek 2 (BioMérieux SA) y API 20 A (BioMérieux SA, Marcy.l'Étoile, France). Las cepas control fueron *Bacteroides ovatus* American Type Culture Collection (ATCC) BAA-1296 y *Clostridium septicum* ATCC 12464.

Se utilizó el método de dilución en agar, prueba de referencia recomendada por Clinical & Laboratory Standards Institute para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaerobias. Se evaluaron con los antibióticos amoxicilina (MP Biomedicals, LLC) y metronidazol (MP Biomedicals, LLC), teniendo en cuenta los puntos de corte de CLSI y European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Se sembraron en agar brucella suplementado con hemina y vitamina k, durante 48 horas a 37 °C bajo condiciones de anaerobiosis. Utilizando 2  $\mu\text{L}$  de inóculo al 0,5 McFarland. Se realizó control de viabilidad de las bacterias, las soluciones stock de antibiótico se prepararon a concentraciones de al menos 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o diez veces la concentración más alta a ser evaluada. Se prepararon diluciones seriadas dobles desde 0,016  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con sus respectivos controles, bajo estrictas condiciones de asepsia. Se mezclaron 6 mL de agar con 700  $\mu\text{L}$  de antibiótico y 300  $\mu\text{L}$  de sangre para servir en las cajas de Petri, se dejaron

secar por 2 h. Las lecturas se hicieron a las 24 y 48 h. Se consideró la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) aquella concentración en la cual ocurría una marcada reducción en el crecimiento de los microorganismos de las placas evaluadas (Fig.2). Las cepas ATCC control utilizadas fueron *Clostridium difficile* ATCC 700057 y *Bacteroides fragilis* ATCC 25285. Para la prueba de  $\beta$ -lactamasa se utilizaron discos de nitrocefina, los cuales se evaluaron a los 30 min para ver si presentaban cambio de color, si cambiaba a rosado se consideraba positivo para  $\beta$ -lactamasa. Como control positivo se utilizó *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (Clinical & Laboratory Standards Institute).

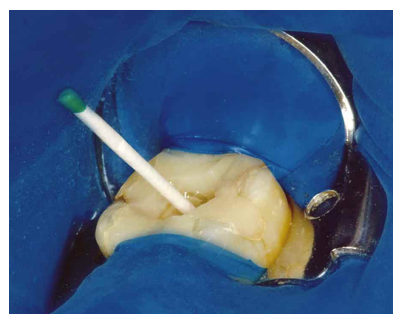


Fig. 1. Toma de muestra microbiológica con punta de papel.



Fig. 2. Método de dilución en agar, disminución del halo de crecimiento.

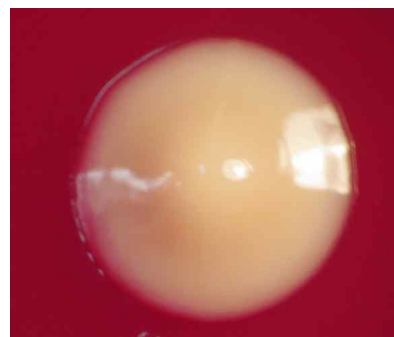


Fig. 3. Colonia de *Propionibacterium acnes*. Foto cortesía de Microbióloga Diana Molina.



## RESULTADOS

Los resultados de los controles negativos no presentaron ningún crecimiento bacteriano. De siete pacientes con infecciones endodónticas primarias, 4 fueron mujeres y 3 hombres, con edades entre 18 y 47 años. Cuatro estaban sin dolor y tres con algún tipo de dolor, uno tenía dolor espontáneo, los otros dos dolor provocado. Tres casos tenían historia de dolor previo. Tres pacientes presentaban tracto sinuoso en el momento de la toma de la muestra, ninguno presentó edema. Se diagnosticaron tres casos con absceso apical crónico, dos con necrosis pulpar con periodontitis apical sintomática y dos con necrosis pulpar con periodontitis apical asintomática. Los dientes estudiados fueron: tres molares, dos incisivos maxilares, un canino mandibular y un premolar maxilar. Se encontró percusión positiva grado tres en dos casos y en otros dos grado uno, en el resto la percusión fue negativa. Un caso presentaba movilidad grado dos, los otros seis casos movilidad grado uno. Los siete casos presentaron imagen radiolúcida periapical en la radiografía. El estado del canal fue: seco en cinco casos, húmedo en uno y purulento en otro (Tabla I). Se aislaron un total de 32 cepas (4 no se pudieron recuperar), 20 (62,5 %) fueron microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes, y 8 (25 %) anaerobios facultativos, pertenecientes a 10 géneros y 13 especies bacterianas. Siete especies anaerobias estrictas/aerotolerantes diferentes estuvieron presentes en los pacientes que presentaron dolor y nueve en los que no presentaron dolor. De las bacterias aisladas, 68,75

% eran grampositivas y 31,25 % gramnegativas. Los anaerobios estrictos/aerotolerantes más comunes fueron: *Fusobacterium nucleatum* tres (15 %), seguido por *Parvimonas micra* dos (10 %), *Propionibacterium acnes* dos (10 %) (Fig. 3), *Anaerococcus prevotii* dos (10 %), *Prevotella oralis* dos (10 %), y *Propionibacterium propionicum/avidus* dos (10 %). El máximo de especies aislada por diente fue 7 y el mínimo 2, con un máximo de  $1.2 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y un mínimo de  $1 \times 10^4$  UFC por especie. (Tabla II).

De las tres cepas de *F. nucleatum* aisladas dos estuvieron en pacientes con algún tipo de dolor, y también había presencia de *Prevotella spp.* Las dos cepas de *P. micra* se aislaron en pacientes sin dolor. Las dos cepas de *P. propionicum/avidus* y de *P. acnes*, se encontraron en pacientes sin dolor y en las dos cepas de *P. acnes* había presencia de tracto sinuoso. En el único paciente con dolor severo, se encontraron *P. intermedia/nigrescens* y *F. nucleatum*. Hubo tres pacientes con tracto sinuoso en el momento de la toma de la muestra, en los tres se identificaron *Prevotella spp.* de los cuales dos presentaron exudado por el canal (Tablas I y II).

En el método de dilución por agar, los resultados de los controles con *B. fragilis* (ATCC 25285) y *C. difficile* (ATCC 700057) dieron dentro de los niveles de las cepas referencia conforme al valor establecido

Tabla I. Características clínicas de los pacientes.

Caso	1	2	3	4	5	6	7
Edad (años)	47	41	46	27	44	46	18
Sexo	M	M	F	M	F	F	F
Diente	46	21	14	16	26	11	43
Presencia de dolor	Leve	No	Mod	Sev	No	No	No
Tipo dolor	Esp	x	Pro	Pro	X	X	X
Dolor previo	Si	No	Si	No	No	Si	No
Percusión	1	No	3	3	No	No	1
Dolor palpación	No	Leve	Mod	Sev	No	No	No
Tracto sinuoso	Si	Si	No	No	No	Si	No
Edema	No	No	No	No	No	No	No
Movilidad	2	1	1	1	1	1	1
Imagen radiolúcida	Si	Si	Si	1	Si	Si	Si
Estado del canal	Pur	Hum	Seco	Seco	Seco	Seco	Seco
Diagnóstico	3	3	2	2	1	3	1

M= Masculino, F= Femenino, Mod= Moderado, Sev= Severo, Esp= Espontáneo; Pro= Provocado, Pur= Purulento, Hum= Húmedo; 1= Necrosis pulpar con periodontitis apical asintomática, 2= Necrosis pulpar con periodontitis apical sintomática, 3= Absceso apical crónico. Terminología Diagnóstica Recomendada por la Asociación Americana de Endodoncistas (AAE)

Tabla II. Bacterias aisladas.

Caso	1	2	3	4	5	6	7	Total
Total aislados	6	6	2	2	5	4	7	32 (100 %)
Anaerobios estrictos/aerotolerantes	6	3	1	2	2	2	4	20 (62,5 %)
Anaerobios Facultativos	---	---	1	---	3	1	3	8 (25 %)
Grampositivas	4	4	2	0	4	2	6	22 (68,75 %)
Gramnegativas	2	2	0	2	1	2	1	10 (31,25 %)
<i>F. nucleatum</i>	X	---	---	X	X	---	---	3 (15 %)
<i>P. micra</i>	X	---	X	---	---	---	---	2 (10 %)
<i>P. acnes</i>	---	X	---	---	---	X	---	2 (10 %)
<i>P. oralis</i>	X	X	---	---	---	---	---	2 (10 %)
<i>A. prevotii</i>	X	---	---	---	---	---	X	2 (10 %)
<i>P. propionicum/avidus</i>	---	x	---	---	X	---	---	2 (10 %)
<i>P. intermedia</i>	---	---	---	X	---	---	---	1 (5 %)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	---	---	---	---	---	---	X	1 (5 %)
<i>P. buccae</i>	---	---	---	---	---	X	---	1 (5 %)
<i>S. sacharoliticcus</i>	X	---	---	---	---	---	---	1 (5 %)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	---	---	---	---	---	---	X	1 (5 %)
Grupo Clostridium	---	---	---	---	---	---	X	1 (5 %)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	X	---	---	---	---	---	---	1 (5 %)
Perdidas	---	3	---	---	---	1	---	4/12,5%

Tabla III. Puntos de corte.

Antibiótico	Puntos de corte CLSI			Puntos de corte EUCAST			
	Susceptible	Intermedio	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible	Resistente
Amoxicilina*	≤0,5 µg/mL	1 µg/mL	≥2 µg/mL	0,5 µg/mL **	2 µg/mL **	4 µg/mL ***	8 µg/mL ***
Metronidazol	≤8 µg/mL	16 µg/mL	≥32 µg/mL	4 µg/mL **	4 µg/mL **	4 µg/mL ***	4 µg/mL ***

\*= Se considera que la CIM es igual a Ampicilina, \*\*= Anaerobios gramnegativos, \*\*\*= Anaerobios grampositivos, CLSI= Clinical & Laboratory Standards Institute, EUCAST= European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing.

por CLSI. El método utilizado para la detección de β-lactamasa fue con discos de nitrocefín, como lo recomienda CLSI. Todos los controles dieron positivos. De acuerdo a los puntos de corte de CLSI y EUCAST (Tabla III), se encontró una cepa de *F. nucleatum* resistente a amoxicilina y con producción de β-lactamasa, y otra cepa de *F. nucleatum* resistente a metronidazol.

Una cepa de *P. propionicum/avidus* fue intermedio a amoxicilina y con producción de β-lactamasa, según los puntos de corte de CLSI, según EUCAST es susceptible. De acuerdo a los puntos de corte de EUCAST, *Lactobacillus gasseri* fue resistencia a metronidazol, de acuerdo a CLSI es susceptible, presentó una CIM de 8 µg/mL (Tabla IV).

Tabla IV. Susceptibilidad antimicrobiana.

Especie	n especies	CLSI						EUCAST			
		Amoxicilina			Metronidazol			Amoxicilina		Metronidazol	
		S	I	R	S	I	R	S	R	S	R
<i>F. nucleatum</i>	3	2	0	1	2	0	1	2	1	2	1
<i>P. micra</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. acnes</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. propionicum/avidus</i>	2	1	1	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>A. prevotii</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. oralis</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	0
<i>P. intermedia</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>P. gingivalis</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>P. buccae</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>S. sacharoliticcus</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>L. gasseri</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>A. naeslundii</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
Grupo Clostridium	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0

R= Resistente, I= Intermedio, S= Susceptible.

## DISCUSIÓN

Se presenta una serie de casos de la cual se hará una descripción de los hallazgos encontrados, que servirían para proponer hipótesis para estudios posteriores, y como fuente de información con propósitos educativos, que facilite el aprendizaje sobre la microbiota endodóntica y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en nuestro medio (Pertuzé, 2006).

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó con el método de dilución en agar, que es método de referencia para anaerobios recomendado por CLSI. La ventaja de los estudios por cultivos es que se pueden realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, e identifican una gran variedad de especies en una muestra, incluyendo las que no se están buscando. Entre sus limitaciones están que son muy laboriosas, baja sensibilidad, y hay muchos microorganismos que no se pueden cultivar. Las técnicas moleculares tienen la ventaja de su alta sensibilidad, son rápidas, y detectan bacterias que no se pueden cultivar. Entre sus desventajas está el que con algunas técnicas, especies no identificadas o sin blanco no se pueden detectar, y no distinguen entre células viables o muertas, lo que sería conveniente por un lado porque permiten detectar bacterias que pudieron haber muerto durante la toma de muestra o el transporte, y por otra parte, podría ser una desventaja ya que las bacterias que habían muerto en el sitio de la infección, pueden ser detectadas, dando una falsa presunción de su papel en el proceso infeccioso (Siqueira & Roças 2005). Lo ideal para un estudio de perfiles de susceptibilidad antimicrobiana sería correlacionar la parte genética con el fenotipo de susceptibilidad, porque la presencia de un gen de resistencia antimicrobiana no necesariamente indica que la bacteria sea resistente al antimicrobiano ya que este podría no expresarse (Jungermann *et al.*).

Se encontraron microorganismos cultivables en todos los pacientes, con una prevalencia de 2 a 7 por diente, al igual que en otros estudios (Jacinto *et al.*, 2003; Lysakowska *et al.*, 2016; Skucaite *et al.*). Entre las especies aisladas, hubo predominio de los microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes (62,5 %) sobre anaerobios facultativos, particularmente grampositivos (68,76 %), confirmando los hallazgos de Munson *et al.* (2002) y de Sousa *et al.* (2013), mientras que Li *et al.* (2013) encontró predominio de gramnegativos.

El microorganismo aislado en mayor cantidad fue *F. nucleatum*, el cual estaba relacionado con *Prevotella spp.*, en los pacientes que presentaban algún tipo de dolor. Se sugiere que *F. nucleatum* tiene un papel en la patogenia de las infecciones endodónticas primarias, ha sido aislado frecuentemente, especialmente en casos sintomáticos y posee la capacidad de coagregarse, actuando como puente entre los primeros colonizadores y los últimos, durante la formación de la biopelícula. Se ha reportado asociado a *Prevotella spp.*, *P. intermedia*, *P. oralis* y *Eubacterium spp.* Se cree que *Prevotella spp.* tienen capacidad proteolítica y generan nutrientes que son utilizados por otras especies incluyendo *F. nucleatum*, de otra parte *F. nucleatum* produce proteasas que aumentan la capacidad de degradación proteolítica de *P. gingivalis*. También se ha reportado que las especies gramnegativas en especial *Fusobacterium spp.* y *Prevotella spp.*, contienen endotoxinas que pueden estimular la producción de bradiquinina, un potente mediador del dolor. Estas dos especies también se han reportado en casos que presentan tracto sinuoso, al igual que en estos casos (Baumgartner *et al.*, 1999; Jacinto *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2006).

Todos los microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes aislados en estos casos se han reportado en infecciones endodónticas primarias (Jungermann *et al.*; Lysakowska *et al.*), *Staphylococcus sacharolyticus*, el cual hace parte de la flora residente en piel, aunque es poco común, se ha encontrado en infecciones endodónticas primarias (Siqueira *et al.*, 2007), se han reportado casos de infecciones de la médula ósea (Liu *et al.*, 2015), neumonía (Wu *et al.*, 2009), y endocarditis de válvulas protésicas causadas por este microorganismo (Krishnan *et al.*, 1996).

El propósito del tratamiento de las infecciones endodónticas primarias es impedir la diseminación de la infección a otras partes del cuerpo. Sin embargo la terapia antimicrobiana puede ser útil como tratamiento adjunto en casos de pacientes con síntomas de infección o pacientes de alto riesgo, y en tal caso la terapia antimicrobiana se debe enfocar contra los patógenos más comunes. A veces se dificulta determinar cuándo y cuál antimicrobiano se debe administrar, la escogencia del antimicrobiano apropiado debe ser lo más racional posible, basándose en el conocimiento de los microorganismos causantes y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos. La estrategia terapéutica debería ser un agente con el menor espectro posible, para disminuir el riesgo de desarrollar cepas resistentes (Skucaite *et al.*, 2010).

La resistencia de *F. nucleatum* a amoxicilina es poco común, como lo reporta el estudio de Jacinto *et al.* (2008). En estos casos una de tres cepas de *F. nucleatum* fue resistente a amoxicilina y con producción de  $\beta$ -lactamasa, y otra a metronidazol. Debido a que la resistencia es diferente de acuerdo al lugar, estos hallazgos nos advierten sobre la posible presencia de resistencia de *Fusobacterium nucleatum* en nuestro medio. Se considera que la producción de  $\beta$ -lactamasa es la mayor causa de resistencia antibacteriana a los  $\beta$ -lactámicos. Una cepa de *P. propionicum/avidus* de dos resultó intermedio según CLSI con producción de  $\beta$ -lactamasa. Sousa *et al.* evaluaron la producción de  $\beta$ -lactamasa a seis bacterias anaerobias estrictas, encontrando que ninguna de ellas era positiva para  $\beta$ -lactamasa. Mientras que Kuriyama *et al.* (2007) encontró que 34 % de las cepas de *Prevotella spp.* eran resistentes a amoxicilina y todas producían  $\beta$ -lactamasa, y en el 4,8 % de las cepas susceptibles se detectó la producción de  $\beta$ -lactamasa; a pesar de las diferencias en los hallazgos ambos recomiendan terapia combinada de amoxicilina con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa, como el ácido clavulánico.

Se ha reportado que el metronidazol es efectivo contra anaerobios estrictos/aerotolerantes (Khemaleelakul *et al.*). De tres cepas de *F. nucleatum*, una fue resistente a metronidazol, según los puntos de corte de CLSI y EUCAST. Se cultivó una cepa de *L. gasseri* que resultó resistente a metronidazol según EUCAST, según CLSI tenía una CIM de 8  $\mu$ g/mL, que es el límite de susceptibilidad. Skucaite *et al.* encontró que el 55,6 % de los anaerobios aislados eran resistentes al metronidazol, y Khemaleelakul *et al.* reportaron un 12 % de los anaerobios estrictos. En casos de infecciones mixtas se recomienda combinar metronidazol con una penicilina para obtener un efecto terapéutico que cubra los microorganismos sobre los que no tiene efecto el metronidazol (Baumgartner & Xia, 2003). Se considera que *P. acnes* es intrínsecamente resistentes a metronidazol (Church *et al.*, 1996), lo que coincide con los hallazgos en estos casos.

El comportamiento de la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos puede cambiar por factores como el régimen de prescripción, la droga que se escoja, la adaptabilidad del paciente, el lugar geográfico, la automedicación, y la falta de control a la venta de los medicamentos (Gomes *et al.*). En nuestro medio es común la automedicación y la falta de control a la venta de antibióticos, por lo que se po-

dría pensar que exista resistencia a algunas cepas. Un estudio en Medellín reportó que el 73,2 % de las personas había tomado un medicamento no prescrito en el último año, y el 57,3 % en el último mes (Martínez-Domínguez *et al.*). En Bogotá se estableció la norma para restringir la venta de antibióticos solo con fórmula médica, el estudio buscaba determinar la aplicación de la restricción, encontrándose que el 80,3 % de las farmacias no lo cumplían a 5 años de establecida la norma (Vacca *et al.*).

Cada día es mayor el aumento de la resistencia a los agentes antimicrobianos prescritos en odontología, como lo demuestra los hallazgos de Gomes *et al.* y determinar si los pacientes están adquiriendo o presentan patógenos resistentes representa un área de investigación constante. En odontología en Colombiano no se realizan controles de vigilancia epidemiológico sobre resistencia, CLSI recomienda monitoreos periódicos de la tendencia en resistencia regional y en instituciones de los aislados relevantes, para guiar la terapia empírica antimicrobiana de las infecciones.

Entre las limitaciones que puede presentar el estudio están: durante la toma de muestra microbiológica, se realizó limado de las paredes del canal para tratar de desprender la biopelícula, lográndose recoger cepas plantónicas suspendidas en el canal y adheridas a las paredes de la dentina, se sabe que algunas bacterias pueden colonizar los túbulos dentinales o las irregularidades del canal lo que hace imposible su recolección. Debido a que la mayoría de las infecciones por anaerobios son polimicrobianas y el éxito del tratamiento depende de varios factores como, el drenaje y el uso de terapia antimicrobiana, la importancia relativa de la susceptibilidad a un solo microorganismo para predecir un resultado clínico favorable es difícil de determinar. Se utilizaron métodos de cultivos para el aislamiento de los microorganismos, por lo que algunos microorganismos que no son cultivables no se pudieron aislar.

Por los hallazgos encontrados en estos casos, es recomendable hacer estudios en nuestro medio, sobre la microbiota endodóntica en infecciones endodónticas por métodos de cultivos y moleculares y su susceptibilidad antimicrobiana a los diferentes antibióticos prescritos y la correlación entre el genotipo y el fenotipo de resistencia antimicrobiana para realizar una terapia adecuada, evitándose la selección de cepas resistentes.



## CONCLUSIONES

Se encontró la presencia de bacterias anaerobias estrictas/aerotolerantes en los pacientes con infecciones endodónticas primarias, principalmente *F. nucleatum*, *Prevotella spp.*, *P. micra*, *P. acnes*, *P. propionicum/avidus* y *A. prevotii*, junto a algunos microorganismos relacionados con pacientes sintomáticos.

Los hallazgos muestran presencia de algunos microorganismos anaerobios estrictos/aerotolerantes resistentes a los antimicrobianos evaluados, y con producción de  $\beta$ -lactamasa. Según lo encontrado se advierte la posibilidad de no utilizar terapia combinada de amoxicilina con metronidazol, si no buscar otra alternativa terapéutica, debido a la presencia de cepas

resistentes a ambos antimicrobianos. Se necesitan estudios que demuestren esta resistencia.

Para el manejo de las infecciones endodónticas, el uso de los antimicrobianos se debe justificar en un correcto diagnóstico microbiológico y análisis clínico para evitar la selección de cepas resistentes.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier E Botero. A la Dra. María Cecilia Martínez y Clara Lina Salazar. Agradecimientos a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de esta investigación. Los autores no reportan conflictos de interés. Este estudio fue financiado por la Universidad de Antioquia.

---

UPEGUI, J. L. F. & MOLINA, C. D. Y. Antimicrobial susceptibility of anaerobic microorganisms isolated from primary endodontic infections to amoxicillin and metronidazole and its association with clinical parameters: Case series. *Int. J. Odontostomat.*, 10(1):149-159, 2016.

**ABSTRACT:** The objective of this study is to describe the composition of the strict / aerotolerant anaerobic microbiota in primary endodontic infections, antimicrobial susceptibility, and the association with clinical variables. Samples were taken from seven patients with symptomatic or asymptomatic pulp necrosis. conservation techniques, cultivation, incubation and identification of strict / aerotolerant anaerobes. We used the agar dilution method to determine the antimicrobial susceptibility to amoxicillin and metronidazole. A total of 32 strains, 20 (62.5 %) were isolated were strict / aerotolerant anaerobes, and 8 (25 %) facultative anaerobe organisms. The strict anaerobe / more *Fusobacterium nucleatum* was frequently aerotolerant, it was isolated in three cases, all related to some type of pain, and in two cases it was related to *Prevotella spp.* a colony of *F. nucleatum* resistant to amoxicillin and  $\beta$ -lactamase production was found, and another *F. nucleatum* resistant to metronidazole. A colony of *P. propionicum / avidus* presented intermediate amoxicillin and  $\beta$ -lactamase producing resistance. Conclusions: the presence of strict anaerobic bacteria / aerotolerant in patients with primary endodontic infections was found. There is some related pain, as *F. nucleatum* and *P. micra* microorganisms. The findings show the presence of *F. nucleatum* resistant to the antimicrobial organisms evaluated.

**KEY WORDS:** periapical periodontitis, necrosis pulp necrosis, bacterial resistance to antibiotics.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antibiotic use in dentistry. ADA Council on Scientific Affairs. *J. Am. Dent. Assoc.*, 128(5):648, 1997.
- Baumgartner, J. C.; Siqueira, J. F. Jr.; Xia, T. & Róças, I. N. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J. Endod.*, 30(3):141-4, 2004.
- Baumgartner, J. C.; Watkins, B. J.; Bae, K. S. & Xia, T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J. Endod.*, 25(6):413-5, 1999.
- Baumgartner, J. C. & Xia, T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J. Endod.*, 29(1):44-7, 2003.
- Caplan, D. J.; Chasen, J. B.; Krall, E. A.; Cai, J.; Kang, S.; Garcia, R. I.; Offenbacher, S. & Beck, J. D. Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease. *J. Dent. Res.*, 85(11):996-1000, 2006.
- Church, D. L.; Bryant, R. D.; Sim, V. & Laishley, E. J. Metronidazole susceptibility and the presence of hydrogenase in pathogenic bacteria. *Anaerobe*, 2(3):147-53, 1996.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015.

- Corson, M. A.; Postlethwaite, K. P. & Seymour, R. A. Are dental infections a cause of brain abscess? Case report and review of the literature. *Oral Dis.*, 7(1):61-5, 2001.
- Fleming, A. *Sir Alexander Fleming's speech at the Nobel Banquet in Stockholm, December 10, 1945*. Nobelprize.org, Nobel Media AB 2014. Disponible en: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-speech.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-speech.html)
- Gomes, B. P.; Jacinto, R. C.; Montagner, F.; Sousa, E. L. & Ferraz, C. C. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J. Endod.*, 37(8):1058-62, 2011.
- Goodman, L. S.; Brunton, L. L.; Gilman, A.; Chabner, B. & Knollmann, B. C. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12ª ed. New York, Mc Graw-Hill Medical, 2011.
- Jacinto, R. C.; Gomes, B. P.; Ferraz, C. C.; Zaia, A. A. & Filho, F. J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.*, 18(20):285-92, 2003.
- Jacinto, R. C.; Montagner, F.; Signoretti, F. G.; Almeida, G. C. & Gomes, B. P. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J. Endod.*, 34(12):1451-6, 2008.
- Jungermann, G. B.; Burns, K.; Nandakumar, R.; Tolba, M.; Venezia, R. A. & Fouad, A. F. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *J. Endod.*, 37(10):1337-44, 2011.
- Khemaleelakul, S.; Baumgartner, J. C. & Pruksakorn, S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 94(6):746-55, 2002.
- Kuriyama, T.; Williams, D. W.; Yanagisawa, M.; Iwahara, K.; Shimizu, C.; Nakagawa, K.; Yamamoto, E. & Karasawa, T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol. Immunol.*, 22(4):285-8, 2007.
- Li, X.; Zhu, X. F.; Zhang, C. F.; Cathro, P.; Seneviratne, C. J. & Shen, S. Endodontic bacteria from primary and persistent endodontic lesions in Chinese patients as identified by cloning and 16S ribosomal DNA gene sequencing. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 126(4):634-9, 2013.
- Liu, C. J.; Sun, B.; Guo, J.; He, J. L.; Feng, B.; Wang, H. G.; Cao, K. K.; Liu, T. & Shen, D. X. A case of bone marrow infection by *Staphylococcus saccharolyticus*. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 19(7):1161-3, 2015.
- Lysakowska, M. E.; Ciebiada-Adamiec, A.; Sienkiewicz, M.; Sokoowski, J. & Banaszek, K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int. Endod. J.*, 49(5):422-30, 2016.
- Martínez-Domínguez, G. I.; Martínez-Sánchez, L. M. & Rodríguez-Gázquez, M. A. Características del consumo de medicamentos de venta libre en una población de adultos de la ciudad de Medellín (Colombia). *Salud Uninorte*, 29(3):360-7, 2013.
- Munson, M. A.; Pitt-Ford, T.; Chong, B.; Weightman, A. & Wade, W. G. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J. Dental Res.*, 81(11):761-6, 2002.
- Nair, P. Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Causes of Endodontic Failures. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 15(6):348-81, 2004.
- Ogawa, A. T.; Brasil de Souza, T. de A.; de Uzeda, M.; Jankevicius, J. V. & Jankevicius, S. I. Characterization of proteolytic activities of *Fusobacterium nucleatum*. *J. Endod.*, 32(6):521-3, 2006.
- Pertuzé, R. J. Criterios para publicar casos clínicos. *Rev. Chil. Enferm. Respir.*, 22(2):105-7, 2006.
- Poeschl, P. W.; Crepaz, V.; Russmueller, G.; Seemann, R.; Hirschl, A. M. & Ewers, R. Endodontic pathogens causing deep neck space infections: clinical impact of different sampling techniques and antibiotic susceptibility. *J. Endod.*, 37(9):1201-5, 2011.
- Krishnan, S.; Haglund, L.; Ashfaq, A.; Leist, P. & Roat, T. Prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *Clin. Infect. Dis.*, 22(4):722-3, 1996.
- Siqueira, J. F. Jr. & Roças, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J. Endod.*, 31(6):411-23, 2005.
- Siqueira, J. F. Jr.; Roças, I. N.; Paiva, S. S.; Magalhães, K. M. & Guimarães-Pinto, T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol. Immunol.*, 22(4):266-71, 2007.
- Siqueira, J. F. *Treatment of Endodontic Infections*. Berlin, Quintessence Pub. Co., 2011.

- Siqueira, J. F.; Jung, I. Y.; Rôças, I. N. & Lee, C. Y. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 99(5):641-7, 2005.
- Skucaite, N.; Peciuliene, V.; Vitkauskiene, A. & Machiulskiene, V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J. Endod.*, 36(10):1611-6, 2010.
- Sousa, E. L.; Gomes, B. P.; Jacinto, R. C.; Zaia, A. A. & Ferraz, C. C. Microbiological profile and antimicrobial susceptibility pattern of infected root canals associated with periapical abscesses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 32(4):573-80, 2013.
- Sundqvist, G. & Figdor, D. Life as an endodontic pathogen. *Endod. Top.*, 6(1):3-28, 2003.
- Sweeney, L. C.; Dave, J.; Chambers, P. A. & Heritage, J. Antibiotic resistance in general dental practice--a cause for concern? *J. Antimicrob. Chemother.*, 53(4):567-76, 2004.
- Tennert, C.; Fuhrmann, M.; Wittmer, A.; Karygianni, L.; Altenburger, M. J.; Pelz, K.; Hellwig, E. & Al-Ahmad, A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J. Endod.*, 40(5):670-7, 2014.
- Vacca, C. P.; Niño, C. Y. & Reveiz, L. Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo. *Rev. Panam. Salud Publica*, 30(6):586-91, 2011.
- World Health Organization (WHO). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014*. Geneva, World Health Organization (WHO), 2014.
- Wu, X.; Yu, C. & Wang, X. A case of *Staphylococcus saccharolyticus* pneumonia. *Int. J. Infect. Dis.*, 13(2):e43-6, 2009.

Dirección para Correspondencia:  
Luis Felipe Upegui J.  
Facultad de Odontología  
Universidad de Antioquia  
Calle 70 No. 52-21  
Medellín  
COLOMBIA

Email: luis.uegui@udea.edu.co

Recibido: 11-12-2015  
Aceptado: 01-03-2016