



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS DE
COBRE Y RUTENIO EN *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans

Tesis presentada por:
ALEXIS ALBERTO LARIOS CERVANTES

En opción al Diploma de Especialización en:
PERIODONCIA

Directores:
DR. VICTOR MANUEL MARTÍNEZ AGUILAR
DRA. ELDA GEORGINA CHÁVEZ CORTÉZ

Mérida, Yucatán, Julio 2020



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS DE
COBRE Y RUTENIO EN *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans

Tesis presentada por:
ALEXIS ALBERTO LARIOS CERVANTES

En opción al Diploma de Especialización en:
PERIODONCIA

Directores:
DR. VICTOR MANUEL MARTÍNEZ AGUILAR
DRA. ELDA GEORGINA CHÁVEZ CORTÉZ

Mérida, Yucatán, Julio 2020



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIDAD DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, 1 de Julio de 2020

C. ALEXIS ALBERTO LARIOS CERVANTES

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisoras, le informo que la Tesis titulada "**Determinación del efecto de compuestos de cobre y rutenio en *aggregatibacter actinomycetemcomitans***", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Diploma de la Especialización en Periodoncia, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.

Dr. José Ruben Herreña Atoche
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación

Dr. Víctor Manuel Martínez Aguilar
Director de Tesis

Dra. Elda Georgina Chávez Cortéz
Directora de Tesis

MINE. Bertha Arely Carrillo Ávila
Revisora

Dra. Samanta Azucena Melgar Rodríguez
Revisora

Anexo 78 del reglamento interno de
la Facultad de Odontología de la
Universidad Autónoma de Yucatán

Aunque una tesis hubiera servido para
el examen profesional y hubiera sido
aprobada por el sínodo, solo su autor o
autores son responsables de las
doctrinas en ella emitidas.

El presente trabajo de tesis se realizó en la Especialización en Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, el Laboratorio de Genética Molecular y Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, División Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Laboratorio de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México proyectos: DGAPA-UNAM: PAPIIT IT203618 y IN230020, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Martínez Aguilar y la Dra. Elda Georgina Chávez Cortéz. Los resultados de este estudio son propios del proyecto de investigación.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. ENFERMEDAD PERIODONTAL	3
2. MICROBIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL	4
2.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	4
3. AGENTES ANTIMICROBIANOS	5
3.1. Antibióticos	6
3.2. Antisépticos	6
4. COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS	7
4.1. Casiopeínas®	7
4.2. Rutenio	9
HIPÓTESIS	10
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
DISEÑO DEL ESTUDIO	13
VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	14
1. Preparación de Compuestos.	14
2. Ensayo de inhibición bacteriana.....	15
3. Ensayo de viabilidad celular.	16
ANÁLISIS DE DATOS	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIÓN	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS	33

GLOSARIO

- Sinergismo: resultado de la acción de dos o más sustancias que, actuando en conjunto, provocan una respuesta mayor a la suma de los efectos que provocarían por separado.
- Disbiosis: desbalance del equilibrio microbiano de la microbiota normal, debido a cambios cuantitativos o cualitativos de su composición.
- Patogenicidad: capacidad de un microorganismo para producir enfermedad en un huésped susceptible.
- Leucotoxina: citotoxina que causan degeneración y necrosis de los leucocitos.
- Lipopolisacárido: estimulante del sistema inmune, con un potente efecto tóxico.
- Colagenasa: metaloproteinasa de matriz que rompe los enlaces peptídicos de los colágenos.
- Bacteriostático: efecto que impide la proliferación bacteriana.
- Bactericida: efecto que produce la muerte a una bacteria.
- Citotoxicidad: capacidad de una célula para ser tóxica frente a otras que están alteradas.
- Genotoxicidad: capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos.
- Quelante: es un componente que forma complejos con iones de metales pesados.
- Apoptosis: muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento.
- Potencial redox: tendencia de las especies químicas en una reacción de reducción o de un electrodo en una celda galvánica a adquirir electrones.

ABREVIATURAS

- EP: Enfermedad Periodontal.
- PDB: Placa Dentobacteriana.
- LPS: Lipopolisacárido.
- LtxA: Leucotoxina A.
- ERO: Especie Reactiva de Oxígeno.
- Cu: Cobre.
- CasII-gly: Casiopeína II-gly.
- CasIII-ia: Casiopeína III-ia.
- RuN-6: Rutenio.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- DMEM: Medio Mínimo Esencial Modificado.
- SFB: Suero Fetal Bovino.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los compuestos de cobre-Casiopeínas®.	8
Figura 2. Estructura química de compuesto organometálico – Rutenio	9
Figura 3. Diagrama de preparación de compuestos.	15
Figura 4. Ensayo de inhibición bacteriana.	16
Figura 5. Cultivo de línea celular de osteoblastos.....	17

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal (EP) afecta al 11% de personas alrededor del mundo y es la segunda causa de morbilidad bucal, su prevalencia y gravedad se ven aumentadas con la edad (1,2). Recientemente las infecciones periodontales han sido relacionadas como factores de riesgo potenciales para enfermedades sistémicas.

La EP se caracteriza por la destrucción progresiva de las estructuras de soporte del diente, se origina principalmente en hospederos susceptibles y su manifestación clínica inicial está dada por la presencia de sangrado, edema, eritema y/o agrandamiento gingival.

En un estado de salud periodontal, la cavidad oral está colonizada por una flora comensal no patógena, la cual mantiene un estado de equilibrio entre los microorganismos presentes. Una vez que se ha perdido el equilibrio entre las diferentes especies bacterianas y las condiciones ambientales debido a factores como la dieta, la falta de higiene y condiciones propias del individuo, puede dar paso a una flora potencialmente patógena, la cual *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se perfila como microorganismo clave en la EP.

La nueva clasificación de las enfermedades periodontales asegura que el tratamiento electivo es la terapia mecánica inicial y eliminación de depósitos de cálculo mediante detartraje manual (raspado y alisado radicular) e instrumentos ultrasónicos, sin dejar de lado la importante función del cepillado dental.

Como parte del tratamiento de fase inicial, el uso de antisépticos y antibióticos ha sido ampliamente recomendado, sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos ha provocado la resistencia de microorganismos, haciendo que las dosis iniciales se vuelvan inefectivas.

Ante el incremento en la incidencia de la EP y la deficiencia en el tratamiento causado por falta de una higiene bucal efectiva en casa y la resistencia antibiótica, promueve la necesidad de buscar alternativas viables para el tratamiento de la EP. Por ello este estudio propone evaluar el efecto de los compuestos de cobre-Casiopéinas® y el

rutenio en microorganismos periodonto-patógenos buscando una respuesta favorable como facilitadores del abordaje terapéutico de la EP.

Debido a ello se estableció la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué efecto tienen los compuestos de cobre-Casiopeínas® y rutenio contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*?

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ENFERMEDAD PERIODONTAL

La EP es una patología que desencadena una respuesta inmune-inflamatoria crónica en el hospedero (3). Las principales características son: la pérdida de los tejidos de soporte del diente manifestándose a través de la pérdida de la inserción clínica, la pérdida de hueso alveolar, la presencia de bolsas periodontales y el sangrado gingival (4).

La gingivitis se identifica como el comienzo de la EP, está condicionada por la presencia de placa dentobacteriana (PDB) adyacente al surco gingival y por debajo del mismo, desencadenando una respuesta inflamatoria de los tejidos gingivales, limitándose a la encía libre y adherida, sin extenderse más allá de la unión mucogingival (5). Sin embargo, el tejido gingival puede presentar lesiones patológicas no inducidas propiamente por placa, indicando la manifestación de una afección sistémica (6).

La presencia de inflamación gingival es considerada un requisito previo necesario para el desarrollo posterior de la periodontitis. Es por ello que el tratamiento de la gingivitis va direccionado hacia una estrategia de prevención para evitar el desarrollo de la periodontitis (5). La periodontitis es una enfermedad inflamatoria, crónica, multifactorial y progresiva que está asociada principalmente al acúmulo excesivo de PDB propiciando la destrucción de los tejidos periodontales, razón por la cual esta enfermedad no es reversible (4).

Finalmente, la fisiopatología de la EP se ha direccionado a la activación de proteinasas derivadas del hospedero que ocasionan la degradación de las fibras del ligamento periodontal y por consiguiente la migración apical del epitelio de unión, dando paso a la propagación del biofilm subgingival a lo largo de la superficie radicular, provocando daño a los tejidos internos de soporte, como el hueso alveolar y el cemento radicular (7).

2. MICROBIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

En el paradigma actual, se cree que la EP es iniciada por comunidades microbianas sinérgicas y disbióticas, por lo cual la relación entre microorganismos permite aumentar su grado de patogenicidad y el rápido desarrollo de la enfermedad (8).

Desde 1998 estudios examinaron un amplio espectro de bacterias que se encontraban directamente relacionados con la EP. En particular *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está implícita como un marcador de riesgo, al igual que *Porphyromonas gingivalis* (8–10).

2.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria clave en la etiología de la periodontitis (11), puede colonizar la mucosa oral y trasladarse al margen gingival iniciando una respuesta inmunitaria que conduce a la degradación de los tejidos periodontales (12). Es un cocobacilo capnófilo Gram negativo que no produce esporas, no es hemolítico y forma colonias de aproximadamente 0,5-1,0mm de diámetro de forma circular, transparentes y de bordes irregulares (13). Elabora un número de factores de virulencia tales como leucotoxinas (Ltx), lipopolisacáridos (LPS) y colagenasas (14).

Se han identificado siete serotipos (a, b, c, d, e, f, y g) basados en las características estructurales del antígeno O de LPS, estos serotipos poseen diferencias en el potencial de virulencia. En particular, el serotipo b se ha asociado con periodontitis y con una alta producción de LtxA y al aumentar sus niveles de concentración, se produce una exacerbación de la EP (15).

A. actinomycetemcomitans es uno de los primeros colonizadores en superficies de dientes supragingivales en el desarrollo temprano de PDB, lo que sugiere que esta especie es capaz de colonizar una boca sana (11), su capacidad para invadir tejidos blandos hace que se pudiera requerir el uso de antibióticos sistémicos para el tratamiento (16).

Diversos estudios indican que aquellos individuos con sitios que albergan *A. actinomycetemcomitans* junto con *Filifactor alocis* probablemente desarrollen pérdida ósea; mientras que los sitios que sólo albergan *A. actinomycetemcomitans* son mucho menos propensos a desarrollarla, esto indicaría que la relación entre microorganismos favorece la proliferación del daño periodontal (17).

El tratamiento de la EP tiene como objetivo reducir la carga inflamatoria y bacteriana de la cavidad oral, evitando una mayor progresión de la enfermedad y la posterior pérdida de dientes. En la mayoría de los casos, este objetivo se puede lograr a través de una terapia inicial no quirúrgica dirigida tanto al control de infecciones como a la reducción de bolsas periodontales (18).

Dependiendo la severidad de la periodontitis (estadio y grado) las opciones de tratamiento se ven diversificadas, siendo la terapia mecánica (detartraje) la primordial para la eliminación del cálculo dental. Además, las terapias de fase I y fase II, que van desde tratamientos no quirúrgicos, como el raspado y alisado radicular, hasta tratamientos quirúrgicos como la cirugía resectiva y regenerativa, dependen del abordaje y los resultados que se deseen obtener (19).

3. AGENTES ANTIMICROBIANOS

A finales de la década de 1970, el reconocimiento del origen microbiano y la especificidad de las enfermedades periodontales, llevó a un interés en el uso de agentes antimicrobianos en la terapia periodontal, promoviendo una supresión selectiva del posible agente etiológico (20). La evidencia de estudios clínicos indica que el uso sistémico de amoxicilina en combinación con metronidazol mejora significativamente los resultados del tratamiento periodontal mecánico (21), sin embargo, un problema global actualmente suscitado es el desarrollo de la resistencia a antimicrobianos, que está directamente asociado con el consumo indiscriminado de los mismos (22).

3.1. Antibióticos

Durante los últimos 50 años, el aumento en el uso de antibióticos ha generado una presión selectiva sobre las bacterias susceptibles, lo que pudo haber favorecido la supervivencia de cepas resistentes (23), de las cuales algunas son resistentes a más de un antibiótico. Al reducir el uso excesivo e indiscriminado de antibióticos, se espera que las bacterias resistentes puedan ser reemplazadas por bacterias susceptibles (24).

Los antibióticos actúan sobre las bacterias patógenas, pero también sobre las comensales, seleccionando cepas resistentes y genes de resistencia. Esta resistencia puede presentarse como un proceso adaptativo no relacionado con la estructura de un antibiótico (25) o desarrollarse como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio horizontal de material genético de otras bacterias o fagos a través de mecanismos como: transducción, que consiste en la transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta bacterias); la transposición en la cual existe movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos o la conjugación, que consiste en el intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una hebra sexual o contacto físico entre ambas (26).

3.2. Antisépticos

El uso de antisépticos como el triclosán, yodopovidona y peróxido de hidrógeno son de gran ayuda para el control en la formación del biofilm. La clorhexidina, es el agente químico más usado, ya que previene la acumulación del biofilm, debido a su actividad bacteriostática y bactericida, su alta sustantividad y amplio espectro (27). Es considerada la sustancia antimicrobiana “Gold Estándar” y su mecanismo de acción se da cuando causa la ruptura de la pared celular bacteriana e inhibe su sistema enzimático (28).

La clorhexidina se adhiere a la superficie dentaria e interfiere en la adhesión bacteriana, e interactúa con las glucoproteínas salivales, lo que reduce la formación de la película salival, además, forma una unión irreversible con tejidos bucales y se libera con

lentitud. Sin embargo, las limitaciones del uso de este antiséptico están relacionadas con los efectos adversos, como reacción de hipersensibilidad, alteraciones en el sentido del gusto (salado y amargo, alteración que es reversible), tumefacción parotídea unilateral o bilateral, erosión de la mucosa y manchas en los dientes y lengua (29).

4. COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS

4.1. Casiopeínas®

Las casiopeínas® son una familia de compuestos químicos con un átomo central de cobre unido a ligantes orgánicos. Son una alternativa quimioterapéutica para los tratamientos contra el cáncer y se desarrollaron basándose en su fácil metabolismo, en comparación con otros iones metálicos utilizados en quimioterapia (30). Según estudios, algunas de ellas han demostrado actividad antineoplásica (31), antiproliferativa, citotóxica, genotóxica y de baja toxicidad para linfocitos y macrófagos (32).

Dentro de la química de coordinación, los compuestos organometálicos se caracterizan por poseer en su estructura un enlace carbono-metal, estos pueden ser vistos produciendo un efecto sinérgico entre un ligante y un metal de transición, formando un nuevo compuesto que puede mejorar la acción farmacológica frente a una enfermedad específica (33).

Son compuestos de cobre(II) de quelato mixto de la fórmula general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ ó $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$, donde N-N es una diimina aromática sustituida (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina), O-N es un péptido o aminoácido α -aminoácido y O-O es acetilacetato o salicilaldehído (Figura 1) (32,34).

Para realizar su estructura se consideraron diferentes aspectos químicos como la presencia de un metal esencial (para disminuir la toxicidad), la existencia de diiminas aromáticas tienen una afinidad alta por los quelatos de cobre, que favorecen la configuración cis alrededor del ión metal, dando a la molécula estructura y estabilidad, debido a su sistema de anillos aromáticos y ligantes secundarios con baja toxicidad y alta afinidad al cobre, como aminoácidos o acetilacetato (35).

El uso de compuestos organometálicos y proporciona varias ventajas con respecto a la forma y la estabilidad proporcionando una gran variedad de estados de oxidación para alcanzar diversos objetivos biológicos específicos (36), estos compuestos son capaces de inhibir la proliferación celular principalmente por vías apoptóticas, a través de mecanismos dependientes e independientes de la activación de las caspasas (37).

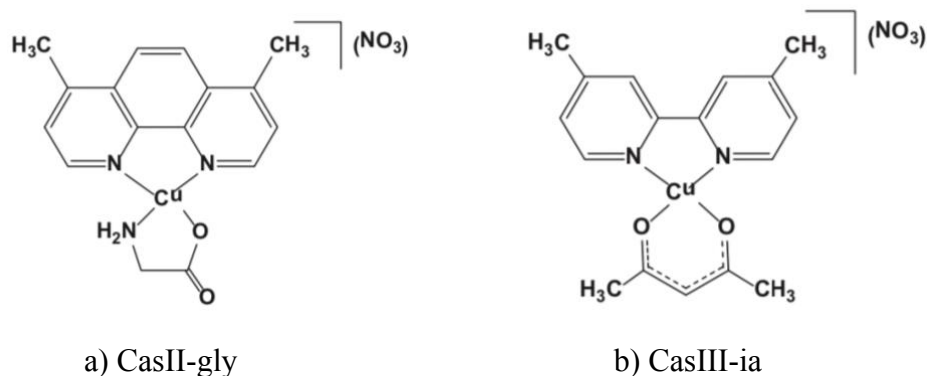


Figura 1. Estructura química de los compuestos de cobre-Casiopeínas®.
 a) CasII-gly [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)H₂O]NO₃.
 b) CasIII-ia [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetionato) H₂O]NO₃.

Los compuestos a base de cobre presentan una mayor efectividad clínica, reducen la toxicidad general y amplían el espectro de actividad antiproliferativa (38). Por ello, el cobre es un oligoelemento esencial importante para la función de varias enzimas involucradas en el metabolismo energético, la respiración y la síntesis de ADN en la célula (38).

La presencia del átomo cobre en la estructura de las Casiopeínas® sugiere que su principal modo de acción está relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (39,40), radicales hidroxilo y superóxido, induciendo la oxidación de moléculas (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos) a través de la reducción de Cu(II) a Cu(I) por reacciones de Fenton (41).

La interacción de estos radicales con el material genético provoca la oxidación de las bases, dando como resultado la ruptura del ADN, además de la toxicidad mitocondrial,

inhibición del proteasoma, daño a la membrana lipídica e inhibición de la fosforilación oxidativa (32,35,41).

4.2. Rutenio

Los compuestos de rutenio (RuN-6), son conocidos por sus propiedades favorables para el diseño de agentes antitumorales debido a su coordinación octaédrica, el cambio lento del ligante (Figura 2), el rango de diferentes estados de oxidación, especificidad y otras aplicaciones biológicas fotoactivadas (42,43). Han sido estudiados y caracterizados como posibles agentes antiparasitarios y antitumorales y el estado de oxidación RuN-6 es la forma activa para producir estos efectos (36).

RuN-6 pueden inducir la apoptosis de las células cancerosas al atacar las mitocondrias y causar la sobreproducción de ERO inhibiendo el crecimiento tumoral a través de múltiples eventos como la unión de transferrina/albumina, la inhibición de las transferasas S-glutación-S-, las cinasas y además de la intercalación de ADN (42).

El diseño de estos compuestos involucra la modulación del potencial redox a través de la modificación del ligante bidentado y la incorporación de anillos aromáticos en la estructura del ligante que proporciona la capacidad de interactuar con el ADN (43).

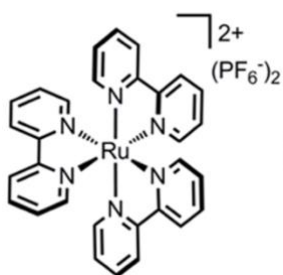


Figura 2. Estructura química de compuesto organometálico – Rutenio [Ru³⁺(2,9-Bis-(2',6'-diazahexanyl)-1,10- fenantrolina)] hexafluoruro

HIPÓTESIS

Los compuestos de cobre-Casiopéínas® y rutenio son efectivos contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* debido a sus propiedades fisico-químicas.

JUSTIFICACIÓN

La periodontitis es la enfermedad bucal crónica inflamatoria más común que se observa en la población. Puede conducir a la pérdida de los dientes afectando negativamente la función estética y masticatoria, siendo un factor importante de desigualdad social y determinante de la calidad de vida.

Un aspecto importante es la asociación que tiene con las enfermedades sistémicas como la diabetes, hipertensión, enfermedades cardíacas, renales, entre otras, desencadenando un impacto socioeconómico y alta demanda en los servicios de salud pública.

El uso de antibióticos para el tratamiento de la EP, además de ser favorable para el control de microorganismos periodontopatógenos ha generado una gran dependencia desmedida, llegando a ser utilizados de manera indiscriminada incluso sin ser prescritos por un profesional de la salud, volviéndose inefectivos ante la patología inicial.

Por ello, es importante el estudio de alternativas de tratamiento para la EP. Los compuestos de cobre y rutenio utilizados sobre los microorganismos asociados a la EP como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, prometen ser de gran utilidad, ya que en conjunto con la terapia de desbridamiento mecánico, el propio cuidado del paciente con las medidas de higiene oral previstas y la disminución de las comunidades microbianas patógenas podrían llevar a un estado de simbiosis oral, generando resultados satisfactorios, incluso en la terapia de mantenimiento.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de compuestos de cobre-Casiopeínas® (CasII-gly y CasIII-ia) y rutenio (RuN-6) contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el potencial citotóxico de compuestos de cobre-Casiopeínas® (CasII-gly y CasIII-ia) y rutenio (RuN-6) en concentraciones de 10, 30, 50 y 70mg/mL contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
2. Determinar la viabilidad celular de osteoblastos frente a Casiopeínas® (CasII- gly y CasIII-ia) y rutenio (RuN-6) en concentraciones de 10, 30, 50 y 70mg/mL.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, observacional, transversal.

VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Nombre de la variable	Tipo de variable	Indicador	Escala de medición	Objetivo a cumplir	Análisis estadístico
Casiopeína II-gly	Independiente	Absorbancia	Nominal	Objetivo general y específico 1	Analítica
Casiopeína III-ia	Independiente	Absorbancia	Nominal	Objetivo general y específico 1	Analítica
Rutenio (RuN-6)	Independiente	Absorbancia	Nominal	Objetivo general y específico 1	Analítica
Absorbancia	Dependiente	Absorbancia	Nominal	Objetivo general y específico 2	Analítica

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. Preparación de Compuestos.

Compuestos de cobre-Casiopeínas® y de rutenio:

- CasII-gly [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)H₂O]NO₃.
- CasIII-ia [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato) H₂O]NO₃.
- RuN-6 [Ru³⁺(2,9-Bis-(2',6'-diazahexanyl)-1,10- fenantrolina)] hexafluoruro.

Fueron sintetizados en la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México y preparados en 4 concentraciones mencionadas a continuación. Los compuestos de cobre han sido patentados y registrados con el título “Casiopeínas®” (SECOFI, 1992, 2002, 2012)

Para la preparación de los compuestos de cobre, se preparó una solución stock con 3mg de CasII-gly y CasIII-ia, respectivamente y se disolvieron en 1mL de H₂O. De esta solución se realizó disoluciones consecutivas para obtener las siguientes concentraciones 0.03mg/mL y 0.012mg/mL. A partir de esta solución stock se colocaron las cantidades previstas de la concentración de 10, 30, 50 y 70mg/mL de Casiopeína® (Figura 3).

3mg del compuesto RuN-6 se disolvieron en 1mL de DMSO. De esta solución se realizó disoluciones consecutivas para obtener las siguientes concentraciones 0.03mg/mL y 0.012mg/mL. A partir de esta solución stock se colocaron las cantidades previstas de la concentración de 10, 30, 50 y 70mg/mL de RuN-6.

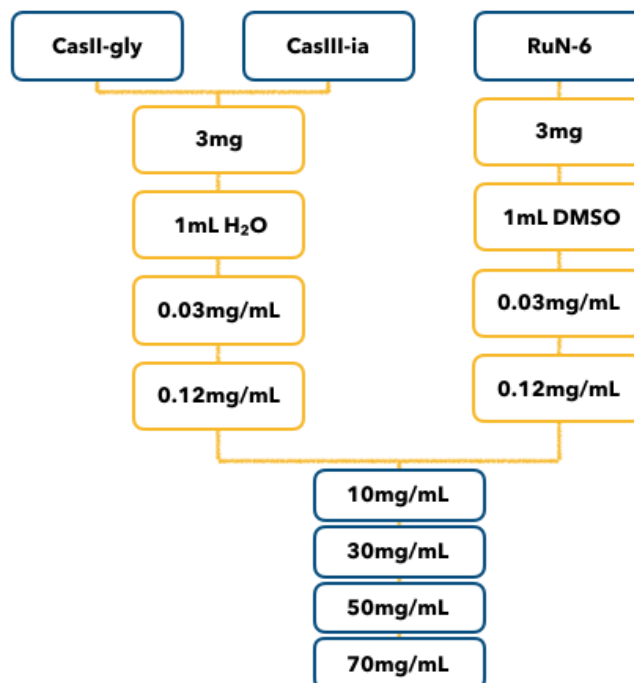


Figura 3. Diagrama de preparación de compuestos. 3mg de CasII-gly y CasIII-ia. 3 mg de RuN-6. Se obtienen concentraciones de 10, 30, 60 y 70mg/mL de cada compuesto.

2. Ensayo de inhibición bacteriana.

La cepa bacteriana utilizada en este estudio fue *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b (ATCC® 43718™). La cepa se obtuvo como cultivos liofilizados de la American Type Culture Collection (ATCC). Para los experimentos, el crecimiento de los cultivos puros de la cepa se cultivó en superficies de agar y se suspendió en tubos individuales con base de caldo de *Mycoplasma* enriquecido, complementado con 0,3µg/mL de menadiona (Sigma-Aldrich) y 5µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich) (Figura 4a). La densidad óptica (OD) de cada tubo se ajustó en un espectrofotómetro a 600nm, a fin de obtener 10⁹ UFC/mL de la cepa.

Posteriormente, se transfirieron de 150µl de la suspensión ajustada de la cepa bacteriana en microplacas de 96 pozos (Figura 4b), y se probaron las cuatro

concentraciones diferentes (10, 30, 50 y 70mg/mL) de los compuestos de cobre-Casiopeínas® (CasII-gly, CasIII-ia) y rutenio (RuN-6) contra cada cepa de *A. actinomycetemcomitans*, en un volumen total de 200µl (Figura 4c). El medio de cultivo se utilizó como control negativo y antibiótico Ciprofloxacino (200mg/100mL) como control positivo. La cepa bacteriana con cada uno de los compuestos de cobre y rutenio se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37 °C (80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂) utilizando agitación orbital a 160rpm durante 48. Finalmente, se midió la absorbancia de los pozos con un lector de UV-visible a una longitud de onda de 600nm.

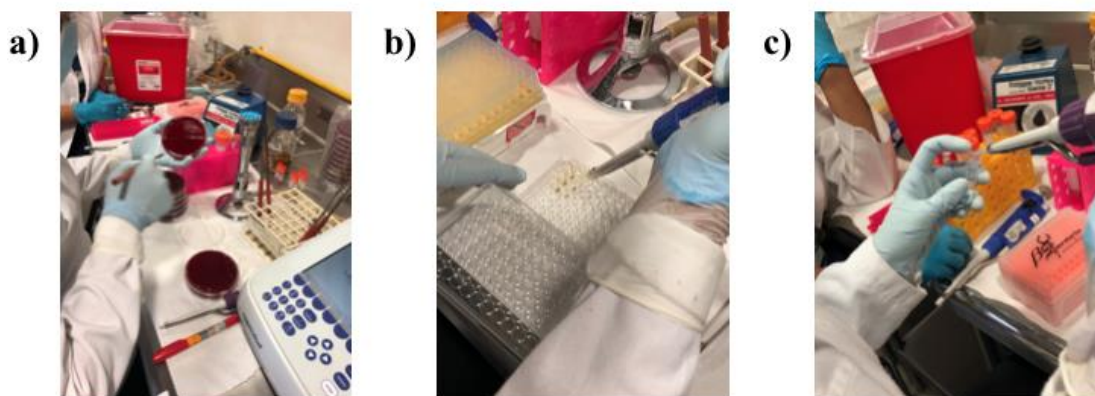


Figura 4. Ensayo de inhibición bacteriana.

a) Recolección de la cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. b) 150µL se transfirieron en placas para microtitulación. c) Aplicación de 50µL de CasII-gly, CasIII-ia y RuN-6, de cada concentración de 10, 30, 50 y 70 mg/mL

3. Ensayo de viabilidad celular.

Se realizó un cultivo de la línea celular de osteoblastos (ATCC® - CRL-11372, hFOB 1.19). Las células fueron cultivadas en medio mínimo esencial modificado de Dulbecco, (DMEM F-12) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico-antimicótico 1% y fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ (Figura 5a-b).

Se sembraron 5000 células por pozo en placas para microtitulación de 96 pozos en las que se colocaron por triplicado los tratamientos a las concentraciones previamente

establecidas (Figura 5c). Se utilizó como control positivo el antibiótico ciprofloxacino (200mg/100ml). Las placas fueron incubadas durante 24 hrs y mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Posteriormente por medio de ensayo de resazurin (Sigma-Aldrich Resazurin sodium salt powder, BioReagent, suitable for cell culture) se determinó la viabilidad celular. Para ello se colocaron 20µL de resazurin por pozo y se dejó actuar durante 4 hrs, la reacción redox en los ensayos basados en resazurin proporciona información sobre los procesos intercelulares y la actividad metabólica. En condiciones típicas del ensayo, el componente activo, la resazurina se reduce a resofurina. Este cambio químico, cambia las propiedades físicas del medio permitiendo la detección a través de la fluorescencia o la espectrofotometría y fue leído en un espectrofotómetro Chromate con una longitud de onda de 595nm.

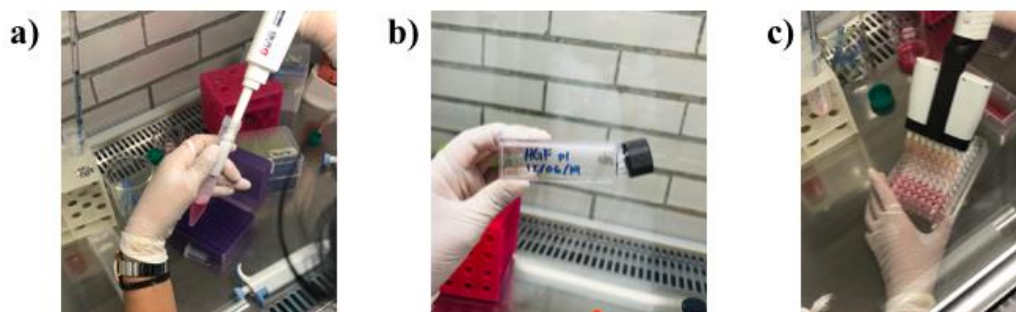


Figura 5. Cultivo de línea celular de osteoblastos.

- a) Cepa ATCC® - CRL-11372, hfOB 1.19. b) Se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. c) Se sembraron en placas para microtitulación 5000 células por pozo y se coloca tratamiento de CasII-gly, CasIII-ia y RuN-6, de cada concentración de 10, 30, 50 y 70mg/mL.

ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó un análisis estadístico no paramétrico con la prueba de Kruskal Wallis para el estudio e interpretación de las variables. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$

RESULTADOS

Los compuestos empleados en este trabajo fueron elegidos debido a que muestran actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares (31,32). La actividad antibacteriana de estos compuestos se determinó mediante la exposición *in vitro* contra la cepa bacteriana de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a los compuestos CasII-gly, CasIII-ia y RuN-6, a las concentraciones preestablecidas de 10, 30, 50 y 70mg/mL, durante 48hrs. En la gráfica 1 se muestran los resultados de inhibición, en los cuales, los 3 compuestos presentan una efectividad significativa en la inhibición de la proliferación de *A. actinomycetemcomitans*.

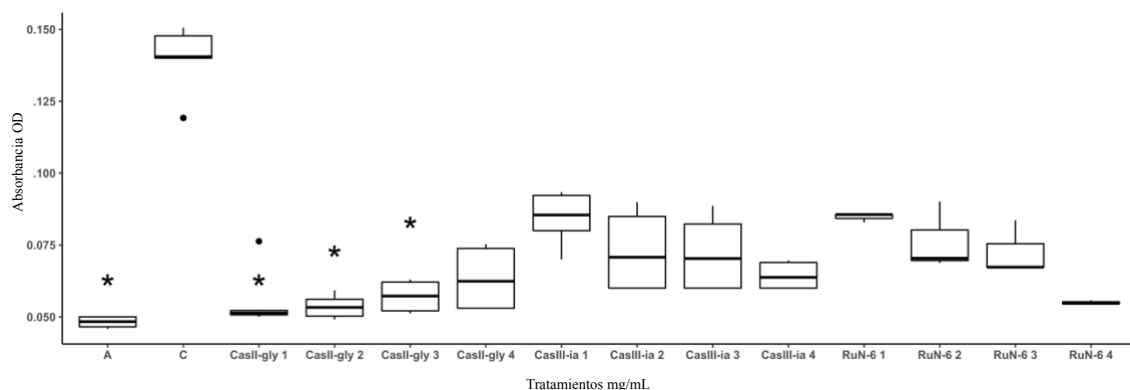
El control positivo (antibiótico-ciprofloxacino), presentó una lectura de 0.048OD correspondiente a un 66% de inhibición bacteriana y el control negativo (medio de cultivo) 0.14OD de crecimiento bacteriano.

Para los compuestos de cobre, la CasII-gly en sus concentraciones de 10 y 30mg/mL, mostraron resultados significativos obteniendo 60 y 62% de inhibición, respectivamente. Por otra parte, las concentraciones más altas (50 y 70mg/mL) tuvieron un menor efecto, con un total de 59% y 55%.

Los valores para CasIII-ia oscilaron entre el 40% y 54% de inhibición. En su concentración de 10 mg/mL se aprecia el menor efecto con un total de 0.084OD. Por lo cual en este compuesto, a mayor concentración, mayor es el efecto antimicrobiano, teniendo un 0.064OD (54%) en la concentración final de 70mg/mL.

El compuesto a base de rutenio (RuN-6) en su concentración más alta de 70mg/mL obtuvo porcentaje del 60%, teniendo un mayor efecto inhibitorio entre todas las concentraciones evaluadas. El RuN-6, en su concentración más baja de 10mg/mL, demostró el menor efecto antimicrobiano, con un (39%) presentando un menor porcentaje de inhibición en comparación a los otros compuestos estudiados.

Gráfica 1. Ensayo de inhibición contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* con CasII-gly, CasIII-ia y RuN-6.



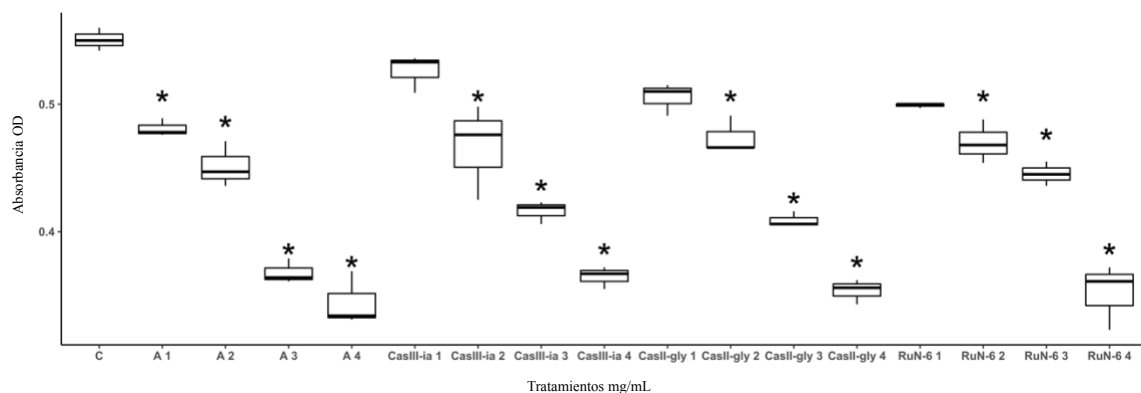
A: antibiótico; C: medio de cultivo; CasII-gly: Casiopeína II-gly; CasIII-ia: Casiopeína III-ia; RuN-6: rutenio; Concentraciones: CasII-gly/CasIII-ia (1) = 10mg/mL, CasII-gly/CasIII-ia (2) = 30mg/mL, CasII-gly/CasIII-ia (3) = 50mg/mL, CasII-gly/CasIII-ia (4) = 70mg/mL. RuN-6 (1) = 10mg/mL, RuN-6 (2) = 30mg/mL, RuN-6 (3) = 50mg/mL, RuN-6 (4) = 70mg/mL; * $p < 0.05$.

En el gráfico 2, se observó el ensayo de viabilidad celular que mostró resultados satisfactorios para las células osteoblásticas. Se evaluaron 4 concentraciones del antibiótico (Ciprofloxacino) a 10, 30, 50 y 70mg/mL. Los compuestos y el antibiótico se utilizaron en hFOB en cultivo celular *in vitro* para evaluar un posible efecto citotóxico. La viabilidad celular se vio establecida en un rango entre el 61% y 87% de las para las cuatro concentraciones del antibiótico estudiadas. A partir de esto, se observó la absorbancia de los compuestos evaluados, donde un porcentaje mayor al 80% representa un compuesto no citotóxico para células sanas del hFOB.

El compuesto de cobre, CasII-gly en su primera concentración, mostró una lectura de 0.51OD, correspondiente al 92% de viabilidad celular, seguido de en un 85%, 74% y 63% en el aumento de las concentraciones respectivamente. Por su parte, el compuesto CasIII-ia en su primera concentración mostró la viabilidad del 96% y la segunda concentración alrededor del 85%, siendo las únicas concentraciones que cumplían con los criterios de viabilidad mayor al 80%.

Las concentraciones del compuesto rutenio (RuN-6) reportaron una viabilidad que va desde el 90% en su concentración más baja (10mg/mL) hasta un 63% en su concentración más alta (70mg/mL). Estos resultados mostraron que el ciprofloxacino y el RuN-6 fueron más citotóxicos que los compuestos de cobre-Casiopeínas®.

Gráfica 2. Viabilidad de cultivo de células osteoblásticas a los compuestos CasII-gly, CasIII-ia y RuN-6 determinada por el ensayo de microtitulación de resazurin.



A: antibiótico; C: medio de cultivo; CasII-gly: Casiopeína II-gly; CasIII-ia: Casiopeína III-ia; RuN-6: rutenio; Concentraciones: CasII-gly/CasIII-ia (1) = 10mg/mL, CasII-gly/CasIII-ia (2) = 30mg/mL, CasII-gly/CasIII-ia (3) = 50mg/mL, CasII-gly/CasIII-ia (4) = 70mg/mL. RuN-6 (1) = 10mg/mL, RuN-6 (2) = 30mg/mL, RuN-6 (3) = 50mg/mL, RuN-6 (4) = 70mg/mL; * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue la evaluación de los compuestos de cobre-Casiopeínas® y rutenio (CasII-gly, CasIII-ia y RuN-6) contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Diversos autores demostraron la capacidad inhibitoria de estos compuestos principalmente en células cancerígenas, además de comprobar la citotoxicidad de los mismos para células sanas. Dado que se estima que el mecanismo de acción es a través de la sobre-producción de ERO (44), los resultados obtenidos en este estudio mostraron actividad inhibitoria en la bacteria antes mencionada.

Barbosa *et al.* realizaron un estudio para evaluar compuestos de cobre, Casiopeínas® (CasIII-ia, CasIII-Ea y CasII-gly) en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* susceptibles y resistentes al tratamiento establecido (isoniazida, rifampicina y etambutol) (45). Sus resultados muestran actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, además de presentar sinergismo con los tratamientos de segunda generación.

Marín-Hernández *et al.* comprobaron el efecto anti-neoplásico de la CasII-gly por medio de la disminución metabólica a través de la glicólisis y la foforilación oxidativa. Emplearon tumores malignos (sarcoma de colon humano, melanoma de cáncer de mama, carcinomas de mama, pulmón, ovario, cuello uterino). Sus resultados aluden a que CasII-gly en incubaciones de 60 minutos (1-100M) revelando que 100M era una concentración adecuada para inducir cambios en el flujo glicolítico y en las actividades de las enzimas glicolíticas sin alteraciones asociadas a la viabilidad celular, en experimentos a corto plazo (46). Al comparar estos resultados con los obtenidos en este estudio, el compuesto CasII-gly obtuvo las mejores propiedades antibacterianas de los 3 compuestos utilizados teniendo efectos a partir de su concentración de 10 mg/mL, sin embargo, a medida que la concentración aumentaba hasta (70mg/mL) el efecto inhibitorio disminuía. Podemos inferir que la actividad de las enzimas glicolíticas en el metabolismo celular se ve afectado en la presencia de distintas concentraciones del compuesto mencionado, sin embargo, el tiempo de exposición (no evaluado por minuto) pudo tener una influencia directa en su efecto inhibitorio.

Al aumentar la concentración, se observan diferentes mecanismos de actividad entre ambos compuestos de cobre, por una parte la CasII-gly presentaba un patrón de disminución en el efecto inhibitorio de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. CasIII-ia mostró el efecto contrario, ya que al aumentar la concentración, mayor es el efecto antimicrobiano, contrario a lo reportado por Miranda-Calderón *et al.* en donde la administración de CasIII-ia en altas concentraciones, producía un efecto deletéreo, el cual podía deberse a pH presente en el medio después de un periodo determinado acción (47).

En efecto, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* al ser un microorganismo capnófilo y uno de los patógenos clave en el desarrollo de la EP, mostró ser susceptible al tratamiento con CasII-gly y CasIII-ia, por ello podemos demostrar que dependiendo de la concentración y tiempo de acción del compuesto, la anaerobiosis no influye negativamente en su actividad (48).

Por otra parte, la viabilidad celular frente a los compuestos fue determinada, en donde diversos estudios afirman la baja citotoxicidad para células sanas como macrófagos y linfocitos (49). En esta investigación, el cultivo celular de osteoblastos reportó una viabilidad mayor al 80% frente a las concentraciones más bajas de los compuestos de cobre, donde se observó menor efecto citotóxico que el tratamiento antibiótico de elección. Rodríguez-Mercado *et al.* demostraron que pruebas experimentales en la relación entre el estrés oxidativo y el efecto CasII-gly, presentando una débil mutagenicidad (49).

El compuesto de rutenio (RuN-6) mostró mayor actividad inhibitoria a más alta concentración, además la actividad citotóxica de este compuesto tuvo una mayor actividad dosis-dependiente. Pal *et al.* y Deng *et al.* afirmaron que en el tratamiento anti-neoplásico posee menor actividad citotóxica que el tratamiento estándar (42,43) por lo tanto cual queda en evidencia que el uso de este compuesto contra microorganismos periodontopatógenos es apropiado.

El cobre y otros metales de transición poseen propiedades antimicrobianas (50,51). Vargas *et al.* demostraron que estos metales nanoparticulados pueden ser utilizados en enjuagues bucales como agentes antimicrobianos en el tratamiento de la gingivitis y para

patógenos de la periimplantitis (52), es por ello que con los resultados obtenidos en este estudio podemos fundamentar la utilización de estos compuestos como agentes antimicrobianos a nivel local, sin embargo, no se descarta su utilización en terapias de regeneración periodontal.

Actualmente, las necesidades regenerativas de los pacientes periodontales están en aumento debido a múltiples factores descritos anteriormente, sin embargo estos objetivos suelen verse afectados debido a la falta de materiales con mejoras en sus propiedades físico-químicas. La ingeniería de tejidos se ha centrado en aumentar las propiedades regenerativas de los materiales por medio de la utilización de agentes como proteínas, genes, factores de crecimiento, antibióticos y antiinflamatorias colocados en los andamios (membranas) (53).

Peilin Chen *et al.* desarrollaron un material de barrera de colágeno bioactivo para la regeneración ósea guiada que combina propiedades antibacterianas y antiinflamatorias debido a que contienen un recubrimiento de nanopartículas de plata (AgNP). Este estudio obtuvo resultados satisfactorios en el efecto antibacteriano contra el *Staphylococcus aureus* y el *Pseudomonas aeruginosa* y además, se puede observar una toxicidad limitada a nivel celular. Asimismo, se demostró efectos antiinflamatorios eficaces al reducir la expresión y la secreción de citoquinas inflamatorias como la IL-6 y el TNF- α . Estas membranas de colágeno recubiertas de AgNP pudieron inducir la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales que guían la regeneración ósea, por ello, se puede demostrar una potencial aplicación en las membranas de colágeno recubiertas de AgNP para prevenir la infección después de la introducción de un injerto óseo en la reconstrucción de la cresta alveolar (54).

Finalmente, los biomateriales vitrocerámicos se han utilizado en la reparación del tejido óseo durante más de 30 años, recientemente, estudios han centrado sus investigaciones en la modificación de la actividad osteogénica, además de introducir propiedades adicionales, como la actividad antimicrobiana. Fernandes J. *et al.* observaron que las modificaciones inorgánicas en los biomateriales de vidrio y vitrocerámica son eficaces en la actividad antimicrobiana, además de inducir un diseño estructural y la adición de iones específicos (Ag⁺, Cu⁺) que pueden conferir un carácter multifuncional a

estos sistemas, teniendo aspectos aceptables en la bioactividad y en la actividad bactericida
(55)

CONCLUSIÓN

Los compuestos de cobre-Casiopeínas (CasII-gly y CasIII-ia) y rutenio (RuN-6) poseen actividad inhibitoria contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, dependiente de la concentración y el tiempo de exposición de los mismos. Las condiciones de crecimiento y proliferación de los microorganismos presentes en la EP forman parte de un estudio complejo debido a la capacidad de adaptación al medio bucal y el sinergismo entre las especies bacterianas.

Diversos estudios sugieren el uso del cobre como agente antimicrobiano, por ello los resultados del presente estudio demuestran que el compuesto CasII-gly podría ser considerado con un posible agente antimicrobiano en la terapia periodontal, debido a su baja citotoxicidad y a la baja probabilidad de desarrollar resistencia microbiana. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo de acción y su interacción con otros microorganismos periodonto-patógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero Castro Norma Samantha, Paredes Solís Sergio, Legorreta Soberanis José RFS. Prevalencia de gingivitis y factores asociados en estudiantes de la Universidad Autónoma de Guerrero , México from the Autonomous University of Guerrero , Mexico. *Rev Cuba Estomatol.* 2016;53(2):9–16.
2. Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Clin Periodontol.* 2018;89(1):S140–58.
3. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):68–77.
4. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):162–70.
5. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque–induced gingival conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45(August 2017):S17–27.
6. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non–plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl(20):S28-S43.
7. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl(1):S159–72.
8. Aruni W, Chioma O, Fletcher HM. Filifactor alocis: The newly discovered kid on the block with special talents. *J Dent Res.* 2014;93(8):725–32.

9. Ammann TW, Gmür R, Thurnheer T. Advancement of the 10-species subgingival Zurich biofilm model by examining different nutritional conditions and defining the structure of the in vitro biofilms. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012;12(1):1. Available from: BMC Microbiology
10. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
11. Asikainen S, Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999;20:65–81.
12. Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol Oral Microbiol*. 2016;31(3):207–27.
13. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*. 1999;20:136–67.
14. López Pinedo M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in relation with aggressive periodontitis. *Rev Estomatológica Hered*. 2016;15(2):178.
15. Pietiäinen M, Kopra KAE, Vuorenkoski J, Salminen A, Paju S, Mäntylä P, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes associate with periodontal and coronary artery disease status. *J Clin Periodontol*. 2018;45(4):413–21.
16. Akrivopoulou C, Green IM, Donos N, Nair SP, Ready D. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype prevalence and antibiotic resistance in a UK population with periodontitis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;10:54–8.
17. Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrendiz J, Furgang D, et al. A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(9):2850–61.

18. Ramseier CA, Nydegger M, Walter C, Fischer G, Sculean A, Lang NP, et al. Time between recall visits and residual probing depths predict long-term stability in patients enrolled in supportive periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2019;46(2):218–30.
19. Dds CJS, Tracy SL, Abt E, Ms DDS, Dds BSM, John MT, et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc*. 2015;146(7):508-524.e5.
20. Feres M, Figueiredo LC, Soares GMS, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):131–86.
21. Sgolastra F, Severino M, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of metronidazole as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res*. 2014;49(1):10–9.
22. Alós J. Resistencia bacteriana a los antibióticos : una crisis global & Antibiotic resistance : A global crisis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(10):692–9.
23. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis*. 2014;14(13).
24. Eick S, Nydegger J, Bürgin W, Salvi GE, Sculean A, Ramseier C. Microbiological analysis and the outcomes of periodontal treatment with or without adjunctive systemic antibiotics—a retrospective study. *Clin Oral Investig*. 2018;22(9):3031–41.
25. Egorov AM, Ulyashova MM, Rubtsova MY. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. *Acta Naturae*. 2018;10(4):33–48.
26. Calderón G, Médico General R•. *Revista Medica De Costa Rica Y Centroamerica Lxxiii (621) 757-763*, 2016. *Infectología*. 2016;(621):757–63.
27. Menezes KM, Fernandes-Costa AN, Silva-Neto RD, Calderon PS, Gurgel BCV.

- Efficacy of 0.12% Chlorhexidine Gluconate for Non-Surgical Treatment of Peri-Implant Mucositis. *J Periodontol.* 2016;87(11):1305–13.
28. Cantarelli R, Negrini TC, Muniz FW, Oballe HJ, Arthur RA, Rösing CK. Antimicrobial potential and gustatory perception of chlorhexidine gluconate mouthwashes with or without alcohol after a single rinse – a randomized controlled crossover clinical trial. *Int J Dent Hyg.* 2017;15(4):280–6.
 29. Lang NP, Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 6th ed. Editoria Médica Panamericana; 2017.
 30. de Anda-Jáuregui G, Espinal-Enríquez J, Hur J, Alcalá-Corona SA, Ruiz-Azuara L, Hernández-Lemus E. Identification of Casiopeina II-gly secondary targets through a systems pharmacology approach. *Comput Biol Chem.* 2019;78:127–32.
 31. Alemón-Medina R, Breña-Valle M, Muñoz-Sánchez JL, Gracia-Mora MI, Ruiz-Azuara L. Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;60(2):219–28.
 32. Correia I, Borovic S, Cavaco I, Matos CP, Roy S, Santos HM, et al. Evaluation of the binding of four anti-tumor Casiopeínas® to human serum albumin. *J Inorg Biochem.* 2017;175:284–97.
 33. Contreras RR. Therapeutic potential of organometallic compounds in the cancer treatment. A short review. *NOVASINERGIA.* 2018;1(1):14–22.
 34. Becco L, Rodríguez A, Bravo ME, Prieto MJ, Ruiz-Azuara L, Garat B, et al. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *J Inorg Biochem.* 2012;109:49–56.
 35. Chavez-Gonzalez A, Centeno-Llanos S, Moreno-Lorenzana D, Sandoval-Esquivel MA, Aviles-Vazquez S, Bravo-Gomez ME, et al. Casiopeina III-Ea, a copper-containing small molecule, inhibits the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2017;52:8–19.
 36. Toledano-Magaña Y, García-Ramos JC, Torres-Gutiérrez C, Vázquez-Gasser C,

- Esquivel-Sánchez JM, Flores-Alamo M, et al. Water-Soluble Ruthenium (II) Chiral Heteroleptic Complexes with Amoebicidal in Vitro and in Vivo Activity. *J Med Chem.* 2017;60(3):899–912.
37. Valencia-Cruz AI, Uribe-Figueroa LI, Galindo-Murillo R, Baca-López K, Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, et al. Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS One.* 2013;8(1):654–64.
38. Davila-Manzanilla SG, Figueroa-de-Paz Y, Mejia C, Ruiz-Azuara L. Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin. *Eur J Med Chem.* 2017;129:266-274.
39. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1–85.
40. Galindo-Murillo R, Ruíz-Azuara L, Moreno-Esparza R, Cortés-Guzmán F. Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys Chem Chem Phys.* 2012;14(44):15539–46.
41. Jiménez VE, Pimentel E, Cruces MP, Amaya-Chávez A, Ruiz-Azuara L. Study on the relationship of genotoxic and oxidative potential of a new mixed chelate copper antitumoral drug, Casiopeina II-gly (Cas II-gly) in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016;48:86–293.
42. Pal M, Nandi U, Mukherjee D. Detailed account on activation mechanisms of ruthenium coordination complexes and their role as antineoplastic agents. *Eur J Med Chem.* 2018;150:419–45.
43. Deng Z, Gao P, Yu L, Ma B, You Y, Chan L, et al. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. *Biomaterials.* 2017;129:111–26.
44. Anda-j G De, Hur J, Alcal SA, Azuara LR, Hern E. Identification of Casiopeina II-gly secondary targets through a systems pharmacology approach. 2018;1–21.
45. Barbosa AR, Caleffi-Ferracioli KR, Leite CQF, García-Ramos JC, Toledano-

- Magaña Y, Ruiz-Azuara L, et al. Potential of Casiopeínas® Copper Complexes and Antituberculosis Drug Combination against Mycobacterium tuberculosis. *Chemotherapy*. 2016;61(5):249–55.
46. Juan AM, Sayra CG, Donato YLJ, Salud J, Isabel RLR, Marina MS, et al. Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase , glycolysis , and oxidative phosphorylation. *Arch Toxicol*. 2012;86(5):753–66.
47. Miranda-Calderón JE, Medina-Torres L, Tinoco-Mendez M, Moreno-Esparza R, Ruiz-Ramirez L. Characterization of physical interaction between Casiopeina III-ia and chitosan . Toward a Cas III-ia drug delivery system. *Carbohydr Res*. 2011;346(1):121–6.
48. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafil HS. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog*. 2017;113:303–11.
49. Rodríguez-mercado JJ, Florín-ramírez D, Álvarez-barrera L, Altamirano-lozano MA, José J, Florín-ramírez D, et al. In vitro DNA damage by Casiopeina II-gly in human blood cells. *Drug Chem Toxicol*. 2017;40(2):164–70.
50. Liao S, Zhang Y, Pan X, Zhu F, Jiang C, Cheng Z, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:1469–87.
51. McLean RJ, Hussain AA, Sayer M, Vincent PJ, Hughes DJ ST. Antibacterial activity of multilayer silver-copper surface films on catheter material. *Can J Microbiol*. 1993;39(9):895–9.
52. Vargas-reus MA, Memarzadeh K, Huang J, Ren GG, Allaker RP. International Journal of Antimicrobial Agents Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(2):135–9.
53. Dorati R, Detrizio A, Modena T, Conti B. Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy. *Pharm*. 2017;10(4):96.

54. Chen P, Wu Z, Leung A et al. Fabrication of a silver nanoparticle-coated collagen membrane with anti-bacterial and anti-inflammatory activities for guided bone regeneration. *Biomed Mater.* 2018;13(6):065014.
55. Fernandes JS, Gentile P, Pires RA, Reis RL, Hatton P V. Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue. *Acta Biomater.* 2017;59:2–11.

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de experimento.

