



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Especialidad en Endodoncia

PRESENCIA DE *ARCHAEAS* METANOGENICAS EN CONDUCTOS
RADICULARES Y SU RELACIÓN CON DIFERENTES DIAGNÓSTICOS

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la
Especialidad en Endodoncia

Presenta:

L.O. Flor Del Rocío Vázquez Hernández

Dirigido por:

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Co-dirigido por:

Dr. José Luis Ayala Herrera

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez
Presidente

Dr. José Luis Ayala Herrera
Secretario

E. E. M. O. Santiago Andaracua García
Vocal

C.D. E. E. Roberto Gustavo Sánchez Lara Y
Tajonar
Suplente

C. D. E. E. Héctor Eugenio Morales Nieto
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Marzo 2020
México

Resumen

Con el paso del tiempo se ha comprobado que la cavidad oral puede ser un sitio de origen para la diseminación de organismos patógenos a sitios distantes del cuerpo donde tienen la capacidad de producir complicaciones serias, por lo tanto es importante el desarrollo de estrategias efectivas para el tratamiento de conductos lo cual se relaciona directamente con el entendimiento de la composición de la microbiota patogénica presente en el sistema de conductos radiculares. En la cavidad oral se han encontrado, además de las bacterias, especies de *Methanobrevibacter* y aunque se desconoce si existen patógenos tradicionales en el dominio de las *Archaeas*, se ha sugerido que las *Archaeas* podrían estar involucradas en la etiopatogenia de diversas enfermedades. **Objetivo:** Determinar la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares y su posible relación con el diagnóstico de la pieza dental donde fue encontrada. **Material y métodos:** Se realizó un estudio prospectivo, transversal, observacional, donde se incluyeron a pacientes que acudieron a la clínica “Benjamín Moreno Pérez” para realizarse un tratamiento endodóntico; se obtuvieron un total de 68 muestras. Se aisló el ADN y se llevó a cabo la reacción en cadena polimerasa y electroforesis para la identificación de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares. **Resultados:** Se encontraron muestras positivas a *Archaeas* metanogénicas en los grupos estudiados (pulpitis, necrosis y retratamiento). **Conclusiones:** el presente estudio mostró la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares asociado a pulpas vitales, necróticas y con infección secundaria; no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes diagnósticos. Se encontró una mayor prevalencia de *Archaeas* metanogénicas en pacientes que padecían diabetes mellitus tipo 2; además se identificaron muestras positivas en pacientes que se encontraban bajo terapia antibiótica.

Palabras clave: *Archaeas* metanogénicas, conductos radiculares.

Summary

Over time, it has been proven that the oral cavity can be a site of origin for the spread of pathogenic organisms to distant sites in the body where they have the capacity to produce serious complications, therefore it is important to develop effective strategies for the root canal treatment which is directly related to the understanding of the composition of the pathogenic microbiota present in the root canal system. In the oral cavity, in addition to bacteria, *Methanobrevibacter* species have been found and although it is unknown if there are traditional pathogens in the domain of *Archaea*, it has been suggested that *Archaea* could be involved in the etiopathogenesis of various diseases. **Objective:** To determine if there are methanogenic *Archaea* in root canals and their possible relationship with the diagnosis of the dental piece where it was found. **Material and methods:** A prospective, cross-sectional, observational study was carried out, including patients who attended the "Benjamín Moreno Pérez" clinic for endodontic treatment: total of 68 samples were obtained. DNA was isolated and polymerase chain reaction and electrophoresis were carried out for the identification of methanogenic *Archaea* in root canals. **Results:** Positive samples for methanogenic *Archaea* were found in the studied groups (pulpitis, necrosis and retreatment). **Conclusions:** The present study showed the presence of methanogenic *Archaea* in root canals associated with vital, necrotic pulps and with secondary infection; no statistically significant difference was observed between the different diagnoses. A higher prevalence of methanogenic *Archaea* was found in patients suffering from type 2 diabetes mellitus; in addition, positive samples were identified in patients who were under antibiotic therapy.

Key words: Methanogenic *Archaea*, root canals.

Dedicatorias

A mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente en todo momento. A mis hermanos, quienes siempre me han motivado a seguir adelante, a Jaquelin por creer en mí.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Agradecimientos

A mis maestros mi eterna gratitud por todos el conocimiento que han compartido conmigo durante estos dos años y el compromiso de formar excelentes especialistas.

Al Dr. Rubén Domínguez por su apoyo, paciencia y su invaluable labor en la facultad de medicina.

Agradezco también a la Universidad Autónoma de Querétaro por haberme permitido formar parte de ésta comunidad universitaria y el día de hoy ser orgullosamente egresada de esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado sin el cual no podría haber concluido mi formación como especialista ni llevado a cabo este proyecto.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice

Contenido	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vi
Abreviaturas y siglas	vii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
III. Fundamentación teórica	5
III.1 <i>Archaeas</i>	6
IV. Hipótesis o supuestos	11
V. Objetivos	12
V.1 General	12
V.2 Específicos	12
VI. Material y métodos	13
VI.1 Tipo de investigación	13
VI.2 Población o unidad de análisis	13
VI.3 Muestra y tipo de muestra	13
VI. 4 Técnicas e instrumentos	13
VI.5 Procedimientos	14
VII. Resultados	18
VIII. Discusión	23
IX. Conclusiones	26
X. Propuestas	27
XI. Bibliografía	28
XII. Anexos	33

Índice de cuadros

Cuadro		Página
VII.1	Características de los pacientes divididos por diagnóstico.	18
VII. 2	Distribución y características de los dientes incluidos en cada grupo.	19
VII. 3	Distribución de muestras positivas a <i>Archaeas</i> .	20
VII. 4	Presencia de dolor en muestras positivas y negativas.	20
VII. 5	Muestras positivas y negativas asociadas a diabetes mellitus y/o hipertensión arterial.	21
VII. 6	Características clínicas de pacientes diabéticos.	21
VII. 7	Tabla 7. Distribución de muestras positivas en pacientes diabéticos.	22

Abreviaturas y siglas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

UAQ: Universidad Autónoma de Querétaro

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. Introducción

Las bacterias presentes en la cavidad oral fueron las primeras observadas y descritas por el “padre de la microbiología” Antonie van Leeuwenhoek (Slavkin, 1997). Más tarde en 1894, Miller observó que los microorganismos juegan un rol importante en el desarrollo de la inflamación de la pulpa dental (Sundqvist, 1976), pero no fue sino hasta 1965 que Kakehashi observó que para que exista una progresión a una enfermedad inflamatoria perirradicular es necesaria la presencia de agentes microbianos (*Kakehashi et al.*, 1965).

Las enfermedades endodónticas se originan por la infección del sistema de conductos radiculares y aunque usualmente es a consecuencia de caries dental, puede haber otras vías de infección como las enfermedades periodontales, erosión, abrasión entre otras causas. Las infecciones endodónticas típicamente resultan en periodontitis apicales y son persistentes (Nair, 2006; Scannapieco, 2013).

Los microorganismos al refugiarse en el sistema de conductos radiculares con pulpa necrótica se encuentran en una zona privilegiada ya que están protegidos de las células de defensa y moléculas del huésped: los fagocitos y los anticuerpos; a su vez, se verán delimitados por tejidos periapicales inflamados. Ya que la fuente de la infección no se puede eliminar el huésped forma en los alrededores del foramen apical una respuesta de defensa para impedir que la infección se propague, por lo tanto, se presentará una enfermedad inflamatoria crónica en los tejidos para obtener un equilibrio entre la agresión causada y la defensa. Si después del tratamiento endodóntico la infección se erradica se podrá generar una reparación de los tejidos del huésped (Siqueira, 2002).

II. Antecedentes

Belay *et al.* (1988) detectaron la presencia de microorganismos metanogénicos; para esto, tomaron 54 muestras de placa dental humana, de 36 pacientes. Del total de las muestras, 20 fueron positivas y pertenecían a pacientes con enfermedad periodontal. Las poblaciones metanogénicas predominantes tenían características morfológicas de especies de *Methanobrevibacter*. En tres pacientes, los metanógenos encontrados fueron similares a *Methanobrevibacter smithii*. También se encontraron subpoblaciones similares a *Methanosphaera stadtmanae*. Los resultados indican que los metanógenos presentes en el tracto intestinal son similares antigénicamente a aquellos encontrados en la cavidad oral.

Lepp *et al.* (2004) determinaron que existía una relación entre la severidad de la enfermedad periodontal y la relativa abundancia de genes de *Archaeas* en el surco gingival, usando PCR en tiempo real. Además se observó una disminución asociada a una mejoría clínica. En el 36% de los pacientes con periodontitis se encontraron *Archaeas* y se limitaron a sitios subgingivales con enfermedad periodontal. La presencia de *Archaeas* en estos sitios fue dominada por filotipos parecidos a *Methanobrevibacter oralis* y una subpoblación de *Methanobrevibacter* presente en el intestino de numerosos animales. Los autores propusieron que en la periodontitis, los metanógenos pueden promover la colonización de fermentadores secundarios por medio de relaciones sintrópicas en el surco gingival.

Siqueira *et al.* (2005) realizaron un estudio en el que se incluyó el análisis de 96 muestras, donde se analizaron 40 dientes no tratados previamente asociados a lesiones apicales asintomáticas, 35 casos de absesos apicales agudos y 21 casos de dientes previamente tratados asintomáticos asociados a lesiones perirradiculares. Se tomaron las muestras inicialmente con una lima tipo K #15 a 1 milímetro del ápice basándose en la longitud radiográfica, posteriormente se colocaron dos puntas de papel; la limas y las puntas fueron almacenadas en criotubos con buffer TE. Se extrajo el ADN de las muestras mediante el uso de dos protocolos distintos y fueron usados para la reacción en cadena de polimerasa usando primers para los dominios *Archaea* o *Bacteria*. No se encontraron *Archaeas*

en las muestras, sin embargo en todas las muestras se detectó la presencia de bacterias.

Posteriormente, se realizó un estudio donde se buscó la presencia de *Archaeas* en infecciones endodónticas primarias, se analizaron 20 muestras de dientes unirradiculares necróticos con evidencia radiográfica de periodontitis apical que no habían sido tratados previamente por endodoncia. Se usó PCR en tiempo real basado en el gen funcional *mcrA* y genes de arquea 16S rRNA; Los autores reportaron 5 casos positivos para *Archaeas*. Se encontró una presencia predominante de *Methanobrevibacter oralis*. Además se determinó la cantidad de bacterias y *Archaeas*, mientras que la cantidad de bacterias varió considerablemente la población de *Archaeas* en los sitios de enfermedad fue más consistente; se contabilizaron en un rango de 0.28% a 2.5% de la población microbiológica (Vianna et al., 2007).

Vickerman *et al.* (2007) realizaron un estudio filogenético de bacterias y *Archaeas*; usando 16S rARN para examinar la microbiota presente en conductos de 20 pacientes sintomáticos y 14 asintomáticos. Su objetivo fue determinar si la presencia de *Archaeas* influía con la severidad de síntomas clínicos. Después de ensanchar el conducto irrigando con solución salina para permitir el acceso a la longitud de trabajo, se colocaron puntas de papel durante 30 segundos, posteriormente fueron colocadas en frascos estériles con 1 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8. Y fueron almacenadas a -80°C hasta ser procesadas. Se detectaron especies parecidas a *Methanobrevibacter oralis* en un caso asintomático y en uno sintomático. Posteriormente se examinó el ADN proveniente de éstos conductos utilizando primers específicos para determinar bacterias cohabitantes. Se encontró *Treponema denticola* en el paciente asintomático pero no en el sintomático, en cambio, se encontró *Porphyromonas endodontalis* en el sintomático pero no en el paciente asintomático.

Efenberger *et al.* (2015) evaluaron la presencia de *Archaeas* usando el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, ellos examinaron si las *Archaeas* forman parte de los tejidos pulpaes inflamados y contribuyen al desarrollo de las

infecciones endodónticas. En su estudio también se analizó si algunas especies bacterianas asociadas a enfermedades pulpares estaban presentes. Se tomó la muestra a 20 pacientes. Se detectaron *Archaeas* metanogénicas en un 85% de las muestras endodónticas, las secuencias obtenidas fueron similares a las especies de *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium* y fueron filogenéticamente más similares a *Methanobrevibacter oralis* y a *Methanobrevibacter smithii*. También se encontró presente en los tejidos pulpares inflamados, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, siendo ésta última la bacteria encontrada con mayor frecuencia (70%). Concluyen que las *Archaeas* están presentes en los tejidos de pulpas inflamadas y pueden participar en el desarrollo de la infección endodóntica.

III. Fundamentación teórica

El desarrollo de estrategias efectivas para el tratamiento de conductos se relaciona directamente con el entendimiento de la composición de la microbiota patogénica presente en el sistema de conductos radiculares. La identificación de los microorganismos presentes en ellos, que se han hecho con técnicas tradicionales muestran que las infecciones son causadas principalmente por anaerobios obligados y facultativos (Sundqvist, 1970; Rolph *et al.*, 2001), sin embargo éstas técnicas tienen limitaciones y se puede subestimar la diversidad microbiológica ya que algunos organismos no son cultivables (Socransky *et al.*, 1963), el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA ha provisto una nueva herramienta para estimar la filogenia bacteriana (Olsen *et al.*, 1993). Con las técnicas moleculares se ha podido detectar bacterias presentes en infecciones endodónticas usando sondas de oligonucleótidos (Jung *et al.*, 2000).

Siqueira (2002) estableció los requerimientos para que los patógenos endodónticos se establezcan en los conductos radiculares y posteriormente participen en la patogénesis de la enfermedad perirradicular:

1. El microorganismo debe estar presente en un número suficiente para iniciar y mantener la enfermedad perirradicular.
2. El microorganismo debe poseer una serie de factores de virulencia que se deben de expresar durante la infección de los conductos.
3. Los microorganismos se deben de localizar espacialmente en el sistema de conductos radiculares de tal manera que sus factores de virulencia puedan llegar a los tejidos periapicales.
4. El entorno del conducto radicular debe permitir que el microorganismo viva y crezca y proveer señales que estimulen la expresión de los genes de virulencia.
5. Los microorganismos inhibidores deben estar ausentes o en bajos números en los conductos radiculares.

6. El huésped debe montar una estrategia de defensa en los tejidos perirradiculares para inhibir la propagación de la infección.

Los microorganismos se organizan en biofilms, un conjunto de organismos que forman parte de una superficie acuosa que se encuentra dentro de una matriz de exopolisacáridos (Nair, 2006) y forman colonias sésiles que se adhieren a las superficies. Los biofilms son medios convenientes y juegan un papel importante en las infecciones bacterianas persistentes (Costerton *et al.*, 1999) porque hacen más fácil el intercambio de genes, permiten el acceso a nutrientes y brindan protección (Moissl-Eichinger *et al.*, 2018).

Con el paso del tiempo se ha comprobado que la cavidad oral puede ser el sitio de origen para la diseminación de organismos patógenos a sitios distantes del cuerpo, esta situación se presenta con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos: con artritis reumatoide, diabetes, o bajo tratamiento de inmunosupresores (Li *et al.*, 2000). Un absceso de origen endodóntico tiene la capacidad de producir complicaciones serias como meningitis, absesos en el cerebro, empiema subdural y la muerte (Allan *et al.*, 1991).

Hargreaves y Cohen (2011) mencionan que la cavidad oral contiene una de las más altas acumulaciones de microorganismos del cuerpo. En la cavidad oral se han encontrado, además de bacterias, especies de *Methanobrevibacter*, las cuales forman parte del reino de las *Archaeas* (Aagaard *et al.*, 2018) y, aunque en las infecciones endodónticas se han encontrado ocasionalmente *Archaeas*, siguen siendo las bacterias los habitantes que se encuentran con más frecuencia en la cavidad bucal, se calcula que hay alrededor de 10.000 millones de células bacterianas (Hargreaves y Cohen, 2011).

III.1 *Archaeas*

A lo largo de la historia se ha tratado de clasificar de diversas maneras a los organismos. Durante mucho tiempo se dividió la vida en 5 reinos: Animalia, Plantae, Fungi, Protista y Monera (Whittaker y Margulis, 1978), éste esquema fue

ampliamente recibido durante mucho tiempo, sin embargo se consideró que este sistema no era filogenéticamente correcto, no era un sistema natural. Posteriormente Woese *et al.* (1991) propusieron que la vida en el planeta se dividiera en tres dominios: bacterias, *Archaeas* y eucariotas, a su vez cada uno se subdivide; por ejemplo, las *Archaeas* se subdividen en dos reinos: *Euryarchaeota*, y *Crenarchaeota*.

Las *Archaeas*, denominadas anteriormente como archaebacteria (término que dejó de ser usado para evitar relacionarlas con las bacterias) (Woese, *et al.*, 1991), son parecidas a las bacterias principalmente por ser unicelulares y porque carecen de núcleo, no obstante cuentan con características diferentes esencialmente en su pared y membrana celular (Garrett y Klenk, 2008). La distinción entre las bacterias y las *Archaeas* recae en el ARN ribosómico y los lípidos de la membrana: diéster de glicerol diacilo en las bacterias frente a diéteres de glicerol isoprenoide o tetraéteres de glicerol presentes en las *Archaeas*; también se distinguen en las bacterias ribosomas que contienen un tipo de ARNr bacteriano a diferencia del ARNr contenido en los ribosomas de las *Archaeas* (Woese *et al.*, 1991). Éstas últimas poseen apéndices celulares y mecanismos de procesamiento molecular distintos (en las enzimas que se relacionan con la transcripción, la traducción y la replicación) (Garrett y Klenk, 2008). Las *Archaeas* no poseen mureína, un peptidoglicano característico de bacterias Gram negativas, la cual forma sáculos y está presente en las membranas externas las cuales contienen lipopolisacáridos (Kandler and König, 1993); por otro lado poseen proteínas tipo histona que estabilizan el cromosoma y proteínas que son relativamente resistentes a condiciones extremas (Dubuque, 1997).

Gracias a sus características únicas, son capaces de funcionar y vivir en medios que los seres humanos considerarían hostiles (Siqueira *et al.*, 2005; Ryan, 2011). Se han denominado “extremófilas” ya que pueden habitar ambientes tales como aguas termales, lagos salados y hábitats volcánicos submarinos (Madigan *et al.*, 2000) sin embargo, se han realizado estudios en donde se revela que las *Archaeas*, al igual que las bacterias son mesofílicas (DeLong, 1992). A finales de

1970 se estableció la primera división de la diversidad filogenética de las *Archaeas*, basándose únicamente en organismos cultivados, se establecieron las dos principales ramas: *Euryarchaeota* y la *Crenarchaeota*. Parecía que las *Crenarchaeota* se encontraban exclusivamente en ambientes con altas temperaturas y las *Euryarchaeota* podían ser metanogénicas y halofílicas (Robertson *et al.*, 2005).

Se ha descrito su presencia en la compleja microbiota humana (Dridi *et al.*, 2011). Nkamga *et al.* (2017) describieron a las *Archaeas* como componentes esenciales de la microbiota digestiva, en donde se han encontrado tanto *Archaeas* metanogénicas como no metanogénicas. En algunos estudios realizados en pacientes con enfermedades gastrointestinales y desordenes metabólicos tales como síndrome del colon irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, estreñimiento y obesidad se han encontrado altos niveles de *Archaeas* y metano (Nakamura *et al.*, 2010), incluso se ha descrito una mayor presencia en niños con obesidad en comparación con niños con un peso normal (Van de Pol *et al.*, 2017; Maya-Lucas *et al.*, 2018).

Belay *et al.* (1990) encontraron *Archaeas* en vagina, en su estudio un reportaron 2 muestras positivas de las 20 muestras analizadas, dichas muestras pertenecían a pacientes con vaginosis bacteriana siendo la especie *Methanobrevibacter smithii* la que se encontró presente.

En la microbiota oral Belay *et al.* (1988) describieron su presencia en muestras de placa dental de pacientes con enfermedad periodontal. Aunque las *Archaeas* no son especies dominantes en la microbiota oral se han encontrado especies metanógenas entre ellas *Thermoplasmatales*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, y *Methanosphaera* (Zhang *et al.*, 2018).

Drancourt *et al.* (2017) observaron la presencia de metanógenos en un absceso cerebral donde encontraron *Methanobrevibacter oralis* como parte de los responsables de este absceso, se observó también una relación sinérgica con el *Streptococcus intermedius*.

A pesar de que se desconoce si existen patógenos tradicionales en el dominio de las *Archaeas*, se ha sugerido que podrían estar involucradas en la etiopatogenia de diversas enfermedades incluidas enfermedades intestinales y orales. Los microorganismos metanógenos, por medio de interacciones sinérgicas, pueden contribuir a patologías en algunas condiciones (Efenberger *et al.* 2015; Relman y Falkow, 2016), a esto se le denomina sintrofia, de tal manera que dos o más organismos cooperan para consumir una sustancia la cual no puede ser catabolizada sólo por un microorganismo. Por ejemplo, en bolsas periodontales, los metanógenos pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad al consumir el H₂ que producen las bacterias fermentadoras secundarias (Eckburg *et al.*, 2003). En condiciones anaeróbicas y en presencia de hidrógeno pueden reducir el dióxido de carbono a metano (Lennox *et al.*, 2015). Algunos de los motivos por los cuales probablemente no se ha demostrado su patogenicidad es la dificultad para aislar y cultivar éstos microorganismos (Eckburg *et al.*, 2003).

Las *Archaeas* poseen una amplia resistencia a los agentes antimicrobianos usados en infecciones humanas. Los antibióticos que son efectivos en contra de las bacterias son inefectivos en contra de las *Archaeas*. Su pared celular, al carecer de peptidoglucanos, las hace resistentes a antibióticos que interfieren en la síntesis de éstos. Por otro lado se encontró que si son susceptibles a la proteína inhibidora de la síntesis de ácido fúsidico y derivados de imidazol (Dridi *et al.*, 2011; Khelaifia y Drancourt, 2012).

Cepas de *Methanobrevibacter smithii* se mostraron resistentes a ampicilina, gentamicina, rifampicina, estreptomina, ofloxacino, tetraciclina, y amfotericina B; también se mostraron altamente resistentes a la vancomicina; en cuanto al cloranfenicol fueron moderadamente resistentes, y a la bacitracina, metronidazol y ornidazol y escualamina. En las cepas de la susceptibilidad fue igual a la de *Methanobrevibacter smithii*, excepto por la bacitracina, por su parte la *Methanosphaera stadtmanae* fue resistente al cloranfenicol (Dridi *et al.*, 2011). Los datos se han obtenido *in vitro* y se pueden usar para en un futuro diseñar protocolos para la descontaminación compleja (Khelaifia y Drancourt, 2012).

Anteriormente se ha propuesto la existencia de una transferencia genética lateral entre las bacterias y las *Archaeas*. Entre las eubacterias, la *Thermotoga marítima* demostró tener la mayor cantidad de genes similares a los de las *Archaeas* (24%), 81 genes similares a los de las *Archaeas* se encuentran enclaustrados en 15 regiones de la *Thermotoga marítima*. (Nelson *et al.*,1999).

Garcia-Vallve *et al.* (2000) explican que hay evidencia la cual sugiere que la transferencia genética horizontal es un factor fuerte en la evolución de las procariontas. Ellos desarrollaron un procedimiento estadístico donde se puede predecir si el genoma se ha adquirido mediante transferencia horizontal. Cuando se aplicó este procedimiento a diecisiete genomas bacterianos completos y a siete de *Archaeas*, se encontró que el porcentaje de genes transferidos horizontalmente variaba de 1.5% a 14.5%. Las *Archaeas* y las bacterias no patógenas tuvieron el más alto porcentaje, excepto por el *Mycoplasma genitalium* que tuvo el más bajo. Encontraron que los genes informacionales eran menos probables de ser transferidos que los genes operacionales.

IV. Hipótesis

Hipótesis de trabajo

Existen *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares con diagnóstico de enfermedad post tratamiento y no existen en conductos con pulpitis y necrosis.

Hipótesis nula

No existen *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares con diagnóstico de enfermedad post tratamiento pero si existen en conductos con pulpitis y necrosis.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

V. Objetivos

V.1 Objetivo general

Determinar la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares y su posible relación con el diagnóstico de la pieza dental donde fue encontrada.

V.2 Objetivos específicos

Identificar la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares vitales.

Identificar la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares con infecciones primarias.

Identificar la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares con enfermedad post tratamiento.

VI. Material y métodos

VI. 1 Tipo de investigación

Prospectivo, transversal, observacional.

VI. 2. Población

Pacientes que acudieron a la clínica “Benjamín Moreno Pérez” para la realización de tratamiento de conductos en la clínica del posgrado en endodoncia. Se incluyeron pacientes de ambos sexos de entre 10 y 75 años que firmaron el consentimiento informado. No se incluyeron en el estudio muestras de pacientes con pulpa sana y se eliminaron muestras que se contaminaron durante su manejo.

VI. 3 Muestra

Se recolectaron las muestras de conductos radiculares vitales, necróticos y previamente tratados antes de iniciar la instrumentación y después de determinar la longitud de trabajo con localizador apical. Se usaron limas tipo K#15 para recolectar el material dentro del conducto el cual se llevó a un microtubos con PBS, este proceso se repitió en tres ocasiones.

VI. 4 Técnicas e instrumentos

Se realizó el llenado de una ficha endodóntica en donde se registran los datos obtenidos en el interrogatorio, la exploración intraoral y extraoral: inspección, palpación, percusión, sondeo, pruebas de sensibilidad térmica, movilidad y exploración radiográfica para así realizar el diagnóstico pulpar y periapical. Se le proporcionó un consentimiento informado al paciente para poder realizar la toma de la muestra la cual se recolectó en un microtubo debidamente sellado y llevado a congelación. Se realizó la extracción de ADN de las muestras, posteriormente se llevó a cabo la PCR y fueron observados con electroforesis. Todos los datos fueron registrados en Excel para su posterior análisis.

VI. 5 Procedimientos

1.- Se realizó la historia clínica con el formato aprobado y utilizado en la clínica de la Especialidad en Endodoncia de la Universidad Autónoma de Querétaro.

2.- Se explicó la necesidad del tratamiento endodóntico y se les entregó a los pacientes o tutores el consentimiento informado del procedimiento, este formato se entrega de manera rutinaria a todos los pacientes de la clínica.

3.- Una vez diagnosticado el paciente y habiendo verificado que cumpliera con los criterios de inclusión, antes de realizar cualquier tratamiento, se invitó al paciente a participar en el proyecto de investigación, se explicó detalladamente la justificación, objetivo del estudio, los beneficios, procedimientos así como posibles riesgos y todas las aclaraciones pertinentes, asimismo se resolvieron detalladamente todas sus dudas y si decidió participar se le entregó el consentimiento informado con todos los detalles por escrito, se le pidió que lo firmara y se le entregó una copia del mismo. Cabe aclarar que todos los datos personales fueron confidenciales y que en todo momento se cumplirán los principios éticos propuestos en la declaración de Helsinki (World Medical Association, 2001).

A. Recolección de las muestras

1. Se desinfectaron los dientes adyacentes así como el órgano dental a tratar con una torunda de algodón empapada en peróxido de hidrógeno al 3% sin dañar tejidos adyacentes.

2. Posterior a la anestesia local se realizó el aislamiento del órgano dental con dique de hule.

3. Se desinfectó el diente con una torunda de algodón con hipoclorito de sodio al 2.5%.

4. Se realizó la remoción de caries y restauraciones usando fresas estériles, en caso necesario se irrigó la cámara pulpar con hipoclorito de sodio al 2.5%.

5. Posterior a la localización de los conductos se irrigó la cámara pulpar con solución fisiológica para eliminar el hipoclorito.

6. Se recolectó la muestra inicialmente con limas #15 (Maillefer, Ballaigues, Suiza). Se colocó la lima a longitud de trabajo usando localizador apical y el material recolectado se llevó a un microtubo con PBS, la lima se llevó dentro del conducto y se repitió en tres ocasiones.

7. Para los órganos dentales en los que se realizó retratamiento se recolectaron en un tubo extra los restos de gutapercha. Se trató de recolectar la gutapercha extraída más allá del tercio medio y apical.

8. Se cerraron los tubos y se mantuvieron en congelación.



Fig. 1. A y B. Recolección de muestras en tubos. C. Muestras en la centrifuga

B. Aislamiento de ADN

Se realizó el aislamiento de ADN colocando cada muestra en la centrifuga a 13.000 rpm por 10 minutos, los pellets se lavaron 3 veces con PBS (fig2).

Se descartó el PBS para posteriormente agregar 200 μ L de solución de OHO, se incubó durante 10 minutos a 85° C una vez realizado esto se agregaron 100 μ L de mutanolisina y se incubó durante 1 hora a 50°C.

Se agregó 30 μ L de lisosima para incubarlo a 37° C durante 1 hora. Se agregaron 30 μ L de Cell lisis buffer y 30 μ L de proteinasa K, se incubó durante 10 minutos a 80 ° C. A continuación se agregó 60 μ L de acetato de amonio para ser llevadas a la máquina vórtex 20 segundos.

Se llevaron los pellets a centrifugar durante 10 minutos, una vez realizado esto se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo (fig. 2). Se agregaron 500 μ L de fenol-cloroformo alcohol isoamílico y se mezclaron invirtiendo el tubo. Se centrifugó durante 10 minutos y posteriormente se llevó la capa acuosa a un nuevo tubo. Se agregaron 400 μ L de isopropanol al 100% y se mezcló invirtiendo. Se incubó en hielo durante 10 minutos, se centrifugó y se descartó el isopropanol.



Fig.2 El sobrenadante se pasa a un tubo nuevo

Se lavó el pellet con 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó 10 minutos para después descartar el etanol. Se secó el pellet y se agregaron 50 μ L de solución de hidratación para incubarlo a 65° por 30 minutos. Se colocó a 70°C para almacenarlo.

C. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

Se realizó la PCR utilizando primers específicos, en reacciones de 25 μ l, la reacción se realizó colocando 13.3ul de agua bidestilada estéril, 2.5 μ l de solución Buffer, 1.2ul de Mg, 0.5ul de dNTP's, 0.75ul de cada uno de los oligonucleótidos, 1ul de Taq y 5ul del ADN previamente aislado.

D. Proceso de Electroforesis.

El producto de este PCR fue cargado en geles de agarosa al 2% y sometido a electroforesis. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador UV. Se identificaron y se documentó la presencia o ausencia de barras en el gel.

VII. Resultados

Se procesaron un total de 68 muestras tomadas de 65 pacientes de ambos sexos. Las edades de los pacientes fueron de entre 10 hasta 75, se encontró una diferencia significativa al realizar el análisis de varianza (ANOVA) ($P=0.2763$).

Se incluyeron dientes vitales, necróticos y previamente tratados (tabla 1).

Del total de muestras 14 pertenecían a 10 pacientes con diabetes mellitus e hipertensión arterial; 5 muestras de pacientes con diabetes mellitus, 3 de pacientes con hipertensión arterial y 6 a pacientes con ambos diagnósticos.

Tabla 1. Características de los pacientes divididos por diagnóstico

	Total (n=68)	Pulpitis (n=31)	Necrosis (n=29)	Retratamiento (n=8)
$\bar{X} \pm DE$ (rango)				
Edad	37.04 \pm 17.19	37.87 \pm 14.25	34 \pm 20.39	44.87 \pm 10.98
Frecuencia (%)				
Masculino	28 (41.1)	15 (48.3)	12 (41.3)	1 (12.5)
Femenino	40 (58.8)	16 (51.6)	17 (58.6)	7 (87.5)
Diabéticos	11 (16.1)	4 (12.9)	5 (17.2)	2 (25)
Hipertensos	9 (13.2)	4 (12.9)	3 (10.3)	2 (25)
Otros	4 (5.8)	2 (6.4)	2 (6.8)	0

\bar{X} : promedio, DE= Desviación estándar

Se tomaron muestras de dientes incisivos, premolares y molares siendo más frecuentes las muestras de molares con un 66.1%.

Se realizó la prueba de Chi cuadrada entre los pacientes con y sin dolor en los distintos grupos donde se encontró una diferencia estadísticamente significativa

($p=0.0061$) por lo tanto se observa mayor frecuencia de dolor en pacientes con diagnóstico de necrosis con un 72.4% (tabla 2).

Tabla 2 Distribución y características de los dientes incluidos en cada grupo

	Total (n=68)	Pulpitis (n=31)	Necrosis (n=29)	Retratamiento (n=8)
Frecuencia (%)				
Tipo de diente				
Incisivos	14 (20.1)	6 (19.3)	8 (27.5)	0 (0)
Premolares	9 (13.2)	1 (3.2)	7 (24.1)	1 (12.5)
Molares	45 (66.1)	24 (77.4)	14 (48.2)	7 (87.5)
Lesión apical	24 (35.2)	1 (3.2)	20 (68.9)	3 (37.5)
Presencia de dolor*	43 (63.2)	21 (67.7)	21 (72.4)	1 (12.5)
Dolor a la percusión	36 (52.9)	14 (45.1)	21 (72.4)	1 (12.5)
Dolor a la palpación	23 (33.8)	4 (12.9)	18 (62)	1 (12.5)

*Prueba de Chi cuadrada $p<0.05$

Del total de muestras 14 de ellas resultaron positivas para *Archaeas metanogénicas* representando un 20.5% del total. La presencia de los microorganismos fue más frecuente en muestras con diagnóstico de necrosis, a su vez en diagnósticos de pulpitis y dientes previamente tratados se encontraron porcentajes similares, al aplicar la prueba de Chi cuadrada ($p=0.184$) no se encuentra diferencia estadísticamente significativa (tabla 3).

Tabla 3. Distribución de muestras positivas a Archaeas

	Total (n=68)	Pulpitis (n=31)	Necrosis (n=29)	Retratamiento (n=8)
Frecuencia (%)				
Total positivas*	14(20.5)	4(12.9)	9(31)	1(12.5)
Positivas Diabéticos	6(8.8)	2(6.4)	3(10.3)	1(12.5)
Positivas HTA	1(1.4)	1(3.2)	0	0
Positivas Diabéticos + HTA	6(8.8)	2(6.4)	3(10.3)	1(12.5)

*Prueba de Chi cuadrada $p > 0.05$, HTA= Hipertensión arterial

No existe diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.5458$) entre la distribución de los grupos divididos por presencia o ausencia de sintomatología y la presencia de *Archaeas* metanogénicas (tabla 4).

Tabla 4. Presencia de dolor en muestras positivas y negativas

	Presencia de dolor (n=43)	Ausencia de dolor (n=25)
Frecuencia (%)		
Muestras positivas	10(23.2)	4(16)
Muestras negativas	33(76.7)	21(84)

Prueba exacta de Fisher $p > 0.05$

Se incluyeron 6 muestras de pacientes que al momento de la toma de la muestra se encontraban bajo terapia antibiótica, de éstas, 3 fueron positivas a la presencia de *Archaeas metanogénicas*.

La tabla 5 muestra la frecuencia y porcentaje de muestras positivas en los grupos que padecen alguna enfermedad sistémica ($p=0.031$).

Tabla 5. Muestras positivas y negativas asociadas a diabetes mellitus y/o hipertensión arterial.

	Con diabetes mellitus y/o HTA (n=14)	Sin diabetes mellitus y/o HTA (n=54)
	Frecuencia (%)	
Muestras positivas	6 (42.8)	8 (14.8)
Muestras negativas	8 (57.1)	46 (85.1)

HTA: Hipertensión arterial, prueba exacta de Fisher $p<0.05$

De las 68 muestras, 11 pertenecían a pacientes diabéticos (16% del total) y la mayoría (81.8%) se habían obtenido de pacientes femeninos (tabla 6).

Tabla 6. Características clínicas de pacientes diabéticos.

	Total (n=11)	Pulпитis (n=4)	Necrosis (n=5)	Retratamiento (n=2)
	$\bar{X} \pm DE$			
Edad	50.8±8.35	44.2 ±13.69	59.4 ± 3.71	42.5±10.6
	Frecuencia (%)			
Masculino	2 (18.1)	0 (0)	1 (20)	1 (50)
Femenino	9 (81.8)	4 (100)	4 (80)	1 (50)

\bar{X} : promedio, DE= Desviación estándar

Dentro de las 6 muestras positivas de pacientes con enfermedades sistémicas todos presentaban diabetes mellitus tipo 2 y de ellos sólo un paciente presentaba además hipertensión arterial (tabla 7).

Tabla 7. Distribución de muestras positivas en pacientes diabéticos.

	Total (n=11)	Pulpitis (n=4)	Necrosis (n=5)	Retratamiento (n=2)
	Frecuencia (%)			
Positivas	6(54.54)	2(50)	3(60)	1(50)

VIII. Discusión

El entendimiento de la microbiota presente en sitios de infección es importante para poder desarrollar estrategias eficaces en la eliminación de los microorganismos patógenos. Actualmente se ha demostrado la presencia de *Archaeas* metanogénicas en diferentes sitios del cuerpo humano, sin embargo no se ha reportado que cuenten con potencial patógeno (Moissl-Eichinger *et al.*, 2017).

En esta investigación se identificó la presencia de *Archaeas* metanogénicas en los tres grupos estudiados (conductos radiculares con diagnóstico de pulpitis, necrosis o retratamiento), representando el 20.5% del total de las muestras, estos resultados son similares a los previamente reportados por Vianna *et al.* (2006) donde se identificaron estos microorganismos en un 25% de las muestras recolectadas de dientes con infección primaria y evidencia radiográfica de lesión apical. Efenberger *et al.* (2015), encontraron una mayor cantidad de casos positivos identificando *Archaeas* metanogénicas en el 85% de las muestras examinadas, en su estudio analizaron 20 muestras de dientes con pulpas dentales inflamadas; concluyeron que las *Archaeas* presentes pertenecían al grupo de las metanogénicas. En esta investigación no se encontró una clara asociación entre la presencia de *Archaeas* metanogénicas y los diferentes diagnósticos pulpares.

A su vez nuestros resultados difieren a los obtenidos por Siqueira *et al.* (2005) donde en 96 muestras de dientes con infección primaria y secundaria asociados a lesiones asintomáticas perirradiculares, buscaron la presencia de bacterias, espiroquetas y *Archaeas* metanogénicas mediante el uso de dos protocolos para la extracción de ADN y la técnica de PCR sin encontrar ningún caso positivo para *Archaeas* metanogénicas. Más tarde Rocas y Siqueira (2011) realizaron otro estudio en dientes con infección primaria donde se comparó la eficacia de hipoclorito y clorhexidina al ser utilizados como irrigantes, con este objetivo se estudiaron muestras tomadas antes y después de la instrumentación mediante PCR para bacterias, hongos y *Archaeas*, no encontrándose ningún caso positivo para éstas últimas. Ese mismo año ellos llevaron a cabo otro estudio donde analizaron los efectos antimicrobianos del tratamiento endodóntico comparando las

muestras tomadas al iniciar el tratamiento, después de la instrumentación y luego de una semana de medicación intraconducto donde tampoco encontraron muestras positivas a *Archaeas* (Rocas y Siqueira, 2011 b).

Vickerman *et al.* (2007) no encontraron una correlación entre la severidad de los síntomas y la presencia de *Archaeas* en un análisis que hicieron a 34 muestras de pacientes sintomáticos y asintomáticos en donde sólo reportaron dos muestras positivas, una de cada grupo. Estos resultados coinciden con nuestra investigación donde no se observó una diferencia significativa entre la presencia o ausencia de sintomatología relacionada a muestras positivas. Por otro lado Jiang *et al.* (2009) determinaron que hay una relación más alta entre la sintomatología y la presencia de *Archaeas* en conductos radiculares, ellos reportaron que en el 72. 7% de las muestras sintomáticas se habían identificado tanto bacterias como *Archaeas*, en cambio, en los que solamente se pudo identificar la presencia de bacterias sólo el 44. 75% presentaban síntomas. Zheng *et al.* (2019) realizaron un estudio en donde confirmaron la presencia *Archaeas* en lesiones cariosas profundas de dientes con pulpitis reversible y pulpitis irreversible.

En nuestro estudio se encontraron muestras positivas en pacientes que estaban bajo terapia antibiótica al momento de la recolección de la muestra, se ha realizado un estudio donde se demuestra que las *Archaeas* metanogénicas tienen una amplia resistencia a agentes microbianos (Dridi *et al.*, 2011).

En la presente investigación se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares de pacientes sin diabetes mellitus tipo II y pacientes con diabetes mellitus tipo 2, hasta el momento no se ha realizado ningún estudio donde se investigue la relación entre la enfermedad y la presencia de estos microorganismos en conductos radiculares. No obstante, en un estudio llevado a cabo por Dame-Teixeira *et al.* (2019) reportaron presencia de Thaumarchaeota y *Archaeas* metanogénicas (Methanonocellales) en todas sus muestras recolectadas de dientes con caries y biofilms de superficies sin lesiones cariosas recolectadas de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y 2.

En general los pacientes con diabetes mellitus son más susceptibles a enfermedades infecciosas (Casqueiro *et al.*, 2012) por ello es importante conocer la naturaleza de éstas. En un estudio realizado por Remely *et al.* (2013) se mostró una asociación entre la presencia de Archaeas metanogénicas y pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ellos examinaron la microbiota fecal en tres grupos de estudio donde se compararon las diferencias entre pacientes con obesidad, pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y pacientes control; concluyeron que hay mayor abundancia y diversidad de la microbiota en pacientes con obesidad y diabetes mellitus tipo 2, siendo en éste último grupo donde fue más frecuente la presencia de Archaeas metanogénicas.

Dame-Teixeira *et al.* (2019) mencionan que la presencia de diversas especies de Archaeas podrían estar subestimadas y que no se limitan sólo a los metanogénicas, otros investigadores han reportado la presencia de otras especies como los Thermoplasmata en muestras obtenidas de pacientes con periodontitis crónica (Li *et al.*, 2014), también se ha reportado la presencia del filo Crenarchaeota (Slaton *et al.*, 2011).

Hasta el momento no se han descrito a ningún miembro del reino de las Archaeas como patógenos humanos y dado que se ha encontrado en porcentajes muy bajos es poco probable que jueguen un rol de patogenicidad importante en periodontitis apicales (Siqueira y Rocas, 2019). Sin embargo algunos trabajos en los que se ha asociado la presencia de estos microorganismos con la severidad de la enfermedad o la sintomatología sugieren que podrían ser patógenos en periodontitis y periodontitis apical (Maeda *et al.*, 2013).

IX. Conclusiones

El presente estudio mostró la presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares asociado a pulpas vitales, necróticas y con infección secundaria, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes diagnósticos y por lo tanto no se encontró asociación entre el diagnóstico pulpar y la presencia de *Archaeas* metanogénicas.

Se encontró una mayor frecuencia de *Archaeas* metanogénicas en pacientes que padecen diabetes mellitus tipo 2; además se identificaron muestras positivas en pacientes bajo terapia antibiótica. Actualmente no se ha determinado si las *Archaeas* metanogénicas tienen potencial patógeno por lo que se requieren más estudios para analizar su papel en la microbiota.

X. Propuestas

En la actualidad no se han reconocido a las *Archaeas* metanogénicas como agentes patógenos en la cavidad oral, y ya que existe poca investigación del tema, se sugiere realizar más estudios donde se explore si existe alguna relación entre la severidad de las enfermedades orales y la sintomatología que presentan los pacientes.

De acuerdo a los hallazgos de esta investigación, se sugiere en futuras investigaciones ampliar el conocimiento sobre la relación que hay entre la presencia de *Archaeas* metanogénicas en la cavidad oral y pacientes con diabetes mellitus. Además de indagar en el papel que podrían desempeñar sobre el curso de la enfermedad y de las enfermedades orales.

XI. Bibliografía

- Aagaard, K., R. A. Luna, and J. Versalovic. 2018. Body Sites and Their Unique Biology. Principles and practice of infectious diseases. Eighth Edi. Elsevier Inc.
- Allan, B. P., M. A. Egbert, and R.W.T. Myall. 1991. Orbital abscess of odontogenic origin. Case report and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac* 20 (5): 268.
- Belay, N., R. Johnson, B. S. Rajagopal, E. C. De Macario, and L. Daniels. 1988. Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (2): 600.
- Casqueiro, J., J. Casqueiro, and C. Alves. 2012. Infections in Patients with Diabetes Mellitus : A Review of Pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab* 16: 27.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418): 1318.
- Dame-Teixeira, N., J. Alves, D. Azevedo, A. Belmok, L. Gustavo, L. Marconatto, A. Giongo, and C. Kywa. 2020. Presence of Archaea in dental caries biofilms. *Arch Oral Biol* 110: 1.
- DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (June): 5685.
- Drancourt, M., V. D. Nkamga, N. A. Lakhe, J. M. Régis, H. Dufour, P. E. Fournier, Y. Bechah, W. M. Scheld, and D. Raoult. 2017. Evidence of archaeal methanogens in brain abscess. *Clin. Infect. Dis.* 65(1):1
- Dridi, B., M. L. Fardeau, B. Ollivier, B., D. Raoult, and M. Drancourt. 2011. The antimicrobial resistance pattern of cultured human methanogens reflects the unique phylogenetic position of Archaea. *J Antimicrob Chemother.* 66 (9): 2038.
- Dridi, B., D. Raoult, and M. Drancourt. 2011. Archaea as Emerging organisms in complex human microbiomes. *Anaerobe* 17 (2): 56.
- Dubuque, I., 1997. Atlas RM. Principles of microbiology. Edited by WCB Publishers. 2nd ed.
- Eckburg, P., P. W. Lepp and D. Relman. 2003. Archaea and their potential role in

- human disease. *Infect Immun* 71 (2): 591.
- Efenberger, M., J. Agier, E. Pawłowska, and E. Brzezińska-Błaszczyk. 2015. Archaea prevalence in inflamed pulp tissues. *Cent Eur J Immunol* 40 (2): 194.
- Garcia-Vallve, S., A. Romeu, and J. Palau. 2000. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res* 10 (11): 1719.
- Garrett, R. A., and H. Klenk. 2008. *Archaea: evolution, physiology, and molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Hargreaves, K. M. and Cohen, S. 2011. *Vías de la Pulpa*. 10th ed. Elsevier Inc.
- Jiang, Y., W. W. Xia, C. L. Li, W. Jiang, and J. Liang. 2009. Preliminary study of the presence and association of bacteria and archaea in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 42: 1096.
- Jung, I., B. Choi, K. Kum, B. Roh, S. Lee, C. Lee, and D. Park. 2000. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 26 (10): 599.
- Kakehashi, S., H. Stanley, R. Fitzgerald. 1965. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20 (3): 340.
- Kandler, O. and H. König. 1993. Cell envelopes of archaea: structure and chemistry. *New Compr. Biochem.* 26: 223.
- Khelaifia, S., and M. Drancourt. 2012. Susceptibility of archaea to antimicrobial agents: applications to clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 18 (9): 841.
- Lennox, J., S. E. Lingenfelter and D. L. Wance. 2015. Arc fuel haebacteri al production : from methane biomass. *Am Biol Teach* 45 (3): 128.
- Lepp, P. W., M. M. Brinig, C. C. Ouverney, K. Palm, G. C. Armitage and D .A. Relman. 2004. Methanogenic archaea and human periodontal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (16).
- Li, X., K. M. Kolltveit, L. Tronstad, and I. Olsen. 2000. "Systemic diseases caused by oral infection." *Clin Microbiol Rev* 13 (4): 547.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganisms*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.
- Maya-Lucas, O., S. Murugesan, K. Nirmalkar, L. D. Alcaraz, C. Hoyo-Vadillo, M.

- Pizano-Zárate, and J. García-Mena. 2019. The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. *Anaerobe*, 55 :11.
- Maeda, H., H. Kimito, M. Junji, Y. Tadashi, K. Susumu, and T. Shogo. 2013. Medical microbiological approach to archaea in oral infectious diseases. *Jpn Dent Sci Rev* 49(2): 72.
- Moissl-Eichinger, C., M. Pausan, J. Taffner, G. Berg, C. Bang and R. A. Schmitz. 2018. Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends in Microbiol* 26 (1). Elsevier Ltd: 70.
- Nair, P. N. R. 2006. "On the causes of persistent apical periodontitis-a review with color picture." *Int Endontic J* 39 (9): 249.
- Nakamura, N., H. C. Lin, C. S. McSweeney, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins. 2010. Mechanisms of microbial hydrogen disposal in the human colon and implications for health and disease. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1 (1): 363.
- Nelson, K. E, R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L Gwinn, R. J Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O Smith, J. C. Venter and C. M. Fraser. 1999. Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *thermotoga maritima*. *Nature* 399 (6734): 323.
- Nkamga, V. D., B. Henrissat and M. Drancourt. 2017. Archaea: essential inhabitants of the human digestive microbiota. *Human Microbiome Journal* 3 (2017). Elsevier Ltd: 1–8.
- Olsen, G. J., and C. Woese. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 7: 113–23.
- Relman, D., and S. Falkow. 2016. Diagnosis and management of infectious diseases. *Principles and practice of infectious diseases*. Eighth Edi. Elsevier Inc.
- Remely, M., S. Dworzak, B. Hippe, J. Zwielehner, E. Aumüller, H. Brath, and A.

- Haslberger. 2013. Abundance and diversity of microbiota in type 2 diabetes and obesity. *J Diabetes Metab* 4 (4): 1–8.
- Robertson, C. E., J. K. Harris, J. R. Spear, and N. R. Pace. 2005. Phylogenetic diversity and ecology of environmental archaea. *Curr Opin Microbiol* 8 (6): 638.
- Rocas, I., and Siqueira, J.F. 2011 a. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants : a molecular microbiology study. *J Endod* 37(2): 143–150.
- Rocas, I., and Siqueira J.F. 2011 b. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic. *J Endod* 37 (3): 3.
- Rocas, I., and Siqueira J. F. 2020. *Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*. 91.
- Rolph, H. J., A. Lennon, M. P. Riggio, W. P. Saunders, D. M. Kenzie, L. Coldero and J. Bagg. 2001. Molecular Identification of Microorganisms from Endodontic Infections. *J. Clin. Microbiol.* 39 (9): 3282.
- Ryan, K. 2011. *Sherris: Microbiología Médica 5a*. McGraw Hill Mexico.
- Siqueira, J. F., I. Rôças, J. Baumgartner and T. Xia. 2005. Searching for Archaea in infections of endodontic origin. *J Endod* 31 (10): 719.
- Siqueira, J. F. 2002. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 94 (3): 281.
- Slaton, K. P., M.D. Huffer, E. J. Wikle, J. Zhang, C. D. Morrow, S. C. Rhodes, and P. D. Eleazer. 2017. 16S ribosomal RNA gene sequencing to evaluate the effects of 6 commonly prescribed antibiotics. *J Endod* 43 (12):1984–1989.
- Slavkin, H. C. 1997. *Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek*. J. Am. Dent. Assoc 128 (4). Elsevier: 492–95.
- Socransky, S. S., R. J. Gibbons, A. C. Dale, L. Bortnick, E. Rosenthal, and J. B. Macdonald. 1963. The Microbiota of the gingival crevice area of man-I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch. Oral Biol.* 8 (3): 275.
- Sundqvist, G. 1976. *Bacteriological studies of necrotic dental pulps*. Umeå University

7 (7): 1–93.

Van de Pol, J., Van Best, N., Mbakwa, C., Thijs, C., Savelkoul, P., Arts, I., Hornef, M., Mommers, M. and Penders, J. 2017. Gut colonization by methanogenic archaea is associated with organic dairy consumption in children. *Front Microbiol* 8: 1–10.

Vianna, M. E., G. Conrads, B. Gomes, and H. P. Horz. 2007. Identification and quantification of Archaea. *J. Clin. Microbiol.* 44 (4). Citeseer: 1274–82.

Vickerman, M. M., K. A. Brossard, D. B. Funk, A. M. Jesionowski, and S. R. Gill. 2007. Phylogenetic analysis of bacterial and Archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J. Med. Microbiol.* 56 (1): 110–18.

Whittaker, R. H., and L. Margulis. 1978. Protist classification and the kingdoms of organisms. *BioSystems* 10 (1–2): 3–18.

World Medical Association. 2001. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bull World Health Organ* 79(4), 373.

Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis. 1991. Towards a natural system of 1organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (12): 4576.

Zhang, Y., X. Wang, H. Li, C. Ni, Z. Du, and F. Yan. 2018. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother* 99: 883.

Zheng, J. W. Zhou, N. Kaijun, X. Yanan and H. Xiaoli, 2019. Microbiome of Deep Dentinal Caries from Reversible Pulpitis to Irreversible Pulpitis. *J Endod* 45(3): 302–309.

XI. Anexos

Consentimiento informado

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de
Querétaro

Facultad de Medicina



Consentimiento informado para participar en un proyecto de investigación Biomédica

TÍTULO DEL PROYECTO: Presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares y su relación con diferentes diagnósticos

Investigador principal: Flor Del Rocío Vázquez Hernández alumna del segundo semestre de la especialidad en Endodoncia en la Facultad de Medicina de la UAQ

Sede donde se realizará el estudio: Clínica de Endodoncia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Nombre del paciente:

Se le invita a participar en este estudio de investigación biomédica. Antes de decidir si participan o no usted debe conocer y comprender cada uno de los siguientes aparados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Hoy en día no se ha demostrado claramente la presencia de *Archaeas* en infecciones endodónticas, siendo las *Archaeas* microorganismos con capacidad de vivir en ambientes extremos y de relacionarse con otras bacterias es importante investigar si están presentes en las infecciones y posteriormente saber cómo influyen en la enfermedad.

OBJETIVO DEL ESTUDIO



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de
Querétaro

Facultad de Medicina



Determinar si existen *Archaeas* en los conductos de las raíces dentales y saber si tiene relación con los síntomas de los pacientes y la enfermedad del paciente.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

No se sabe si existen *Archaeas* en los conductos de los dientes que tienen alguna enfermedad y si están asociadas con las molestias del paciente. La presente investigación ayudará a proporcionar información sobre el tema y poder determinar si intervienen en las enfermedades endodónticas.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Si reúne las condiciones para participar en este protocolo y de aceptar participar se le realizarán las siguientes pruebas y procedimientos:

- 1.- El diente se desinfectará antes de colocar el "plástico" que siempre se usa y después.
- 2.- Se lavará el diente con solución fisiológica antes de tomar la muestra.
- 3.- Se tomará la muestra cuando se hayan encontrado los conductos donde se encuentra el nervio.
- 4.- La muestra se obtendrá con el primer instrumento usado para medir su diente, este instrumento siempre se utiliza y en lugar de limpiarlo como normalmente se hace se limpiará en recipientes especiales para recolectar la muestra.
- 4.- Se continuará el procedimiento normal.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

No existen riesgos asociados al estudio ya que sólo se recolectará el material que se extraiga con un instrumento siempre usado en las endodoncias. Los riesgos asociados propiamente a la endodoncia se explican en el consentimiento informado del posgrado de endodoncia.

ACLARACIONES

- 1.-Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.



**Odontología
UAQ**



**Universidad Autónoma de
Querétaro**

Facultad de Medicina



- 2.- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación
- 3.- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no las razones de su decisión la cual será respetada en su integridad
- 4.- No tendrá que hacer gasto alguno derivado de este estudio, el financiamiento del mismo es por cuenta del investigador principal.
- 5.- No recibirá pago por su participación
- 6.- En el caso de que el paciente desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que esto efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- 7.- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- 8.- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con escrita confidencialidad por el grupo de investigadores.
- 9.- Usted también tiene acceso a las comisiones de investigación y de bioética de la Facultad de Medicina de la UAQ en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio a través de:

Dr. Rubén A. Domínguez Pérez

Integrante del área Odontológica del comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UAQ. Correo: dominguez.ra@uaq.mx

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la carta de consentimiento informado que forma parte de este documento.



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de
Querétaro

Facultad de Medicina



NUMERO DE FOLIO: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento

Firma del participante

Fecha: _____

Testigo 1. _____

Testigo 2. _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ La naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación y la de su hijo (a). He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y repuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y firma del investigador.

Flor Del Rocío Vázquez Hernández alumna del segundo semestre de la especialidad en Endodoncia en la Facultad de Medicina de la UAQ

Correo electrónico: florvazh@gmail.com

Fecha: _____



Odontología
UAQ



Universidad Autónoma de
Querétaro

Facultad de Medicina



Carta de revocación del consentimiento

Título del protocolo:

Presencia de *Archaeas* metanogénicas en conductos radiculares y su relación con diferentes diagnósticos

Investigador principal:

Flor Del Rocío Vázquez Hernández alumna del segundo semestre de la especialidad en Endodoncia en la Facultad de Medicina de la UAQ

Sede donde se realizará el estudio: Clínica de Endodoncia de la Facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Nombre del participante:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este proyecto de investigación por las siguientes razones (opcional):

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma del padreo o tutor: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Fecha: _____

c.c.p El paciente.