



EFFECTO *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE
COBRE Y RUTENIO CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Tesis presentada por:

C.D. RAMÓN HUEMAC MÁRQUEZ LIZÁRRAGA

En opción a diploma de especialización en

ENDODONCIA

Director (es):

DRA. MARÍA EUGENIA LÓPEZ VILLANUEVA

DRA. ELDA GEORGINA CHÁVEZ CORTÉZ

Mérida, Yucatán, Septiembre 2020



EFFECTO *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE
COBRE Y RUTENIO CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Tesis presentada por:

C.D. RAMÓN HUEMAC MÁRQUEZ LIZÁRRAGA

En opción a diploma de especialización en

ENDODONCIA

Director (es):

DRA. MARÍA EUGENIA LÓPEZ VILLANUEVA

DRA. ELDA GEORGINA CHÁVEZ CORTÉZ

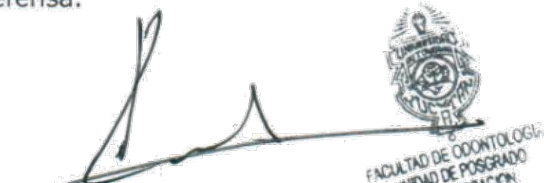
Mérida, Yucatán, Septiembre 2020



Mérida, Yucatán, 24 de septiembre de 2020

C. RAMÓN HUEMAC MÁRQUEZ LIZÁRRAGA

Con base en el dictamen emitido por sus Directoras y revisores, le informo que la Tesis titulada "**Efecto *in vitro* de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio contra *Enterococcus faecalis***", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Diploma de la Especialización en Endodoncia, 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 Rubén Herrera Atoche
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación




Dra. María Eugenia López Villanueva
Directora de Tesis


Dra. Elda Georgina Chávez Cortéz
Directora de Tesis


Dr. Marco Antonio Ramírez Salomón
Revisor


Dr. Víctor Manuel Martínez Aguilar
Revisor

Artículo 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.

Este trabajo se realizó en el posgrado de Endodoncia, Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán en convenio con el laboratorio de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio de Genética Molecular, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México y Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Elda Georgina Chávez Cortez y la Dra. María Eugenia López Villanueva. Los resultados presentados, son parte del proyecto de investigación “Efecto in vitro de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio contra *E. faecalis*” con registro de FODO 2017-0002 ante el SISTPROY y al bajo el fianancia de PRODEP con número de convenio UADY-EXB-214.

AGRADECIMIENTOS:

A veces la vida te pone en un sitio, a miles de kilómetros de distancia de tu hogar, alejado de tu familiares y amigos, con el fin de cumplir sueños y metas, metas que, sin el apoyo de mis padres, sus consejos, sabiduría y su confianza que depositaron en mi, no podría haberlo logrado. Muchísimas gracias por todo Mamá y Papá

Convivir con 11 personas de diferentes estados, costumbres, edades, distintas etapas de vida, pero con el mismo sueño, el ser especialistas, ha sido una de las mejores coincidencias que me ha dado la vida, agradezco mucho las risas, las pláticas, los consejos, los viajes, los buenos y malos momentos que pasé con mis compañeros, ahora amigos, me llevo en mi mente muy bonitos recuerdos, recuerdos que siempre guardaré en mi memoria y corazón.

La vida suele presentarte personas que se vuelven una inspiración a seguir escalando académicamente y a crecer como persona, agradezco a la Dra. Georgina Chávez por la invitación a realizar este proyecto, por todo lo que me ayudó durante la realización de este trabajo y presentarme a personas increíbles durante mi estancia en UNAM.

Cumplir una meta académica no sería posible sin las personas que están al tanto de tu desarrollo académico y profesional, personas que día a día se tomaron su tiempo de enseñarnos y guiarnos para formarnos como profesionales en endodoncia. Agradezco infinitamente al Dr. Marco Ramírez, al Dr. Gabriel Alvarado, Dra. Elma Vega y Dra. María Eugenia López, Dr. Rafael Hoyos, Dr. Víctor Novelo y Dr. Víctor Martínez por todo lo que hicieron por nuestros compañeros y por mi a lo largo del posgrado, sin duda, el ser EndoUady, ha sido una de las mejores cosas que me han pasado en la vida.

Mi estancia en Mérida no hubiera sido igual si no la hubiera conocido a ella, te agradezco todo el tiempo que pasamos juntos, me hiciste inmensamente feliz, no fue fácil culminar este proyecto, sin tu apoyo y cariño, esto no hubiera sido posible, gracias por todo, te quiero mucho.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi papá, mamá y hermana, gracias por todo lo que han hecho por mi

ÍNDICE

RESUMEN

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
PLANTEAMIENTO DE LAS HIPÓTESIS	15
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: representación de los pozos de microtitulación para ensayos de proliferación de <i>Enterococcus faecalis</i>	24
Tabla 2: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre los grupos de control negativo y positivo	26
Tabla 3: Prueba Dunn de comparaciones múltiples entre las concentraciones del compuesto CasIII-ia, v	29
Tabla 4: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre el grupo de Control <i>E. faecalis</i> vs compuesto CasIII-ia a cuatro concentraciones diferentes	29
Tabla 5: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre las concentraciones del grupo experimental CasII-gly	31
Tabla 6: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples del grupo de control negativo de <i>E. faecalis</i> vs Grupo experimental CasII-gly	32
Tabla 7: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre las concentraciones utilizadas en el grupo experimental RuN6	34
Tabla 8: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples de Osteoblastos sanos vs Grupos de control positivos	37

Tabla 9: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples del grupo experimental CasIII-ia de los ensayos de viabilidad celular	38
Tabla 10: Prueba Dunn de comparaciones múltiples de osteoblastos vs grupo de control experimental de CasII-gly	40
Tabla 11: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples de el grupo de control de osteoblastos vs grupo experimental de RuN6	41

RESUMEN

El objetivo principal de este proyecto es evaluar *in vitro* la eficacia de compuestos de coordinación cobre y de rutenio, a diferentes concentraciones contra *Enterococcus faecalis*, y evaluar su citotoxicidad en células de osteoblastos sanos. *Enterococcus faecalis* es el microorganismo más predominante en la infección persistente en dientes tratados endodónticamente, se ha descubierto que sobrevive en ambientes hostiles que prevalecen en los conductos radiculares de los dientes tratados endodónticamente. Los compuestos de coordinación de cobre (Casiopeinas®) son un nuevo grupo de medicamentos los cuales, se ha encontrado que tienen diferentes efectos sobre las células cancerosas, induciendo la apoptosis celular a través de especies reactivas de oxígeno. A su vez, los compuestos de rutenio (RuN6) son conocidos por sus propiedades favorables para el diseño de agentes antitumorales y antiparasitarios. La cepa bacteriana de *E. faecalis* (ATCC) se usó para verificar el efecto de los compuestos de coordinación de cobre (Casiopeinas®) y rutenio RuN6. Los Compuestos: CasIII-ia, CasII-Gly y RuN6 se evaluaron a diferentes concentraciones (1.2, 3, 10 y 30 µL/mL) junto con un grupo de control con antibióticos (ciprofloxacino) y un grupo de control de hipoclorito de sodio al 5,25%. La citotoxicidad de los compuestos se evaluó mediante ensayos de resazurin (Sigma-Aldrich Resazurin sodium salt powder, BioReagent, suitable for cell culture). Los compuestos se estudiaron en osteoblastos sanos, para descartar un posible efecto citotóxico. Los resultados mostraron que los compuestos de coordinación de cobre y rutenio tenían efectos de inhibición contra *E. faecalis* a diferentes concentraciones, el compuesto de coordinación CasII-gly en su concentración de 30 mg/mL fue el que presentó una inhibición similar al hipoclorito de sodio. En las pruebas de citotoxicidad en osteoblastos, todos los compuestos de coordinación tuvieron niveles bajos de citotoxicidad en comparación con el grupo de control negativo de hipoclorito de sodio. Conclusiones: Los compuestos de coordinación de cobre y rutenio, a diferentes concentraciones, exhibieron actividad inhibitoria contra *E. faecalis* con bajos niveles de citotoxicidad.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La terapia exitosa del conducto radicular depende del desbridamiento quimicomecánico completo del tejido pulpar, los restos de dentina y los microorganismos infecciosos. (1)

Los irrigantes son compuestos químicos que ayudan a la lubricación de los instrumentos mecánicos utilizados en el tratamiento de conductos, así como también tienen un efecto antimicrobiano y disolvente de tejido orgánico. Uno de los compuestos más utilizados es el hipoclorito de sodio. (2)

El hipoclorito de sodio es en la actualidad, uno de los irrigantes más utilizados, ya que tiene características que lo vuelven ideal durante el tratamiento endodóntico, sin embargo, una de sus desventajas es que tiene un efecto citotóxico cuando se extruye a los tejidos periapicales, causando irritaciones en ellos y provocando lesiones agudas, además (2), a bajas concentraciones es poco eficaz contra *E. faecalis* y no disuelve el tejido inorgánico que se puede presentar en el barro dentinario. (3)

E. faecalis, es una bacteria anaeróbica facultativa Gram positiva que se encuentra en la flora normal humana. En endodoncia, *E. faecalis* rara vez está presente en la periodontitis apical primaria y es dominante en el ecosistema microbiano de lesiones perirradiculares persistentes después del tratamiento de conducto radicular. (4)

Debido al alto porcentaje de persistencia del *E. faecalis* en dientes tratados endodónticamente, se propone a los compuestos de coordinación de cobre y rutenio como una alternativa endodóntica contra este microorganismo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es la efectividad de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio contra el *E. faecalis*?

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. QUÍMICA BIOINORGÁNICA

En los últimos años, la química bioinorgánica ha experimentado avances impresionantes, especialmente con respecto a la química medicinal. La versatilidad que brindan los compuestos de coordinación es el producto de la gran cantidad de geometrías que estos compuestos pueden adoptar y la modulación de sus propiedades fisicoquímicas que resulta de la modificación de la esfera de coordinación del metal. (5-6)

Se han realizado investigaciones en la química medicinal para desarrollar medicamentos basados en metales para el tratamiento de varias enfermedades, como el SIDA, el cáncer, el síndrome metabólico (hipertensión, diabetes, problemas cardiacos), las enfermedades tropicales desatendidas (por ejemplo, la enfermedad de Chagas, leishmaniasis, malaria, enfermedad del sueño y amebiasis) y enfermedades bacterianas, como la tuberculosis. (7-10)

Muchos elementos de transición, especialmente en la segunda y tercera fila de la tabla periódica de los elementos, se han utilizado en la producción de estos medicamentos. Sin embargo, las investigaciones recientes en esta área se han centrado en compuestos metálicos de iones esenciales, como el cobre. 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 (11).

Las funciones principales de los compuestos de cobre biológicamente activos implican reacciones redox, en las cuales el cobre reacciona directamente con oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno para producir radicales libres (es decir, especies reactivas de oxígeno), desplazar otros iones metálicos, participar en la peroxidación de lípidos y directamente escindir ADN y ARN. (12)

1.1 COBRE

Los metales son esenciales para muchos procesos fisiológicos en el cuerpo humano. Los metales biológicamente activos se denominan metales de traza, sin embargo, son más abundantes de lo que sugeriría el término. El cobre (Cu), en particular, participa en múltiples situaciones en el organismo. Los complejos de Cu se generan a través de la unión de Cu por un marco de estructura inorgánica. Han sido investigados por sus acciones biológicas únicas y tienen un gran potencial en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. (12)

El Cu es un metal traza esencial que existe en estados oxidados (Cu^{2+}) y reducidos (Cu^+) dentro del cuerpo. Esto hace que Cu sea un cofactor adecuado para una variedad de enzimas involucradas en muchos procesos biológicos; p.ej. metabolismo energético (citocromo c oxidasa) y actividad antioxidante (cobre zinc superóxido dismutasa, SOD1). El Cu también puede interactuar con el oxígeno molecular para producir especies reactivas de oxígeno (13)

2. CASIOPEÍNAS®:

Los complejos de Cu (II) llamados Casiopeínas® se encuentran entre una serie de compuestos mixtos de quelato de cobre (II). Que han sido patentados y registrados bajo el nombre de CASIOPEÍNAS®; se han diseñados en México y han demostrado tener ventajas en el tratamiento del cáncer, sobre todo por la disminución de los efectos secundarios presentes en modelos animales. (15)

Se desarrollaron basándose en la idea de que los compuestos de cobre se metabolizan más fácilmente que otros iones metálicos utilizados en la quimioterapia, lo que reduce el riesgo de citotoxicidad en células sanas y disminución de efectos secundarios. (16)

Su nombre proviene de la constelación Casiopea, formada por seis estrellas, ordenadas con el mismo arreglo central de estos compuestos, son un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) como centro metálico, que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacido (N-O) o donador (O-O). Algunos compuestos de esta familia se han evaluado en estudios *in vitro* e *in vivo* y se ha encontrado que poseen actividad citotóxica, genotóxica y antitumoral. De acuerdo a los resultados de un estudio de relación estructura-actividad (QSAR), se determinó que los isómeros geométricos casiopeína III-Ea (nitrato de acua, 4,7-dimetil-1,10- fenantrolina, acetilacetato cobre (II)) y casiopeína III-ia (nitrato de acua, 5,6-dimetil- 1, 10-fenantrolina, acetilacetato cobre (II)) son candidatos para continuar con las etapas de cernimiento para fármacos anticancerígenos. (18)

2.1 EFECTO DE LAS CASIOPEINAS®

Estos compuestos tienen un mecanismo de acción en células tumorales que implica la inducción de la apoptosis a través del daño del ADN, por medio de la activación de especies reactivas de oxígeno y la disfunción mitocondria. (17)

Inhibición del ciclo celular: el fármaco impide que las células malignas continúen con su ciclo de vida de la etapa del ciclo celular denominada G1 a la etapa S. Esta transición es mediada por el estrógeno en nuestro organismo. (19)

Reduce la migración celular: la casiopeína CasII-gly inhibió la migración celular descontrolada de las células cancerosas estudiadas. Esto es importante, pues la migración de células malignas puede dar lugar a la metástasis o invasión de tejidos sanos. (19)

Efecto en daño y protección hepática: uno de los efectos adversos más perjudiciales de la quimioterapia es su efecto tóxico en el hígado. Incluso hay ocasiones que el daño al hígado ocasionado por los medicamentos de la quimioterapia es más peligroso que el tumor en sí. Con el fármaco CasII-gly se obtuvieron resultados alentadores, pues los mecanismos de protección al hígado se vieron activados mientras que los de daño hepático se encontraron disminuídos. (19)

También se encontraron evidencias de que este fármaco podría activar la respuesta inmune general del organismo y los mecanismos de reparación de las células dañadas. (19)

2.2 CASII-GLY

Los compuestos de coordinación de cobre, Casiopeína® II-gly (CasII-gly), se sintetizaron comenzando con una solución equimolar de nitrato de cobre (II) mezclado con la diimina sustituida correspondiente (en este caso, glicina), seguido de la adición de un NO donante previamente desprotonado (Fig. 1). (20)

El complejo cobre-fenantrolina Casiopeína® CasII-gly está actualmente bajo investigación como un posible nuevo fármaco contra el cáncer. Cas-IIgly es de 10 a 100 veces más activo que el cisplatino en modelos de células de cultivo y tiene buenos índices terapéuticos en modelos de tumores animales. El cisplatino es un agente alquilante de ADN y Cas-IIgly es un agente de intercalación de ADN, pero ambos ejercen efectos prooxidantes en la célula y se han asociado con disfunción mitocondrial y muerte celular programada dependiente e independiente de caspasa. (21)

CasII-gly activa moléculas que participan en los procesos de estrés oxidativo y reduce la viabilidad celular por la vía apoptótica intrínseca. CasII-gly en líneas celulares HeLa, se ha observado inhibición de la fase de transición G1/ S, disminución del proceso de transformación celular y disminución de la migración celular. Al mismo tiempo, CasII-gly inhibe la proliferación celular, la migración celular, la transformación de las células, así como la progresión del ciclo celular en las líneas celulares HeLa. Además, promueve el sistema de reparación del hígado, así como la activación de moléculas relacionadas con la disminución del daño hepático. Cas II-gly promueve la apoptosis y las respuestas de señalización de iones metálicos. (21)

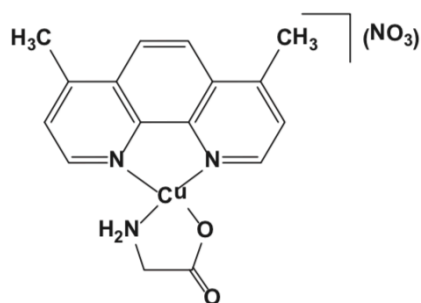


Fig 1: Cas II gly

2.3 CASIII-IA

Casiopeína III-ia (Fig. 2) es uno de los compuestos más estudiados. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la deshidrogenasa de acetoglutarato y la liberación de citocromo c, que puede comprometer los procesos dependientes de la energía, como como duplicación celular. (22)

Además, la presencia de Cu + 2 en el centro de casiopeínas puede estar asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la reacción de Fenton. (23)

Cas III-ia tienen una actividad anticancerígena en un entorno prooxidante fuerte seguido de la apoptosis mitocondrial. Las actividades citotóxicas notables, además de la inducción de la vía apoptótica intrínseca en tiempos de exposición muy cortos, promueven considerar a las casiopeínas como buenos candidatos para estudios posteriores en sistemas tumorales difíciles de tratar. (23)

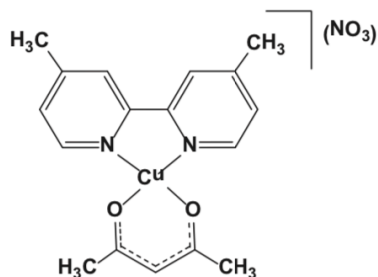


Fig.2 compuesto CasIII-ia

3 RUTENIO

La química orgánica del rutenio ha sido una de las áreas de investigación de mayor crecimiento en las últimas décadas. Se ha realizado un esfuerzo considerable hacia el diseño y la aplicación de una amplia serie de complejos de rutenio. (24)

Las tendencias recientes en la química del complejo de rutenio, subrayando su creciente importancia en el desarrollo de medicamentos contra el cáncer y aplicaciones en catálisis, polímeros, ciencia de materiales y nanotecnología. (25)

Como la mayoría de los complejos de rutenio son menos tóxicos que sus contrapartes de platino, este progreso ofrece un valor agregado considerable para la implementación médica. Aunque hasta ahora ninguno de los complejos de rutenio está en uso clínico como medicamentos contra el cáncer; Abundantes informes sobre la actividad mejorada *in vitro* e *in vivo* de otros tipos de complejos de rutenio, llevaron a los quimioterapéuticos a base de rutenio a convertirse rápidamente en un área importante en el avance del medicamento contra el cáncer. (26)

3.1 RUTENIO RuN6

Los compuestos de Rutenio (RuN6) (fig.3), son conocidos por sus propiedades favorables para el diseño de agentes antitumorales, debido a la geometría su coordinación octaédrica, el cambio lento del ligando, el rango de diferentes estados de oxidación, especificidad y atractivas aplicaciones biológicas fotoactivadas. Han sido estudiados y caracterizados como posibles agentes antiparasitarios y antitumorales, se cree que el estado de oxidación RuN6 es la forma activa para producir estos efectos. RuN6 pueden inducir la apoptosis de las células cancerosas al atacar las mitocondrias y causar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), inhibiendo el crecimiento tumoral a través de múltiples eventos como la unión de transferrina/albúmina, la inhibición de las transferasas S-glutati6n-S- y las cinasas, además de la intercalaci6n de ADN. (24)

El diseño de estos compuestos involucra la modulación del potencial redox a través de la modificación del ligando bidentado y la incorporación de anillos aromáticos en la estructura del ligando que proporciona la capacidad de interactuar con el ADN. (25)

3.2 EFECTOS DEL RUTENIO RUN6

Los compuestos derivados del rutenio inhiben el crecimiento celular *in vitro*, capaces de inducir una detención del ciclo celular en G1 y una fragmentación del ADN, que es característica de la apoptosis, la cual inducen apoptosis en varias líneas celulares tumorales, Así mismo, regulan y activan las proteínas p53 y p73. (26)

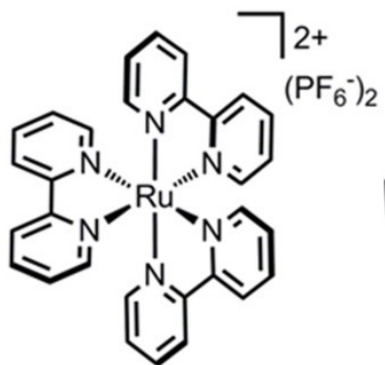


Figura 3: compuesto de coordinación RuN6

4. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Especies reactivas de oxígeno (ERO) es un término colectivo que describe las especies químicas que se forman con la reducción incompleta de oxígeno e incluye el anión superóxido (O⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (HO•). (27)

Se cree que las ERO median la toxicidad del oxígeno debido a su mayor reactividad química con respecto al oxígeno. También operan como moléculas de señalización intracelular, una función que ha sido ampliamente documentada pero que aún es controvertida. Este escepticismo surge de la aparente paradoja entre la especificidad que se requiere para la señalización y la naturaleza reactiva de ERO que los hace oxidantes indiscriminados y potencialmente letales. (Fig.4) (28)

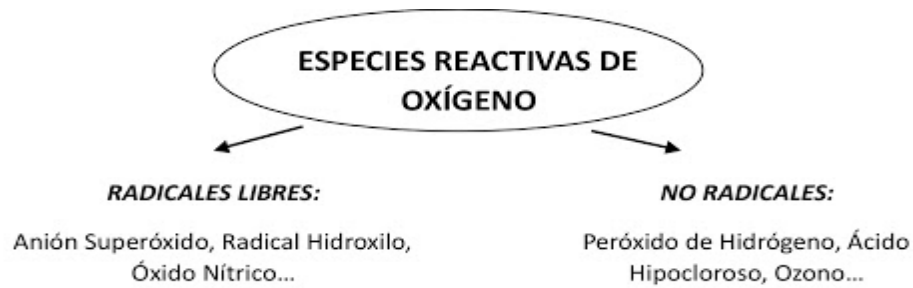


Figura 4: Especies Reactivas de oxígeno (ERO)

La especificidad en la señalización se logra a través de la unión no covalente de un ligando a su receptor afin en virtud de la complementariedad de las formas macromoleculares. Por el contrario, ERO opera en la señalización a través de reacciones químicas con átomos específicos de proteínas diana que conducen a modificaciones de proteínas covalentes. (28)

Es importante destacar que incluso un pequeño aumento en la producción de ERO puede tener consecuencias perjudiciales porque las bacterias poseen los mecanismos defensivos suficientes para protegerse contra las ERO producidas endógenamente. Por lo tanto, puede ser posible aumentar el potencial citotóxico de los fármacos antimicrobianos y anticancerosos al aumentar la producción de ERO o al inhibir los sistemas antioxidantes celulares. (29)

5. MEDICACIÓN EN ENDODONCIA

La irrigación, según Basrani, se define como "lavar una cavidad corporal o una herida con agua o un líquido medicado" y la aspiración como "el proceso de eliminar líquidos o gases del cuerpo con un dispositivo de succión". El desinfectante, por su parte, se define como "un agente que destruye o inhibe la actividad de los microorganismos que causan enfermedades". (30)

Los objetivos de la irrigación en endodoncia son mecánicos, químicos y biológicos. Los objetivos mecánicos y químicos: eliminar los residuos, lubricar el conducto, disolver el tejido orgánico e inorgánico, y prevenir la formación de una capa de

frotis durante la instrumentación o disolverla una vez que se haya formado. La función biológica de los irrigantes está relacionada con su efecto antimicrobiano, más específicamente: tienen una elevada eficacia contra los microorganismos anaeróbicos y facultativos en su estado planctónico y en las biopelículas, capacidad de inactivar endotoxinas. (31)

5.1 HIPOCLORITO DE SODIO

El hipoclorito de sodio es un compuesto químico con la fórmula NaOCl. La solución de hipoclorito de sodio, comúnmente conocida como blanqueador, se utiliza frecuentemente como desinfectante o agente blanqueador. Es el medicamento de elección durante los tratamientos de conducto debido a su eficacia contra los organismos patógenos y la disolución de la pulpa (32-33)

Cuando NaOCl entra en contacto con las proteínas del tejido, en poco tiempo se forman nitrógeno, formaldehído y acetaldehído. Los enlaces peptídicos se rompen para disolver las proteínas. Durante este proceso, el hidrógeno en los grupos imino (-NH-) se reemplaza por cloraminas formadoras de cloro (-N.Cl-), que desempeña un papel importante para la efectividad antimicrobiana. Por lo tanto, el tejido necrótico y el pus se disuelven y el agente antimicrobiano puede alcanzar y limpiar mejor las áreas infectadas. Además de su aplicación como irritante del conducto radicular, el NaOCl se usa comúnmente para desproteinizar tejidos duros para aplicaciones biomédicas. Estrela *et. al.*(6) informaron que el hipoclorito de sodio exhibe un equilibrio dinámico ya que actúa como un disolvente orgánico y graso que degrada los ácidos grasos y los transforma en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (alcohol), y así reduce la tensión superficial de la solución restante (reacción de saponificación). (32)

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que NaOCl en concentraciones más altas es más efectivo contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* (33). En contraste, los estudios clínicos han indicado que las concentraciones bajas y altas son igualmente efectivas para reducir las bacterias del sistema de conducto radicular. (34).

Este compuesto disuelve la materia orgánica y tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Por lo tanto, el hipoclorito de sodio elimina eficazmente los microbios de los conductos radiculares y también mata las bacterias dentro de los túbulos dentinarios abiertos. Aunque el hipoclorito de sodio exhibe citotoxicidad, es controvertido si reduce o no la capacidad de recuperación del tejido sobreviviente. (36,37)

NaOCl en concentraciones más altas tiene una mejor capacidad de disolución de tejido (11), pero incluso en concentraciones más bajas cuando se usa en grandes volúmenes puede ser igualmente efectivo. Las concentraciones más altas de NaOCl son más tóxicas que las concentraciones más bajas. (38)

5.2 CITOXICIDAD DEL HIPOCLORITO DE SODIO

El hipoclorito de sodio es un agente oxidante no específico y los productos de las reacciones de oxidación son corrosivos. Las soluciones queman la piel y causan daño a los ojos, particularmente cuando se usan en formas concentradas. Sin embargo, como lo reconoce la NFPA, solo las soluciones que contienen más del 40% de hipoclorito de sodio en peso se consideran oxidantes peligrosos. Las soluciones de menos del 40% se clasifican como un riesgo de oxidación moderado (NFPA 430, 2000). Los efectos tóxicos de NaOCl en tejidos vitales incluyen hemólisis, ulceración epitelial y necrosis. (39)

La extrusión de NaOCl durante la terapia del conducto radicular se conoce comúnmente como "accidente de hipoclorito"; causa síntomas agudos inmediatos y secuelas potencialmente graves. (40)

La frecuencia de tales eventos sigue siendo desconocida porque no se informa sistemáticamente a las compañías de seguros y no puede diagnosticarse retrospectivamente. Teniendo en cuenta los millones de ECA realizados en todo el mundo, se cree que es un hecho relativamente raro. Sin embargo, 1 estudio mostró que casi la mitad de los practicantes de endodoncia describieron la ocurrencia de al menos un accidente de NaOCl en su carrera. (41)

Una revisión de la literatura sobre la extrusión involuntaria de NaOCl más allá del agujero apical encontró síntomas similares, independientemente de la concentración, con respuestas tisulares proporcionales al volumen de NaOCl extruido. Los síntomas principales cuando se inyecta NaOCl en los tejidos periapicales y perirradiculares son dolor intenso inmediato; edema inmediato de tejidos blandos vecinos; posible extensión del edema sobre el lado lesionado de la cara, el labio superior o la región infraorbitaria; sangrado profuso del conducto radicular; sangrado intersticial profuso con hemorragia de la piel y la mucosa (equimosis); sabor a cloro o irritación de la garganta después de la inyección en el seno maxilar; infección secundaria anestesia reversible y parestesia. (42)

6 MICROORGANISMOS EN LA INFECCIÓN PERSISTENTE EN ENDODONCIA

Las bacterias han sido reconocidas durante mucho tiempo como el principal factor etiológico en el desarrollo de pulpa y lesiones periapicales (43)

En estudios previos han demostrado que la flora microbiana en los conductos después del fracaso de la terapia endodóntica difiere notablemente de la flora en los dientes no tratados. La infección al momento de la obturación de los conductos y el tamaño de la lesión periapical son factores que puede influenciar el pronóstico, *Enterococcus faecalis* ha sido aislado del 38% en dientes con tratamiento de conductos. (44)

En otro estudio, Pinhero *et. al.* demostraron que la la flora microbiana en los conductos después del fracaso del tratamiento del conducto radicular se limitó a un pequeño número de especies microbianas predominantemente Gram positivas. Los anaerobios facultativos, especialmente *E. faecalis*, fueron los microorganismos más comúnmente aislados, sin embargo, las infecciones polimicrobianas y los anaerobios obligados se encontraron con frecuencia en los conductos de dientes sintomáticos con tratamiento endodóntico. (45)

6.1 ENTEROCOCCUS FAECALIS

Los *Enterococcus* son parte de la flora humana normal y generalmente se encuentran en concentraciones relativamente pequeñas en la boca. Son las especies aisladas con mayor frecuencia en los dientes con infección persistente después del tratamiento del conducto radicular. Se ha demostrado que *Enterococcus faecalis* está presente en 30 a 48% de los dientes con infección posterior al tratamiento. (46)

E. faecalis sobrevive a los procedimientos de tratamiento endodóntico al resistir altas concentraciones de medicamentos intraconductos y amplias variaciones en el pH. (47)

La capacidad de las células de *E. faecalis* para causar enfermedad periapical y falla crónica de un diente tratado endodónticamente puede deberse a su capacidad de invadir los túbulos dentinarios y permanecer viable dentro del túbulo. Los resultados del presente estudio demuestran que las células de *E. faecalis* siguen siendo viables y mantienen la capacidad de invadir los túbulos dentinarios y adherirse al colágeno en presencia de suero humano. Este mecanismo puede explicar por qué las células de *E. faecalis* dentro de los túbulos dentinarios radiculares actúan como un patógeno en dientes con tratamiento endodóntico fallido. (48)

Además, Molander *et. al.* (1998) examinaron el estado microbiológico de los dientes obturados con periodontitis apical y encontraron que los anaerobios facultativos predominaban, siendo los entero cocos el grupo más frecuentemente aislado. Hancock y otros (2001) examinaron los dientes obturados con radiolucidencias periapicales persistentes, y encontraron que además de *Enterococcus*, otros géneros que predominan, a saber, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* y *Streptococcus*, predominaron. Además, se ha aislado *Enterococcus* del 47% de los conductos radiculares en los que el tratamiento había fallado (Pinheiro *et al.* 2003). (49)

E. faecalis generalmente ingresa al canal durante el tratamiento. Cuando *E. faecalis* está presente en cantidades bajas inicialmente, generalmente puede eliminarse; sin embargo, una vez establecido en el sistema de conducto radicular, es un organismo difícil de erradicar. (50)

Estos microorganismos parecen tener la capacidad de aprovechar las oportunidades creadas por la eliminación de otros microbios y también tienen la capacidad de crecer en el ambiente de bajo contenido de nutrientes del conducto tratado. En general, los anaerobios facultativos son menos susceptibles a las medidas antimicrobianas que los anaerobios, por lo tanto, tienen más probabilidades de sobrevivir al tratamiento de conducto radicular a menos que los procedimientos de limpieza y modelado sean del más alto nivel. La resistencia al tratamiento de entero cocos en el conducto radicular ha sido reconocida desde hace mucho tiempo (Moller 1966). Significativamente, el hidróxido de calcio ha demostrado ser ineficaz para matar *E. faecalis* en los conductos radiculares (Haapasalo & Orstavik 1987, Reit & Dahlen 1988) y esto es predecible porque este microorganismo es capaz de crecer a un pH alto. (51,52)

Los estudios también han revelado que el apósito de hidróxido de calcio es ineficaz contra los *Enterococcus*. Por lo tanto, parece que el aislamiento frecuente de *Enterococcus* en casos endodónticos fallidos pone en tela de juicio el uso rutinario de hidróxido de calcio como medicamento intraconducto. (53)

Las razones por las que *E. Faecalis* y otros microorganismos deberían estar asociados con la infección persistente no se comprenden bien. Sin embargo, se sabe que *E. Faecalis* es una especie resistente ya que puede soportar ciertos agentes químicos, incluyendo algunos antibióticos, que serían altamente tóxicos para otros organismos. Su persistencia en la infección endodóntica podría verse favorecida por una mayor resistencia al hipoclorito de sodio. (54)

HIPÓTESIS:

La farmacología basada en metales ha crecido potencialmente como tratamientos alternos contra distintas enfermedades, los compuestos de coordinación de cobre y rutenio han demostrado su potencial como agentes antitumorales y antiparasitarios, además, estudios previos han rectificado a estos compuestos como posibles agentes antimicrobianos contra distintos organismos, por lo tanto, los compuestos de coordinación de cobre y rutenio tendrán un efecto inhibitorio contra *E. faecalis*.

JUSTIFICACIÓN

La literatura nos reporta que *Enterococcus faecalis* es el microorganismo con más presencia en la infección endodóntica persistente, *E.faecalis* sobrevive a los procedimientos de tratamiento endodóntico al resistir altas concentraciones de medicamentos intraconductos y amplias variaciones en el pH.

En la actualidad existen diversos medicamentos endodónticos que inhiben este microorganismo, sin embargo, estos presentan ventajas y desventajas al momento de ser utilizados, el hipoclorito de sodio, irrigante estándar en endodoncia, presenta la desventaja de ser altamente citotóxico al ser extruido más allá del foramen apical.

La endodoncia especializada se ha encargado de buscar diferentes alternativas contra este microorganismo.

Los metales en distintas áreas de la medicina han demostrado en estudios previos ser una alternativa viable en distintas situaciones, teniendo la capacidad de actuar como agentes antitumorales, antibacterianos, antiparasitarias, entre otros.

Los compuestos de coordinación de cobre y de rutenio por su capacidad que han demostrado, ser un fármaco potencial como agente microbiano, haciendo de estos de estos una alternativa viable como medicamento endodóntico (16)

Los resultados de este estudio, además de demostrar que los compuestos de coordinación son una alternativa viable como medicamento endodontico, con bajos niveles de citotoxicidad, abrirán una nueva línea de investigación y la creación de nuevos proyectos interdisciplinarios entre la química bioinorganica y el área de endodoncia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la efectividad de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio contra *E. faecalis*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la actividad *in vitro* de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio contra *Enterococcus faecalis* a cuatro diferentes concentraciones
2. Evaluar la citotoxicidad de cuatro concentraciones diferentes de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio en cultivos de osteoblastos
3. Comparar el efecto de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio a diferentes concentraciones con el irrigante standard en endodoncia (hipoclorito de sodio)

MATERIALES Y METODOS:

1. DISEÑO DE ESTUDIO

Experimental, longitudinal, prospectivo, explicativo

1.1 POBLACIÓN:

- A) Universo: Microorganismos pertenecientes al género y especie *E. faecalis*
- B) Criterios: Inclusión: microorganismos pertenecientes al género y especie a estudiar
Exclusión: Cultivos contaminados

Nombre de la variable	Tipo de variable	de Indicador	Escala de medición	Objetivo por cumplir	Análisis estadístico
Casiopéina III-ia	Independiente	REZASURIN y Absorbancia	Densidad óptica	Objetivo general y específico 1, 2 y 3	Analítica
Casiopéina II-Gly	Independiente	REZASURIN y Absorbancia	Densidad óptica	Objetivo general y específico 1, 2 y 3	Analítica
Rutenio RuN-6	Independiente	REZASURIN y Absorbancia	Densidad óptica	Objetivo general y específico 1, 2 y 3	Analítica
<i>E. faecalis</i>	Dependiente	Absorbancia	Densidad óptica	Objetivo general y específico 1 y 3	Analítica
Osteoblastos	Dependiente	Viabilidad celular	Cualitativa nominal	Objetivo Gral. y específico 2	Descriptiva

1.2 ANÁLISIS DE DATOS

Para su análisis, se utilizó el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis mediante el software Prism 8 de MacOs, tanto en los ensayos de inhibición bacteria, como en los ensayos de viabilidad celular. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando el valor de p sea $\leq 0,05$.

1.3 METODOLOGÍA

El trabajo de campo se realizó en el laboratorio de bioingeniería de tejidos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Universidad Autónoma de México.

Los compuestos de coordinación de cobre (casiopeina Cas III-ia y Cas II-gly) y rutenio (Run6) fueron donados por el departamento del Posgrado de Química inorgánica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para comprobar el efecto de inhibición de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio se utilizó la cepa bacteriana de *E. faecalis*, la cual fue cultivada conforme las especificaciones del proveedor American Type Culture Collection. (ATCC, Rockville, MD, USA)

Para verificar la citotoxicidad de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio realizó un cultivo celular, el grupo control fue la línea celular de osteoblastos, la cual se cultivó en medio mínimo esencial modificado de Dulbbeco, (DMEM F-12) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico-antimicótico 1% y fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.



Fig.5 Compuestos de coordinación de cobre (CasII-gly y CasIII-ia) y de rutenio (RuN6)

En ambas pruebas, se evaluaron los compuestos: cas III-ia, cas II-Gly y RuN6) a las concentraciones de 10, 30, 50 y 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$ siendo estos los grupos experimentales, dos grupos de control positivos: antibiótico (ciprofloxacino) e hipoclorito de sodio al 5.25% (clorox®) y un grupo de control negativo del microorganismo *E.faecalis* para el ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano y osteoblastos sanos para la evaluación de citotoxicidad mediante ensayo de rezasurin.

1.1 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.

La cepa *E. faecalis* empleada para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana provenientes de cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), fue crecida en agar enriquecido HK (agar soya Trypticasa, con agar cerebro-corazón y levadura), suplementado con 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de menadiona ($\text{C}_{11}\text{H}_{8}\text{O}_2$, vitamina K), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina y 5% de sangre de carnero desfibrinada a 35°C en una cámara de anaerobiosis en condiciones atmosféricas de 80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2 , durante 7 días. (Fig.6)

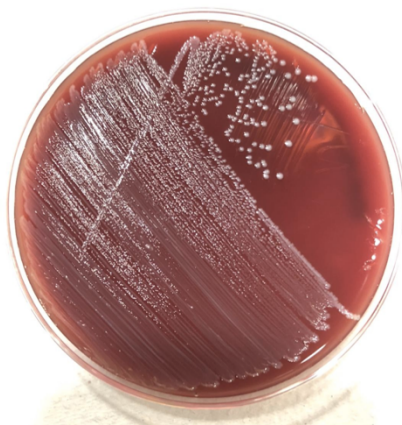


Figura.6: Cultivo de *E.faecalis*

El crecimiento de la cepa se recolectó de la superficie del agar, el cual fue suspendido en un tubo con caldo enriquecido (caldo base para Mycoplasma [Becton Dickinson], 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina y 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de menadione). La densidad óptica se ajustó a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm. 150 μl del medio con bacterias serán transferidos a pozos de placas para microtitulación de 96 pozos. Cada placa fue tratada con diferentes compuestos de los grupos experimentales (cas III-ia, cas II-Gly y RuN6) a las concentraciones de 10, 30, 50 y 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$. (Figura 7) y con los grupos de control positivo: hipoclorito de sodio al 5.25% y el antibiótico ciprofloxacina.

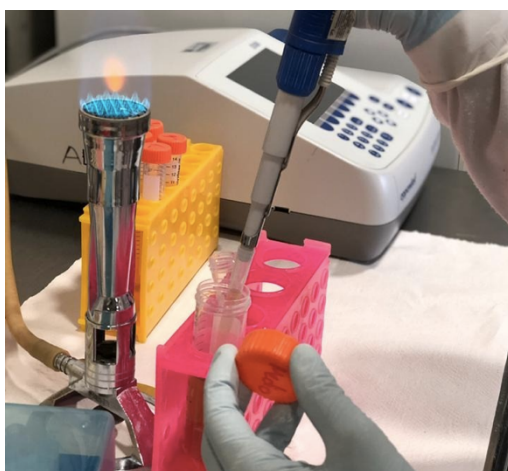


Figura 7: tubos suspendidos en caldo enriquecido (caldo base para Mycoplasma [Becton Dickinson]) y espectrofotómetro eppendor®

Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 35°C a 200 rpm en condiciones anaeróbicas (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). (fig.9) Posteriormente, se midió la absorbancia de los pozos con un lector de UV-visible a una longitud de onda de 600nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. (fig.10)

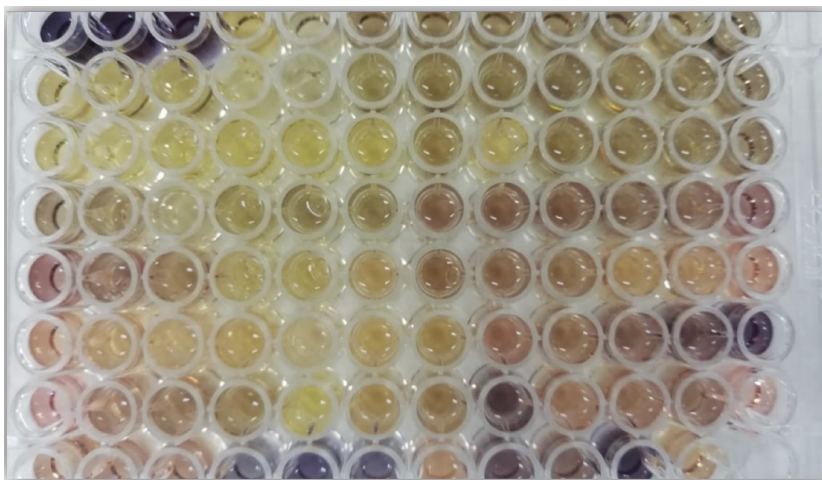


Figura.10 pozos de microtitulación

1.2 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN MEDIANTE ENSAYOS DE REZASURIN.

Los compuestos fueron estudiados en osteoblastos sanos, para descartar un posible efecto citotóxico. Mediante la prueba de resazurin (Sigma-Aldrich Resazurin sodium salt powder, BioReagent, suitable for cell culture) se midió cuantitativamente el efecto de la CasIII-ia, cas II-Gly, RuN6, hipoclorito de sodio y antibiótico.

La resazurina es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción no fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular. El crecimiento celular crea un ambiente reducido mientras que la inhibición del crecimiento mantiene un entorno oxidado. La reducción de la resazurina puede monitorizarse midiendo la fluorescencia o la absorbancia.

En cajas de 96 pozos fueron sembradas 5000 células por pozo e incubadas con DMEM, SFB al 10% y antibiótico. Posteriormente tratadas con los compuestos a las dosis de 10, 30, 50 y 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y el grupo control de hipoclorito de sodio y el antibiótico ciprofloxacino por triplicados, se incubaron por 24 horas. (tabla 1) Consecutivamente se colocó el MTT a una concentración de 10 μg por pozo y se cuantificó el formazán utilizando un lector de ELISA (Microelisa®Minireader MR590 A Dynatech Product) a una longitud de onda de 540 nm. (fig.11)

b	b	b	III-ia 10	III-ia 10	III-ia 10	III-ia 30	III-ia 30	III-ia 30	III-ia 50	III-ia 50	III-ia 50
III-ia 70	III-ia 70	III-ia 70	III-Gly 10	III-Gly 10	III-Gly 10	III-Gly 30	III-Gly 30	III-Gly 30	III-Gly 50	III-Gly 50	III-Gly 50
III-Gly 70	III-Gly 70	III-Gly 70	RuN 10	RuN 10	RuN 10	RuN 30	RuN 30	RuN 30	RuN 50	RuN 50	RuN 50
RuN 70	RuN 70	RuN 70	NaOCL	NaOCL	NaOCL 1.2	naocl 3	Anti 30	Anti 30	Anti 30		

Tabla 1: representación de los pozos de microtitulación para ensayos de proliferación de *Enterococcus faecalis*

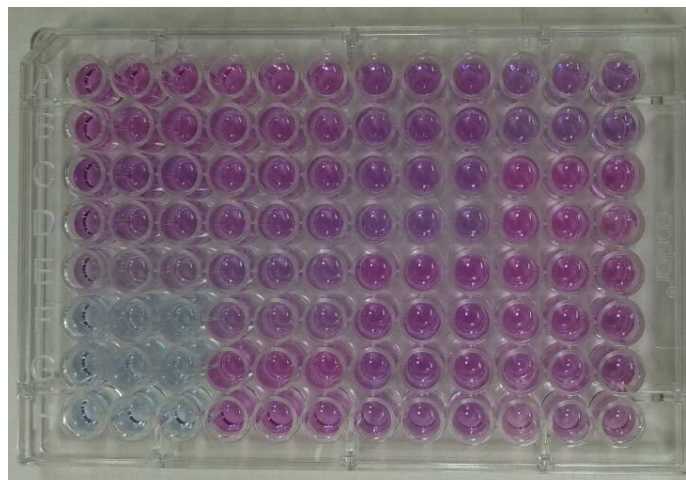


Figura11: Pozos de micro titulación para ensayos Viabilidad Celular mediante ensayos de Rezasurin

RESULTADOS:

1. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.

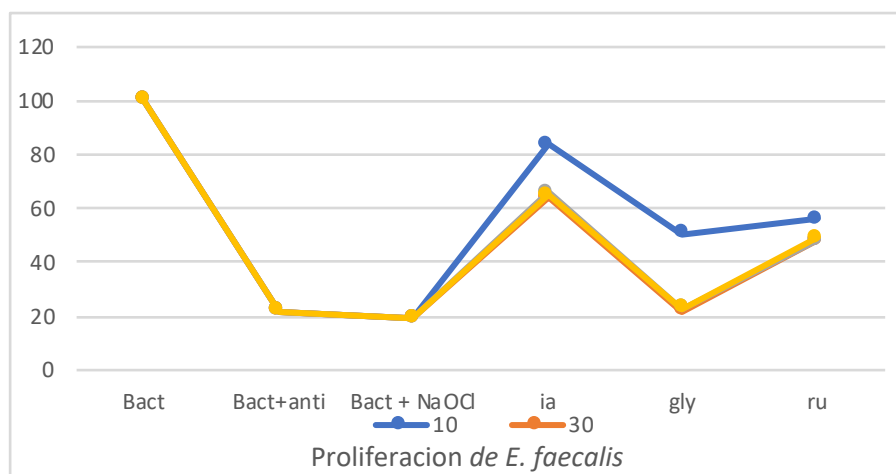
Se emplearon el hipoclorito de sodio al 5.25% y el antibiótico ciprofloxacina como grupos de control positivo, un grupo de control negativo en el cual se colocó el microorganismo *E. faecalis* y los compuestos de coordinación de cobre CasII-gly, CasIII-ia y el compuesto de coordinación de rutenio RuN6 como grupos experimentales, cada uno a cuatro concentraciones diferentes (10, 30, 50 y 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$) para el estudio de ensayos de inhibición de crecimiento del microorganismo *E. faecalis*

1.1 GRUPOS DE CONTROL POSITIVO

En los ensayos de inhibición de crecimiento del microorganismo *E. faecalis*, en el grupo de control positivo de hipoclorito de sodio al 5.25% + bacteria, los resultados demostraron una inhibición significativa contra el microorganismo (80.75%), demostrando su capacidad antibacteriana.

En el grupo de control de antibiótico + bacteria, mostró una inhibición similar al Hipoclorito (78.25%) (grafica 1), Sin embargo, estadísticamente hay diferencia significativa entre el hipoclorito al 5.25% y el antibiótico ciprofloxacina. (tabla 2)

Gráfica 1: evaluación de inhibición del microorganismo de los compuesto de coordinación de cobre y rutenio.



Bact: bacteria, Anti: antibiotico, NaOCl: Hipoclorito de sodio, Ia: CasIII-ia, gly: CasII-gly, Ru: RuN6

Tabla 2: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre los grupos de control negativo y positivo

Prueba Dunn de comparaciones multiples	SIGNIFICANCIA	VALOR DE P AJUSTADO
Control vs. NaOCl	Yes	0.0204
Control vs. Antibiotico	No	0.5282
NaClO vs. Antibiotico	No	0.5282
Kruskal-Wallis statistic		7.322

NaOCl: hipoclorito de sodio 5.25%,

1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron dos compuestos de coordinación de cobre de la familia de las Casiopeínas, CasII-gly y CasIII-ia junto con el compuesto de rutenio RuN6, se realizó este estudio de inhibición, y se analizó de manera individual cada grupo experimental, comparando las 4 concentraciones utilizadas (10, 30, 50 y 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

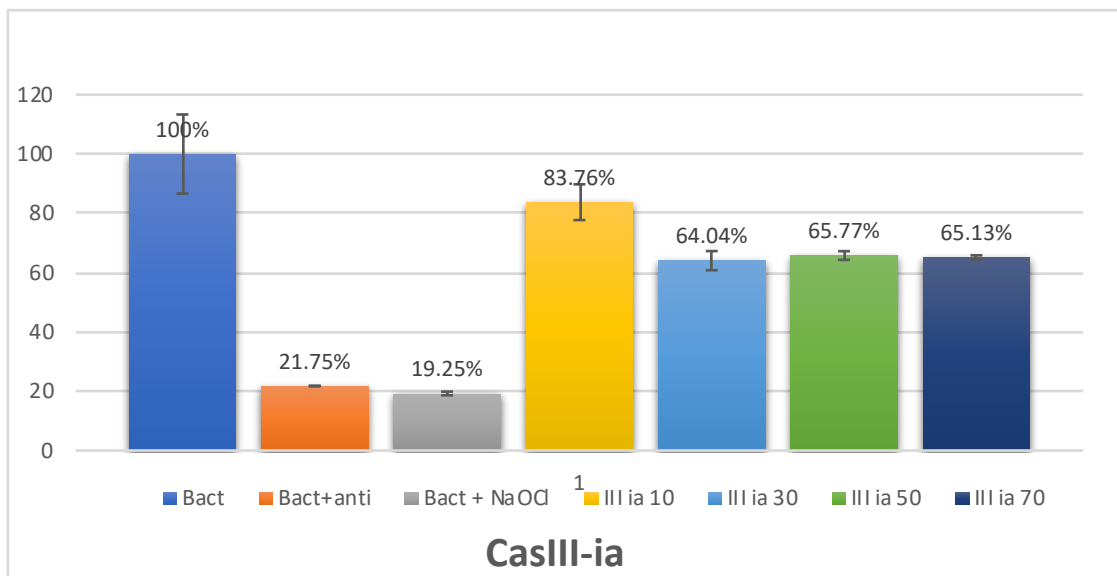
1.1 RESULTADOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL CASIII-IA

Para el grupo experimental CasIII-ia se utilizaron cuatro concentraciones diferentes (10, 30, 50 y 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$), se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples entre las concentraciones, los resultados mostraron que las cuatro concentraciones de este compuesto, presentaron ser inhibidores del microorganismo, siendo la concentración de CasIII-ia 30 la que presentó mayor inhibición (64.04%). (Grafica 2)

Sin embargo, estadísticamente, no hay una diferencia significativa entre las concentraciones en este compuesto, y a partir de la concentración 30, al aumentar la concentración, no hubo mayor inhibición del microorganismo (Grafica 3 y tabla 3)

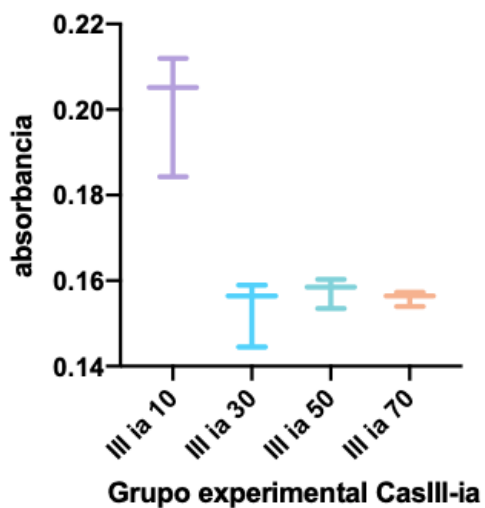
Además, se compararon las cuatro concentraciones con el control negativo de *E. faecalis*, y estadísticamente nos señala que no hay diferencia significativa entre aumentar o disminuir las concentraciones contra este microorganismo (tabla 4)

Gráfica 2: Evaluación de inhibición del microorganismo del compuesto de coordinación CasIII-ia y los grupos de control



Bact: Bacteria, Anti: antibiótico, NaOCl: Hipoclorito de sodio, IIIia: CasIII-ia,

Grafica 3: Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis del compuesto CasIII-ia a cuatro concentraciones diferentes.



III-ia: Casiopeina III-ia

Tabla 3: Prueba Dunn de comparaciones múltiples entre las concentraciones del compuesto CasIII-ia, v

Prueba Dunn de comparaciones múltiples	Significancia	Valor de P AJUSTADO
CasIII-ia 10 vs.Cas-III ia 30	No	0.1619
CasIII- ia 10 vs. CasIII- ia 50	No	0.5332
Cas-III ia 10 vs.Cas-III ia 70	No	0.1619
Cas-IIIia 30 vs. Cas-IIIia 50	No	>0.9999
CasIII-ia 30 vs. CasIII-ia 70	No	>0.9999
CasIII-ia 50 vs. CasIII-ia 70	No	>0.9999
Kruskal-Wallis	6.6	
Valor de P	0.0648	

Tabla 4: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre el grupo de Control *E. faecalis* vs compuesto CasIII-ia a cuatro concentraciones diferentes

Prueba Dunn de comparaciones múltiples	¿Significancia?	Valor de de P ajustado
<i>E.faecalis</i> vs. CasIII-ia 10	No	>0.9999
<i>E.faecalis</i> vs.CasIII-ia 30	No	0.1198
<i>E.faecalis</i> vs. CasIII-ia50	No	0.356
<i>E.faecalis</i>vs. CasIII-ia 70	No	0.1198
CasIII-ia 10 vs CasIII-ia 30	No	0.6106
CasIII-ia 10 vs. III ia 50	No	>0.9999
CasIII-ia 10 vs. CasIII-ia 70	No	0.6106
CasIII-ia 30 vs. CasIII-ia 50	No	>0.9999
CasIII-ia30 vs. CasIII-ia 70	No	>0.9999
CasIII-ia 50 vs.CasIII-ia 70	No	>0.9999

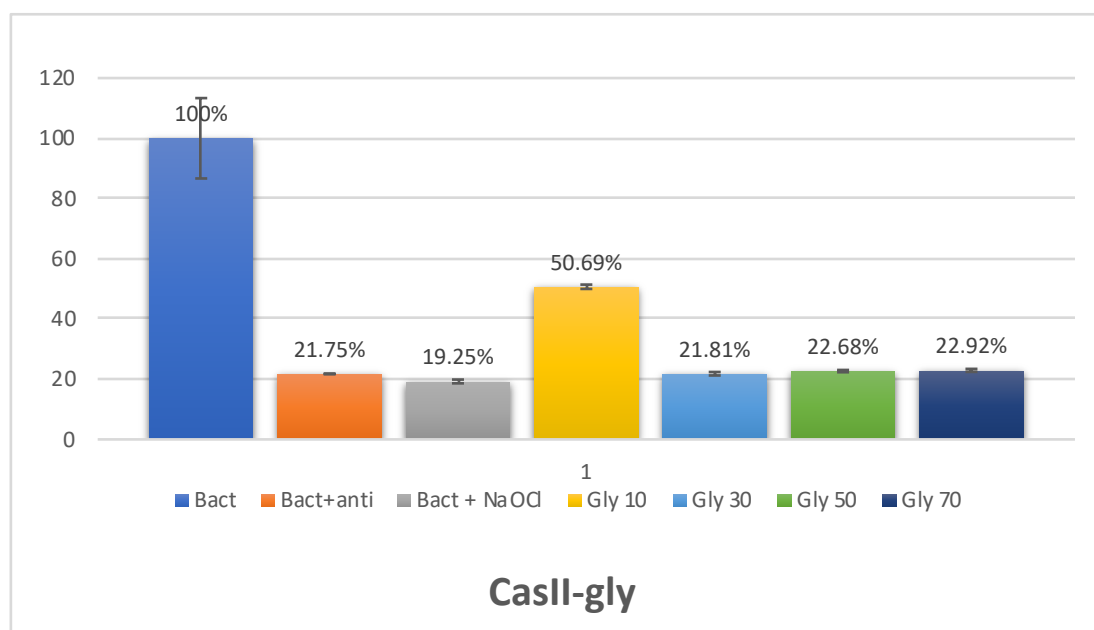
1.2 RESULTADOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL CASII-GLY

En el grupo experimental de CasII-gly, se utilizaron cuatro concentraciones (10, 30, 50 y 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis para definir que concentración es la mejor en este grupo experimental. los resultados mostraron mayor inhibición del microorganismo respecto al primer grupo experimental, la concentración 10 presentó actividad inhibitoria (49.31%) menor que las concentraciones 30, 50 y 70, destacando la concentración 30, que fue la que presentó mayor inhibición (78.19%), (grafica 4) también se apreció que, a mayor concentración del compuesto, no hubo mayor inhibición de la bacteria.

En análisis estadísticos nos menciona que hay diferencia significativa entre cada concentración al momento de inhibir el microorganismo

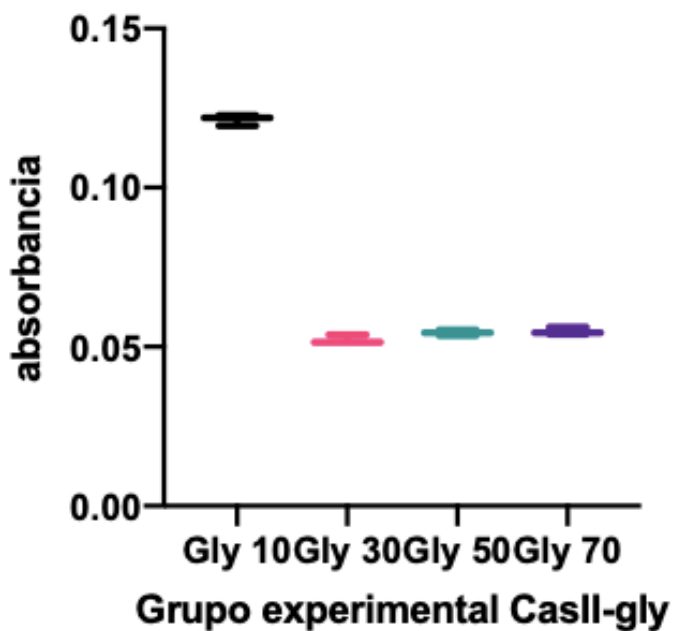
Estadísticamente nos señala que, partiendo de la concentración 30, hay una diferencia significativa al aumentar o disminuir la concentración de este compuesto (grafica 5, tabla 5 y 6)

Gráfica 4: Evaluación de inhibición del microorganismo del compuesto de coordinación CasII-gly



Bact: Bacteria, Anti: antibiótico, NaOCl, Gly: Casiopeina II-gly

Grafica 5: Análisis estadístico de Kruskal Wallis del grupo experimental CasII-gly



Gly: Casiopeina CasII-gly

Tabla 5: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre las concentraciones del grupo experimental CasII-gly

Prueba Dunn de comparaciones múltiples	SIGNIFICANCIA	VALOR DE P AJUSTADO
CasII-Gly 10 vs. CasII-Gly 30	Yes	0.0191
CasII-Gly 10 vs. Gly 50	No	0.4173
CasII-Gly 10 vs. Cas-IIGly 70	No	>0.9999
CasII-Gly 30 vs. CasII-Gly 50	No	>0.9999
CasII-Gly 30 vs. CasII-Gly 70	No	0.6738
CasII-Gly 50 vs. CasII-Gly 70	No	>0.9999
Kruskal-Wallis statistic	8.929	

CasII-gly: Casiopeina II-gly

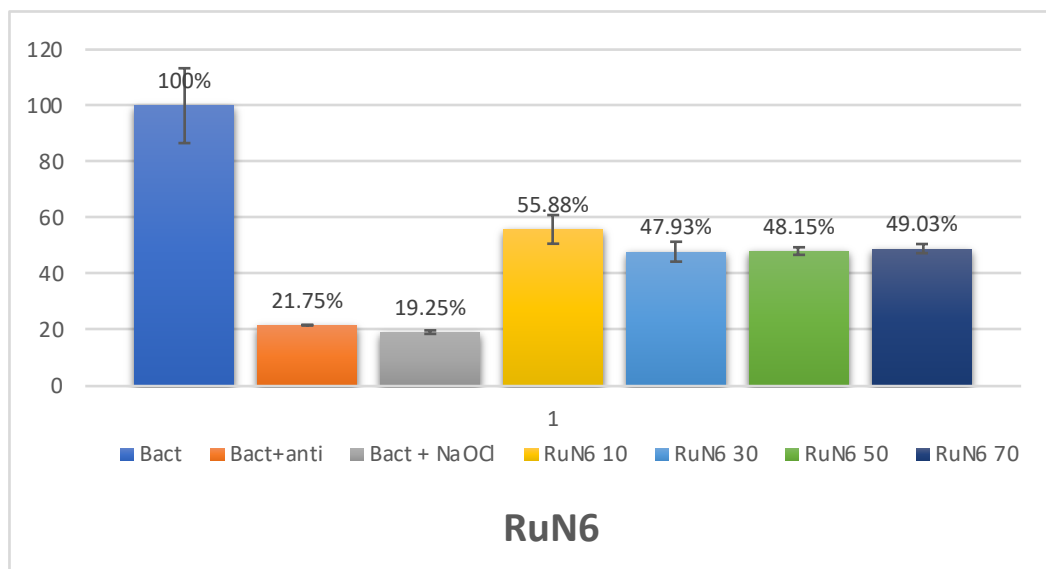
Tabla 6: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples del grupo de control negativo de *E. faecalis* vs Grupo experimental CasII-gly

PRUEBA KRUSKAL-WALIS		
VALOR DE P	<0.0001	
Prueba Dunn de comparaciones múltiples	Significancia	Valor de P ajustado
<i>E. faecalis</i> vs. CasII-Gly 10	No	>0.9999
<i>E. faecalis</i> vs. CasII-Gly 30	Yes	0.0138
<i>E. faecalis</i> vs CasII-Gly Gly 50	No	0.2236
<i>E. faecalis</i> vs CasII-Gly 70	No	0.5502
CasII-Gly 10 vs. CasII-Gly 30	No	0.1752
CasII-Gly 10 vs. CasII-Gly 50	No	>0.9999
CasII-Gly 10 vs. CasII-Gly 70	No	>0.9999
CasII-Gly 30 vs CasII- Gly 50	No	>0.9999
CasII-Gly 30 vs. Gly 70	No	>0.9999
CasII-Gly vs CasII-Gly 70	No	>0.9999
<hr/>		
ANALISIS ESTADISTICO KRUSKAL WALIS	12.56	

1.3 RESULTADOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL RUN6

En el grupo experimental del compuesto de rutenio RuN6 se emplearon cuatro concentraciones diferentes (10, 30, 50 y 70 μ L/mL) y se compararon entre si, los resultados mostraron que el compuesto a las cuatro diferentes concentraciones causa inhibición (grafica 6), sin embargo, estadísticamente, no hay diferencias significativas entre cada concentración (grafica 7 y tabla 7)

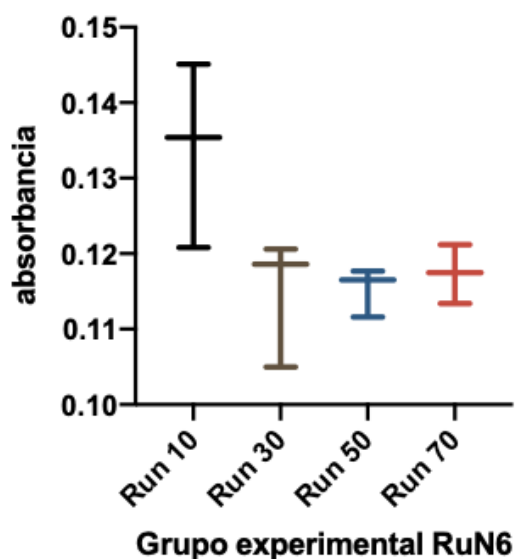
Gráfica 6: evaluación de inhibición del microorganismo del compuesto de coordinación RuN6



Bact: Bacteria, Anti: antibiótico, NaOCl: hipoclorito de sodio, Run6: Rutenio N6

Grafica 7: Análisis de Kruskal Wallis del grupo experimental RuN6

Ensayos de inhibición de *E. faecalis*



Run: Rutenio N6

Tabla 7: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples entre las concentraciones utilizadas en el grupo experimental RuN6

Kruskal-Wallis		
VALOR DE P	0.1112	
Prueba Dunn de comparaciones múltiples	significancia	Valor de de P ajustado
RuN6 10 vs. RuN6 30	No	0.4202
RuN6 10 vs. RuN6 50	No	0.1412
RuN6 10 vs. RuN6 70	No	0.6775
RuN6 30 vs. RuN6 50	No	>0.9999
RuN6 30 vs. RuN6 70	No	>0.9999
RuN6 50 vs. RuN6 70	No	>0.9999
ANALISIS ESTADISTICO Kruskal-Wallis	5.821	

RuN6: Rutenio N6

2. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN MEDIANTE ENSAYOS DE REZASURIN.

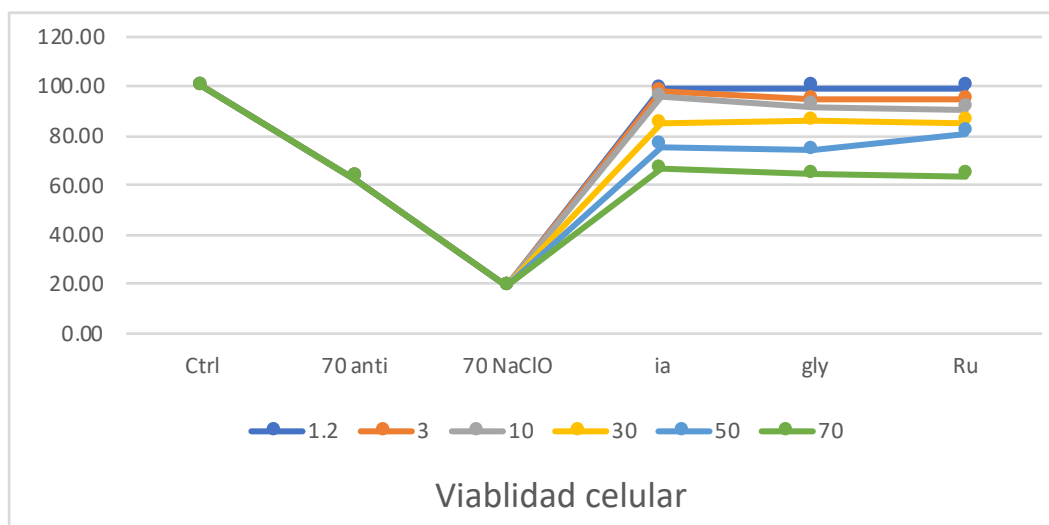
Se realizaron pruebas de citotoxicidad, para comprobar y comparar los niveles de toxicidad de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio mediante ensayos de Rezasurin utilizando osteoblastos sanos. Se emplearon un grupo de control negativo de osteoblastos sanos, dos grupos de control positivo de osteoblastos sanos con hipoclorito de sodio al 5.25% y el antibiótico ciprofloxacina, tres grupos experimentales de osteoblastos sanos con los compuestos CasIII-ia y CasII-gly de la familia de las casiopeínas, y el compuesto a base de rutenio RuN6 a cuatro concentraciones diferentes (10, 30, 50 y 70 μ L/mL), todas las pruebas se realizaron por triplicado.

2.1 GRUPOS DE CONTROL POSITIVOS

En el grupo de control positivo de hipoclorito de sodio + osteoblastos, tuvimos como resultado un alto porcentaje de citotoxicidad (19.24%), resultado esperado debido a las propiedades que posee el hipoclorito de sodio, en el grupo de control positivo de antibiótico + osteoblastos, se presentaron niveles muy bajos de citotoxicidad (62.59%). (grafica 8)

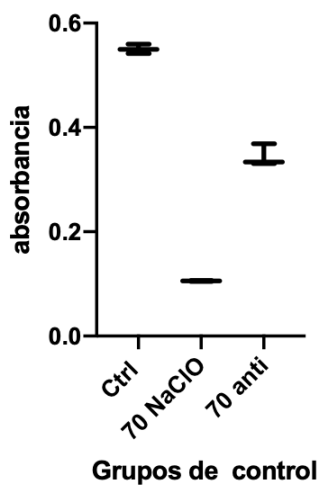
Estadísticamente, hay diferencia significativa entre los dos grupos de control, siendo el hipoclorito altamente citotóxico en comparación con el antibiótico (grafica 9, tabla 8)

Grafica 8: Viabilidad celular de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio a diferentes concentraciones



Ctrl: Control, Anti: antibiótico, NaOCl: hipoclorito de sodio, Ia: Casiopeina III-ia, gly: Casiopeina II-gly, Ru: Rutenio N6

Grafica 9: análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis entre los grupos de control de la prueba de ensayos de viabilidad celular.



Ctrl: Grupo Control, NaOCl: hipoclorito de sodio, Anti: antibiótico

Tabla 8: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples de Osteoblastos sanos vs Grupos de control positivos

Prueba de Dunn de Comparaciones Múltiples	Significancia	Valor de P ajustado
Osteoblastos vs. NaClO 5.25	Yes	0.0219
Osteoblastos vs. Antibiotico	No	0.5391
NaClO 5.2.5% vs. Antibiotico	No	0.5391
Kruskal-Wallis statistic	7.200	

2.2. GRUPO EXPERIMENTAL CASII-IA

El grupo experimental de CasIII-ia a sus diferentes concentraciones, (10, 30, 50 y 70µL/mL) presentó bajos porcentajes de citotoxicidad: 98.60%, 97.51%, 95.52%, 84.68%, 75.54%, 66.22%

Al realizar el análisis estadístico de Kruskal Wallis y comparar los cuatros concentraciones del este grupo experimental, nos dice que, si hay diferencias significativas de citotoxicidad entre las concentraciones; a mayor concentración, mayor el nivel de citotoxicidad. (grafica 10, tabla 9)

Grafica 10: análisis no paramétrico Kruskal Wallis del grupo experimental CasIII-ia

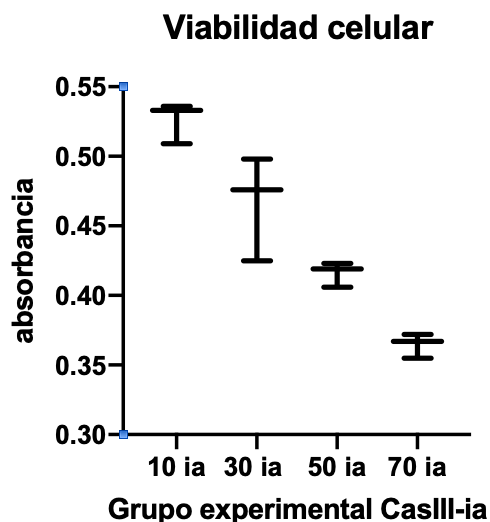


Tabla 9: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples del grupo experimental CasIII-ia de los ensayos de viabilidad celular

Prueba de Dunn de comparaciones múltiples	Significancia	Valor de P ajustado
Osteoblastos vs. 10 ia	No	>0.9999
Osteoblastos vs. 30 ia	No	>0.9999
Osteoblastos vs. 50 ia	No	0.1371
Osteoblastos vs. 70 CasIII-ia	Yes	0.0102
10 CasIII-ia vs. CasIII30 ia	No	>0.9999
10 CasIII-ia vs. 50 CasIII-ia	No	>0.9999
10 CasIII-ia vs. 70 CasIII-ia	No	0.1371
30 CasIII-ia vs. 50 CasIII-ia	No	>0.9999
30 CasIII-ia vs. 70CasIII-ia	No	>0.9999
50CasIII-ia vs. 70 CasIII-ia	No	>0.9999

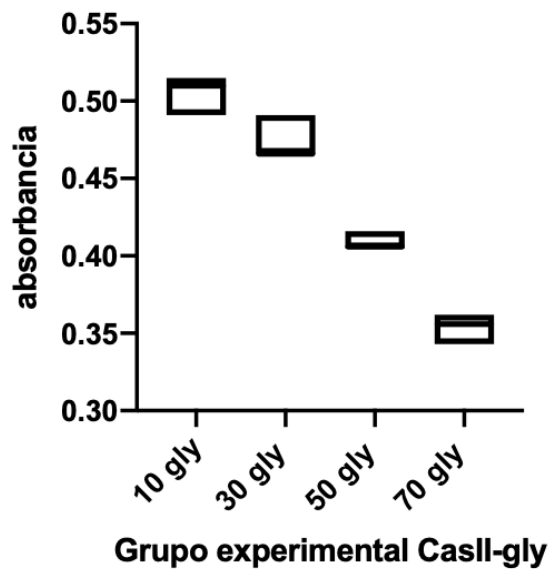
Kruskal-Wallis statistic

10.38

2.3 GRUPO EXPERIMENTAL CASII-GLY

CasII-gly, a cuatro diferentes concentraciones (10, 30, 50 y 70 μ L/mL), presentó bajos porcentajes de citotoxicidad: 99.51%, 94.49%, 91.76%, 86.13%, 74.27% y 64.22% de osteoblastos vivos, destacando la concentración 30, misma que en las pruebas de proliferación de *E. faecalis* resulto ser la más efectiva al inhibir la proliferación bacteriana en un 21.81% y niveles bajos de citotoxicidad (84.69 %) en osteoblastos sanos. En el análisis estadístico nos señala que hay diferencia significativa de osteoblastos sanos vivos al aumentar la concentración del compuesto. (Grafica 11, tabla 10)

Grafica 11: análisis estadístico del grupo experimental CasII-gly en la prueba de ensayos de viabilidad celular



Gly: Casiopeina II-gly

Tabla 10: Prueba Dunn de comparaciones multiples de osteoblastos vs grupo de control experimental de CasII-gly

Kruskal-Wallis statistic		13.41
Prueb de Dunn de Comparaciones Multiples	Significancia	Valor de P ajustado
Osteoblastos vs. 10 CasII-gly	No	>0.9999
Osteoblastos vs. 30 CasII-gly	No	>0.9999
Osteoblastos vs. 50 gly	No	0.1354
Osteoblastos vs. 70 CasII-gly	Yes	0.0099
10 gly vs. 30 CasII-gly	No	>0.9999
10 CasII-gly vs. 50 CasII-gly	No	>0.9999
10 CasII-gly vs. 70 CasII-gly	No	0.1537
30 CasII-gly vs. 50 CasII-gly	No	>0.9999
30 CasII-gly vs. 70 CasII-gly	No	0.9068
50 CasII-gly vs. 70 CasII-gly	No	>0.9999

2.4 GRUPO EXPERIMENTAL DE RUN6

El compuesto RuN6 presentó bajos porcentajes de citotoxicidad: 99.39%, 94.61%, 90.61%, 85.35%, 80.87%, 63.92%. Al realizar el análisis estadístico de Kruskal Wallis y comparar los cuatros concentraciones del este grupo experimental, nos dice que si hay diferencias significativas de citotoxicidad entre las concentraciones; a mayor concentración, mayor el nivel de citotoxicidad. (grafica 12, tabla 11)

Grafica 12: análisis no paramétrico de Kruskal Wallis del grupo experimental Rutenio RuN6

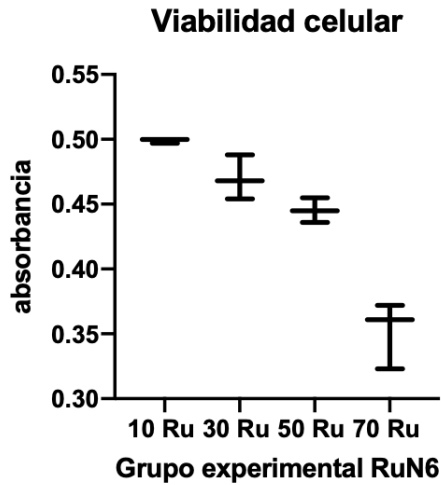


Tabla 11: Prueba de Dunn de comparaciones múltiples de el grupo de control de osteoblastos vs grupo experimental de RuN6

Kruskal-Wallis statistic		13.26
Prueba de Dunn de comparaciones múltiples	Significancia	Valor de P ajustado
Osteoblastos vs. 10 Rutenio RuN6	No	>0.9999
Osteoblastos vs. 30 Rutenio RuN6	No	0.8256
Osteoblastos vs. 50 Rutenio RuN6	No	0.1752
Osteoblastos vs. 70 Rutenio RuN6	Yes	0.01
10 Rutenio RuN6 vs. 30 Rutenio RuN6	No	>0.9999
10 Rutenio RuN6 vs. 50 Rutenio RuN6	No	>0.9999
10 Rutenio RuN6 vs. 70 Rutenio RuN6	No	0.1363
30 Rutenio RuN6 vs. 50 Rutenio RuN6	No	>0.9999
30 Rutenio RuN6 vs. 70 Rutenio RuN6	No	>0.9999
50 Rutenio RuN6 vs. 70 Rutenio RuN6	No	>0.9999

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue la evaluación de compuestos de coordinación de cobre y rutenio (Cas II-gly, Cas III-ia y RuN-6) contra *Enterococcus faecalis*. Diversos autores demostraron la capacidad inhibitoria de estos compuestos principalmente en células cancerígenas, y la citotoxicidad de estas para células sanas. Dado que el mecanismo de acción es a través de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno los resultados obtenidos mostraron actividad inhibitoria en la bacteria antes mencionada.

Onawumi *et. al.* (2011) demostraron en su estudio que los compuestos de coordinación de cobre tuvieron efectos inhibitorios contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *A. niger* y *C. albicans*, teniendo resultados similares comparado con los fármacos estándar utilizados contra estos microorganismos, los autores obtuvieron resultados parecidos a los de este estudio, demostrando el potencial antibacteriano de las casiopeínas. (16)

Los compuestos a base de rutenio, además ser agentes antitumorales, se ha demostrado que poseen efecto antiparasitario, Sarniguet *et. al.* (2014) demostraron que los compuestos a base de rutenio presentaron actividad antiparasitaria contra *Entamoeba histolytica* y *Tripanosoma cruzi*, el mecanismo potencial de acción antiparasitaria de los complejos de rutenio obtenido implica la sobreproducción de ERO, este estudio concuerda con el nuestro respecto a que los compuestos de coordinación de rutenio, pueden ser una alternativa viable y su versatilidad como fármaco, teniendo actividad antitumoral, antiparasitaria y antimicrobiana contra distintos microorganismos. (59)

Las Casiopeínas® (CasIIIa, CasIIIEa y CasIIgly) han mostrado actividad de inhibición del crecimiento en tuberculosis y ninguna acción potencial en macrófagos humanos. Barbosa *et. al.* (2016) en su estudio obtuvo un resultado sinérgico interesante cuando estos compuestos se combinaron con etambutol (EMB) y se observó un efecto aditivo en la combinación con isoniazida (INH), y rifampicina RIF. Este trabajo sus resultados son similares en comparación con nuestro proyecto, ya que los compuestos de coordinación de cobre tuvieron efecto antimicrobiano en ambos estudios, además, no se vieron afectadas células sanas (macrófago y osteoblastos respectivamente) (55)

Las especies reactivas de oxígeno han sido un tema de interés en los últimos tiempos, se ha estudiado los efectos que tienen y las posibilidades terapéuticas que pueden llegar ofrecer.

Dharmaraja *et. al.* (2017) y Nogueira *et. al.* (2017) concluyeron que la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) contribuye a la eficiencia de la mayoría de los tratamientos existentes desarrollados para combatir las infecciones bacterianas y el cáncer. un pequeño aumento en la producción de ERO puede tener consecuencias perjudiciales en las bacterias. Se ha demostrado que las células cancerosas son susceptibles si existe mayor producción de ERO, por lo tanto, puede ser posible mejorar el potencial de los medicamentos antimicrobianos y anticancerígenos al aumentar la producción de ERO, esto concuerda con nuestro estudio, demostramos que la producción de ERO mejora el potencial antimicrobiano en medicamentos (57)

Distintos fármacos utilizados en la actualidad, al interactuar con los microorganismos, producen como efecto secundario la producción de especies reactivas de oxígeno, Van Acker *et al* (2017) nos mencionan que el aumentar ERO o interferir con los mecanismos de defensa de los patógenos contra ERO, pueden mejorar las terapias antimicrobianas o conducir al diseño de fármacos dirigidos, en los resultados de nuestro estudio, los compuestos de coordinación de cobre y rutenio, son fármacos que trabajan produciendo EROS y tuvieron efecto antimicrobiano, concordando con lo mencionado en este estudio (59).

En la actualidad, existen investigaciones previas sobre nuevos tratamientos basados en metales en distintas áreas de la salud.

Kishen *et. al.* han tenido importantes avances en sus estudios sobre nanopartículas a base de plata en endodoncia, en este estudio, utilizaron nanopartículas como medicamento intraconducto teniendo actividad en los microorganismos presentes en el conducto radicular, concordando con nuestro estudio, los metales han presentado ser una alternativa farmacológica, siendo potenciales antimicrobianos de los microorganismos presentes en el conducto radicular (58)

El cobre, uno de los metales más estudiados como posible alternativa a distintas enfermedades; Duncan *et. al.* nos mencionan en su revisión lo eficaz que puede ser el cobre, ha sido investigado por sus acciones biológicas únicas y tienen un gran potencial para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, esto concuerda con nuestros resultados, ya que comprobamos que el cobre, tiene potencial antimicrobiano. (60)

CONCLUSIONES

En este estudio de inhibición bacteriana, los 3 grupos experimentales, demostraron su capacidad antibacteriana contra el microorganismo *E. faecalis*,

En el estudio de ensayos de viabilidad celular, todos los compuestos presentaron bajos niveles de citotoxicidad, hay una diferencia significativa en los tres grupos experimentales al momento de aumentar la concentración, afectando sus niveles de citotoxicidad.

El grupo experimental CasII-gly, fue el grupo que presentó mayor actividad antimicrobiana y poca citotoxicidad, siendo la concentración CasII-gly 30 la que presento similitud con los grupos de control.

La actividad antimicrobiana y los bajos niveles de citotoxicidad de los compuestos de coordinación de cobre y rutenio, fomentan el continuar con la línea de investigación y realizar estudios más específicos para conocer el alcance de la química de coordinación en el área de endodoncia

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriológica evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 321–328.
2. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Top*. 2012;27(1):74–102.
3. Gomes B, Ferraz C, Vianna M, Berber V, Teixeira F, Souza-Filho F. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424–428.
- 4 Kishen, *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine *in vitro*, *J biomed* 2006.
5. Gasser G, Metzler-Nolte N: The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 2012;16:8491.
6. 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.
6. Rogolino D, Carcelli M, Compari C, De Luca L, Ferro S, Fisicaro E, et al: Diketoacid chelating ligands as dual inhibitors of HIV-1 integration process. *Eur J Med Chem* 2014;78: 425–430.
7. Santini C, Pelli M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C: Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Ver* 2014; 114:815–862.
8. Yoshikawa Y, Adachi Y, Yasui H, Hattori M, Sakurai H: Oral administration of bis(aspirinato)zinc (II) complex ameliorates hyperglycemia and metabolic syndrome-

like disorders in spontaneously diabetic KK-A(y) mice: structure-activity relationship on zinc-salicylate complexes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2011; 59:972–977.

9. Navarro M, Castro W, Martinez A, Sanchez Delgado RA: The mechanism of antimalarial action of [Au(CQ)(PPh₃)]PF₆: structural effects and increased drug lipophilicity enhance heme aggregation inhibition at lipid/water interfaces. *J Inorg Biochem* 2011; 105:276–282.

10. Pavan FR, Poelhsitz GV, da Cunha LVP, Barbosa MI, Leite SR, Batista AA, et al: In vitro and in vivo activities of ruthenium (II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2013

11. Duncan C, White AR. Copper complexes as therapeutic agents. *Metallomics*. 2012;4(2):127–38.

12. Halliwell B, Gutteridge JM: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186:1–85.

13. 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(May 2018):127–32.

14. Ruiz-Azuara, L. Preparation of new mixed copper aminoacidate complexes from phenylate phenanthrolines to be used as "anticancerogenic" agents. U.S. Patent 5,107,005, April 21, 1992.

15. Kwik WL, An, KP, Chen G. Complexes of (2,2-bipyridyl) copper (II) and (1,10-phenanthroline) copper (II) with some amino acids. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1980, 42(2), 303-313.

16. Carvalho-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E, et al. Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals* 2008;21(1):17–28.

17. Tuo W, Zijian G. Copper in medicine: Homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr. Med. Chem* 2006;13:(5), 525–537.
18. 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
18. Espinal-Enríquez J, Hernández-Lemus E, Mejía C, Ruiz-Azuara L. Network analysis shows novel molecular mechanisms of action for copper-based chemotherapy. *Front Physiol* 2016.
19. 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 On.* 2013;
20. Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol* 2003;
21. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Radic Biol Med* 2000;28:1387–1404
22. Noyori, R. Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2008-2022.
23. 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
24. Motswainyana, W.M.; Ajibade, P.A. Anticancer activities of mononuclear ruthenium (II) coordination complexes. *Adv. Chem* 2015, 1–21.
25. Gambino D, Otero L Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorg Chem Acta* 2012

26. Gaiddon C, Jeannequin P, Bischoff P, Pfeffer M, Sirlin C, Loeffler JP. Ruthenium (II)-derived organometallic compounds induce cytostatic and cytotoxic effects on mammalian cancer cell lines through p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315(3):1403–11.
27. Nathan, C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Invest* 2003;111:769–778.
28. D'Autréaux B, Toledano MB., ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:10:813–24.
29. Dharmaraja, A. T., Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria. *J. Med. Chem.* 60, 3221–3240 (2017)
30. Collins English Dictionary—Complete and Unabridged © Harpercollins Publishers 1991, 1994, 1998, 2000, 2003.
31. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions, *Endod Top.* 2012;27(1):74–102.
32. Estrela C, Barbin E, Spanó J, Marchesan M, Pécora J. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002; 13: 113–117.
33. Gomes B, Ferraz C, Vianna M, Berber V, Teixeira F, Souza-Filho F, In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *IntEndod J* 2001; 34: 424–428.
34. Cvek M, Nord CE, Hollender L. Antimicrobial effect of root canal debridement in teeth with immature root. a clinical and microbiologic study. *Odontol Revy* 1976; 27: 1–10.
35. McComb D, Smith DC (1975) A preliminary scanning microscopic study of the root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1, 238–42

- 36.Spanberg L (2002) Instruments, materials and devices. In: Cohen S, Burns RC, eds. Pathways of the Pulp, 8th edn. St Louis, MO, USA: Mosby Inc., pp. 521–72.
- 37.Bystro ĩm A, Sundqvist G (1983) Bacteriológica evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg, Oral Med, Oral Path 55, 307–12.
- 38.Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1973; 36: 856–864
- 39.Hülsmann M, Rödiger T, Nordmeyer S. Complications during root canal irrigation. Endod Top 2007; 16: 27–63.
- 40.Farook SA, Shah V, Lenouvel D, et al. Guidelines for management of sodium hypochlorite extrusion injuries. Br Dent J 2014; 217:679-84.
- 41.Kleier DJ, Averbach RE, Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: experience of diplomates of the American Board of Endodontics. J Endod 2008;34: 1346–50.
- 42.Mehdipour O, Kleier DJ, Averbach RE. Anatomy of sodium hypochlorite accidents. Compend Contin Educ Dent 2007; 28: 544–546.30
- 43.Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965; 20: 340–349.
- 44.Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(1):86–93.
- 45.Pinheiro et. al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J [Internet]. 2003;36

46. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral Enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:95–101.
47. Molander A, Reit C, Dahlrn G, Kvist T. Microbial examination of root filled teeth with apical periodontitis [Abstract]. *Int End J* 1994; 27:104.
48. Love RM. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399–405.
49. Møller,~JR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth *Odont* 1966;74:(supplement): 1-380.
50. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66:1375-9
51. Borzini L, Condò R, De Dominicis P, Casaglia A, Cerroni L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against. *Open Dent J.* 2016;10(1):692–703.
52. Portenier I, Tuomos MT, Waltimo M, Haapasalo MP. *Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endod Top* 2003; 6:135–159. \
53. 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.
54. Evaluación de los efectos genotóxico y clastógeno de la casiopeína iii-ia en linfocitos humanos in vitro. Roldán, Elia y Cancino, Diana. Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Bioterio Campo-II, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, DF.,
55. Dharmaraja, A. T. Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria. *J. Med. Chem.*

56. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod.* 2016;42(10):1417–26.
57. Van Acker H, Coenye T. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol* [Internet]. 2017;25(6):456–66.
58. Duncan, C., & White, A. R. (2012). *Copper complexes as therapeutic agents. Metallomics, 4(2), 127–138.*
59. Sarniguet C, Toloza J, Cipriani M, Lapier M, Vieites M, Toledano-Magaña Y, et al. Water-soluble ruthenium complexes bearing activity against protozoan parasites. *Biol Trace Elem Res.* 2014;159(1–3):379–92.