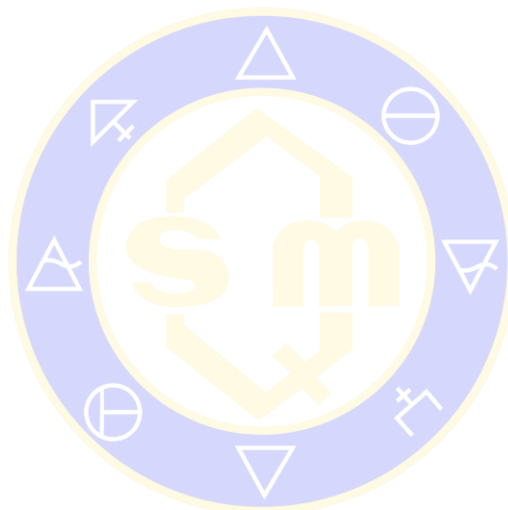


CONTENIDO

Estudio de la interacción de compuestos de coordinación de cobre (II) con ADN por difracción circular	516
Síntesis de compuestos de coordinación de Cu(II) con ligantes de tipo diimina aromático e indometacina con posible actividad antitumoral y su incorporación en un nanogel	520



SOCIEDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, A.C.
“La química nos une”

Estudio de la interacción de compuestos de coordinación de cobre (II) con ADN por dicroísmo circular

Karen Resendiz Acevedo¹, Silvia Dávila Manzanilla¹, Luis Ortiz Frade², Lena Ruiz Azuara¹

¹Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, C.P. 04510, México D. F., México. ² Departamento de Electroquímica, Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C. Parque Tecnológico Querétaro Sanfandila, Pedro de Escobedo, C.P. 76703. Querétaro, México.

lenar701@gmail.com / rakfq031293@gmail.com

Introducción

Las Casiopeínas[®] son quelatos mixtos de cobre(II), cuya fórmula general es $[Cu(N-N)(O-O)]N$ y $[Cu(N-N)(N-O)]N$ ^{1,2}, estos han presentado actividad antitumoral *in vivo* e *in vitro*^{3,4,5}, convirtiéndose en una buena alternativa ante los antineoplásicos actuales; además se ha observado que tienen interacción directa con el ADN^{6,7} lo que podría impedir la multiplicación de células cancerosas. Sin embargo, es importante conocer el mecanismo de acción de estos compuestos a nivel biológico y molecular, para esto se han realizado estudios de dinámica molecular⁸, de electroforesis⁹ y UV- vis⁹, con la finalidad de establecer la interacción de las Casiopeínas[®] con el ADN, sin embargo, los resultados no han sido concluyentes. En este trabajo, se empleó la técnica de DC, en un estudio *in vitro*, la cual se espera aporte información acerca del modo de unión de los compuestos con la doble hélice y nos permita distinguir o apoyar algunos de los mecanismos de interacción propuestos en los estudios teóricos y experimentales realizados hasta el momento.

Se ha reportado en la literatura que existen dos bandas definidas en dicroísmo circular para el ADN, una en 245 nm debida a la helicidad y otra en 275 nm debida al apilamiento de las bases de la doble hélice¹⁰. Por lo que se siguieron los cambios observados en estas dos bandas como efecto de la interacción del plásmido con controles positivos y con los compuestos.

Metodología experimental.

Se evaluó la interacción de 14 Casiopeínas[®], donde en el Grupo 1 se encuentran aquellas que poseen como ligante secundario el acetilacetionato (Imagen 1) y en el Grupo 2 las que contienen como ligante secundario al glicinato (Imagen 2), con el plásmido pBR322, mediante dicroísmo circular, a diferentes tiempos de incubación (0,5,10,20,40 y 80 minutos a 37 °C) utilizando una concentración constante de compuesto y de ADN. Como controles positivos se emplearon BrET, bleomicina y cisplatino, moléculas cuyo modo de unión con el ADN es conocido.

“La química nos une”

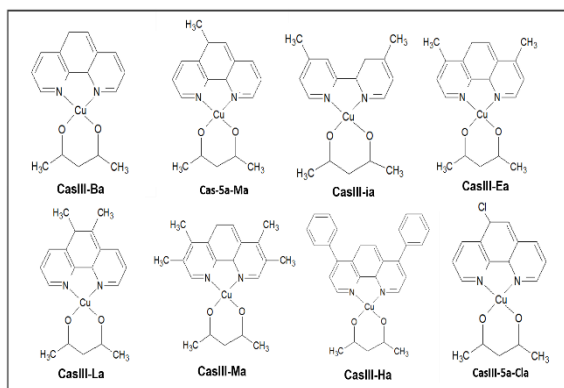


Figura 1. Estructuras de las Casiopeínas[®] del Grupo 1.

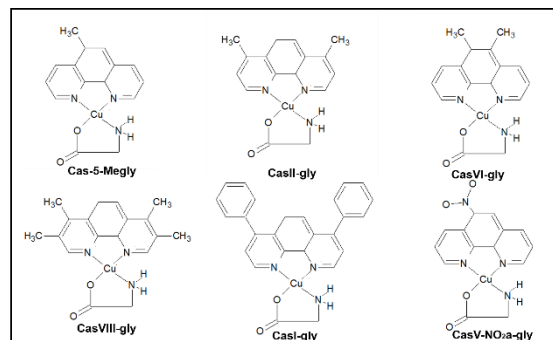


Figura 2. Estructuras de las Casiopeínas[®] del Grupo 2.

Análisis y discusión de resultados

Los efectos observados en los controles positivos empleados permitieron diferenciar principalmente cuatro tipos de interacción con el plásmido, interacciones en surco menor, interacciones de tipo intercalante, covalente y mixta (interacciones en surco menor y de tipo intercalante). Al evaluar las interacciones Casiopeínas-ADN se encontró que once de los compuestos, presentan un comportamiento similar al de los controles positivos evaluados y tres de ellos se comportan de manera diferente.

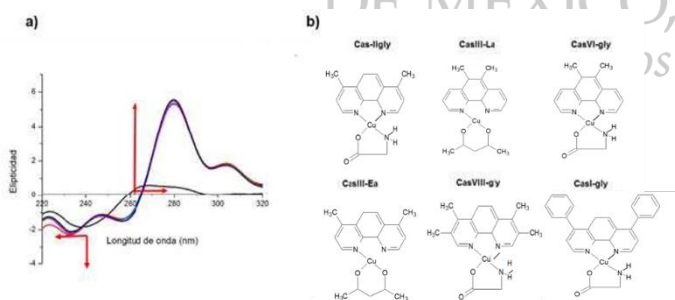
Las Casiopeínas[®] que presentaron un aumento en la intensidad en la banda debida al apilamiento de las bases fueron la CasIII-La, CasIII-Ea, CasII-gly, CasVI-gly, CasVIII-gly y CasI-gly (**Gráfica 1**), este efecto se ha relacionado con interacciones en el surco menor debido a que, al unirse el fármaco a la doble hélice, este provoca un rompimiento local del apilamiento de las bases que se traduce en el aumento considerable de esta banda. En cuanto a su estructura, la mayoría de estas poseen al glicinato como ligante secundario y al tener N y O en su estructura pudiera encontrarse formando puentes de hidrógeno con las bases del ADN.

Por otro lado, las Casiopeínas[®]: CasIII-Ha y CasIII-5a-Cla, presentaron efectos similares al cisplatino en dicroísmo circular. Esta interacción pudiera deberse a la atracción entre los grupos fosfato del ADN y el cobre de las Casiopeínas[®] por efectos de las cargas de ambas especies.

La CasIII-Ba (**Gráfica 2**), presentan un comportamiento similar al del BrET. Esto puede deberse a que al no tener ningún grupo sustituyente en la fenantrolina (ligante primario), podría facilitar la inserción, estabilización y apilamiento de los anillos de la fenantrolina con las bases del ADN y sugerir el hecho de que los sustituyentes del ligante primario pudieran estar impidiendo estéricamente una intercalación con la doble hélice.

Para la CasIII-ia y la CasV-NO₂-a-gly (**Gráfica 3**), se propone exista una interacción mixta (surco menor e intercalante), al presentar un comportamiento parecido al de la bleomicina, esto sugiere que las Casiopeínas[®] no tienen un modo de unión único con el ADN, sino que, la interacción observada podría ser la más favorecida energéticamente.

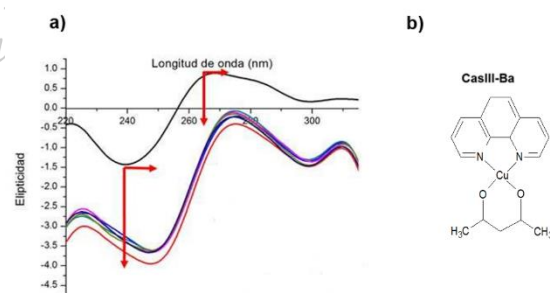
Las Casiopeínas[®] CasIII-Ma, Cas-5-Megly y Cas-5a-Ma, no tuvieron un comportamiento similar ni al de los controles positivo ni al del resto de la serie de compuestos, por lo que no fue posible asignar un modo de unión para las mismas en este trabajo y se propone que su interacción pueda ser diferente y/o más compleja que las formas de unión evaluadas con los controles positivos seleccionados.



Gráfica 1. a) Espectro de DC de la CasII-gly incubada a diferentes tiempos con el plásmido pBR322 donde:

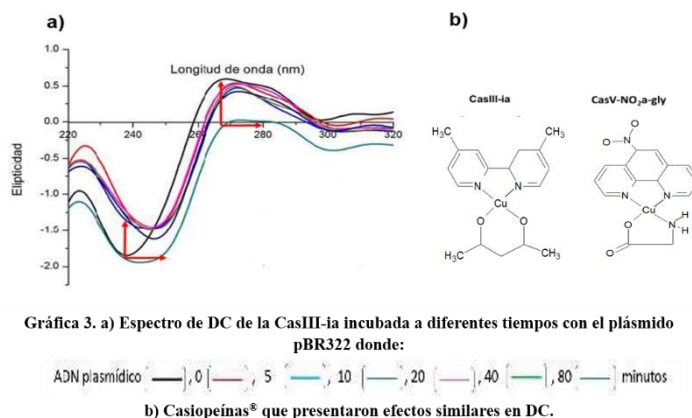
ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos

b) Casiopeínas[®] que presentaron efectos similares en DC.



Gráfica 2. a) Espectro de DC de la CasIII-Ba incubada a diferentes tiempos con el plásmido pBR322 donde:

ADN plasmídico — 0 — 5 — 10 — 20 — 40 — 80 — minutos



Conclusiones

Al evaluar la interacción entre el plásmido pBR322 y las Casiopeínas® se propuso que: La CasIII-La, CasIII-Ea, CasII-gly, CasVI-gly, CasVIII-gly y CasI-gly, interactúen en el surco menor del ADN, debido al aumento en DC de la banda por apilamiento de bases. Las Casiopeínas®: CasIII-Ha y CasIII-5a-Cla, al presentar efectos similares al cisplatino en DC, se unan de manera covalente al ADN. La CasIII-Ba, al presentar un comportamiento similar al del BrET, se una de manera intercalante a la doble hélice. Para la CasIII-ia y la CasV-NO₂-a-gly, existe una interacción mixta (surco menor e intercalante). Las Casiopeínas® CasIII-Ma, Cas-5-Megly y Cas-5a-Ma, presentan un modo de unión diferente a los evaluados en este trabajo, por lo que no fue posible clasificar su interacción con el ADN.

Además, parece ser que la sustitución del ligante primario y la presencia de la glicina en la estructura de las Casiopeínas®, favorece la interacción en surco menor; mientras que la ausencia de sustituyentes en el ligante primario acompañado del acetilacetato como ligante secundario, la intercalación.

Referencias

- [1] Ruiz-Azuara L., Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents, 07/628843, US5107005 A, 1992, RE 35458, US RE35,458E, 1997.
- [2] Ruiz-Azuara L., Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from methylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents, 628628, 5576325, 1996.
- [3] Márquez L., Sánchez A., Moreno M., Cruz A., Bravo E., Ruiz-Azuara L., Rodríguez S., Sotelo J., Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms, Neoplasia, 2005, 7, 563 – 574.
- [4] Bravo E., García J., Gracia I., Ruiz-Azuara L., Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetilacetato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®), 2009, 103, 299-309.
- [5]Carvalho F., Trejo C., Gómez C., Rodríguez E., Rosales L., Cortés E., Cedillo C., Gracia I., Ruiz-Azuara L., Marina V., Constantino F., Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo, BioMetals, 2008, 21, 17–28.
- [6] Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz-Azuara L. & Dobrota, M. Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. Chemico-Biological Interactions, 2007,165, 189–199.
- [7] Guerrero S., Cano P., Reyes E., Velazquez F., Bravo M., Ruiz L., Genotoxicity of the cooper antineoplastic coordination complexes Casiopeínas, Toxicology in Vitro, 2011, 25, 1376-1384.

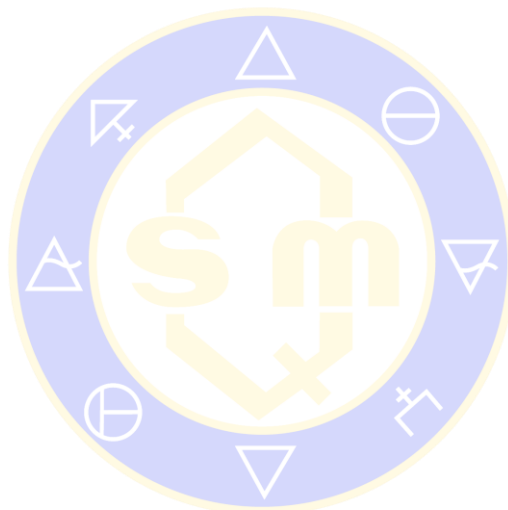
[8] Galindo R., Hernández J., González M., Cortés F., Ruiz-Azuara L., Moreno R., pi-Stacking between Casiopeinas and DNA bases, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13, 14510–14515.

[9] Figueroa De Paz Y., Estudio de la Interacción de Compuestos de Coordinación Quelatos Mixtos de Cobre (II) con ADN, 2017, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Tesis de Maestría.

[10] Aleksí M., Kapetanovi V., An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA – Drug Interactions, *Acta Chimica Slovenica*, 2014, 61, 555–573.

Agradecimientos

A CONACyT por la beca SNI-III otorgada con número de ayudante 14341, a la red de Farmoquímicos por el apoyo otorgado; al Proyecto CONACYT, Ciencias Básicas 179119 por el apoyo otorgado.



SOCIEDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, A.C.
“La química nos une”

Síntesis de compuestos de coordinación de Cu(II) con ligantes de tipo diimina aromático e indometacina con posible actividad antitumoral y su incorporación en un nanogel

Godínez Loyola Yokari¹, Bernad Bernad María Josefa¹, Ruiz Azuara Lena¹

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad No. 3000 Col. Universidad Nacional Autónoma de México C.U., C.P. 04510, Delegación Coyoacán, México, Ciudad de México. E-mail: yok.tb.cm@gmail.com

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado actividad citotóxica, genotóxica y antitumoral por parte de las Casiopeínas, compuestos de coordinación de Cu(II) con un ligante primario bidentado del tipo diimina aromática (N-N) como 2,2'-bipiridina o 1,10-fenantrolina con diferentes sustituyentes y un ligante secundario que puede ser α -aminoácido (N-O), acetilacetato o salicilaldehído (O-O). En este proyecto se planteó llevar a cabo la síntesis de nuevos compuestos empleando indometacina como ligante secundario; con dicha modificación se espera observar actividad antiproliferativa y antiinflamatoria. Por otro lado, la incorporación del compuesto en un nanogel sensible a temperatura y pH permitirá la liberación específica en el microambiente tumoral.

Introducción

El cáncer es un término genérico que designa un conjunto de enfermedades caracterizadas por la división y diseminación incontrolada de las células; y actualmente es la principal causa de muerte a nivel mundial.

Existen diferentes tipos de tratamientos contra el cáncer y el que se suministre dependerá del tipo, la etapa en que se encuentre e inclusive si se tiene algún otro problema de salud. Entre los tratamientos empleados destacan quimioterapia, radioterapia y cirugía; generalmente en combinación. La quimioterapia es el tratamiento que emplea fármacos y a pesar de la eficacia mostrada presenta inconvenientes como alta toxicidad para el organismo y la generación de resistencia, por lo que continúa la búsqueda de nuevas moléculas.

La química bioinorgánica medicinal busca desarrollar quimioterapéuticos empleando metales. En nuestro grupo de trabajo se utilizan metales esenciales, para los cuales el cuerpo tiene un mecanismo homeostático, hecho que podría disminuir considerablemente su toxicidad. Entre los metales empleados, destaca el cobre.

Las Casiopeínas[®] son una familia de compuestos anticancerígenos de coordinación cuyo centro metálico es de Cu(II) con un ligante primario bidentado de tipo diimina (N-N) y ligante secundario que puede ser α -aminoácido (N-O), acetilacetato o salicilaldehído (O-O). Estudios *in vitro* e *in vivo* han comprobado que las Casiopeínas[®] poseen actividad citotóxica, genotóxica y antitumoral; cuyo mecanismo de acción involucra la intercalación de las Casiopeínas[®] entre las bases del ADN además de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). La incorporación de un antiinflamatorio no esteroideo como ligante secundario a la estructura farmacofórica de las Casiopeínas nos permitirá explorar en el campo de los fármacos de actividad dual.

Por otra parte, la falta de especificidad de los medicamentos convencionales hace que la distribución de los fármacos sea generalizada y así, su actividad en tejidos sanos conlleva a efectos adversos al tratamiento. Los nanogeles estímulo sensibles son una opción viable para incorporar en su interior principios activos, aprovechando la posibilidad de obtener hidrogeles colapsados a pHs normales y que se hinchan a pHs de las células cancerígenas.

Reactivos

Para las síntesis se empleó nitrato de cobre(II) hemipentadhidratado $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (99.99+ %), 1,10'-fenantrolina (99+ %), 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (98 %), 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina (98 %), 3,4,7,8-

tetrametil-1,10-fenantrolina(98 %), 2,2'-bipiridina(99+ %), 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina(99 %), 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina(99 %), indometacina, hidróxido de sodio NaOH, metanol MeOH y agua destilada.

Métodos

La síntesis de los compuestos se llevó a cabo mezclando una cantidad estequiométrica de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ con el ligante primario de tipo diimina correspondiente y el ligante secundario indometacina siguiendo el método de las patentes. El producto se precipitó a través de la evaporación parcial del disolvente. El sólido obtenido se filtró, se recrystalizó y se procedió a su caracterización. Todas las síntesis se llevaron a cabo bajo condiciones ambientales.

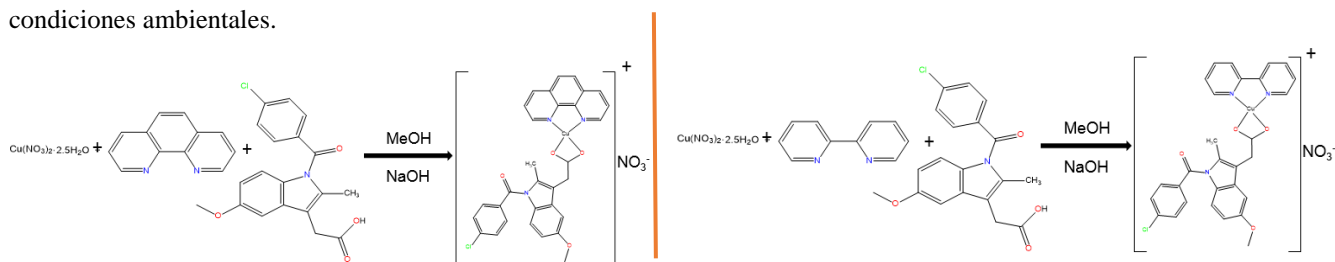


Figura 1. Esquema de síntesis con el ligante 1,10-fenantrolina y 2,2'-bipiridina

La caracterización se llevó a cabo mediante el uso de diferentes técnicas como análisis elemental, conductividad, espectroscopia de infrarrojo (IR), susceptibilidad magnética, espectroscopia de absorción en el UV-Visible, resonancia paramagnética electrónica (RPE) y voltamperometría cíclica (VC).

Discusión de resultados

Se obtuvieron compuestos de coordinación en estado sólido de color verde, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para compuestos de coordinación de cobre con indometacina.

La caracterización de los compuestos de coordinación se inició con la espectroscopia de infrarrojo, en la cual se observan las bandas características de la diimina y la indometacina con ligeros desplazamientos asociados a la coordinación con el centro metálico de cobre. Es posible observar la banda del estiramiento del enlace O-H aparece en aproximadamente 3400 cm^{-1} ; esta banda se atribuye a la posible presencia de agua en la estructura de los compuestos. La vibración C=N se encuentra presente en aproximadamente 1580 cm^{-1} . Se observan bandas de mediana intensidad correspondientes a las flexiones fuera del plano del enlace C-H presente en los anillos aromáticos de la diimina presente en 3050 , 850 y 720 cm^{-1} . La banda atribuida al grupo carbonilo C=O de la indometacina aparece en 1716 cm^{-1} , y esta desaparece una vez que se lleva a cabo la coordinación de ésta al cobre. También es posible observar la vibración C-O en aproximadamente 1215 cm^{-1} . Se propone que los compuestos de coordinación mixtos son de carácter iónico y que el anión nitrato no se encuentra coordinado al centro metálico debido a que todos ellos presentan una banda fina e intensa correspondiente a la vibración del anión en aproximadamente en 1384 cm^{-1} .

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis elemental, el cual permitió determinar el contenido relativo de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre presente en los compuestos de coordinación. En algunos compuestos el ajuste de los porcentajes se mejoró al proponer que éstos se encontraban hidratados, lo cual coincide con las estructuras cristalinas reportadas para este tipo de compuestos. Los compuestos de coordinación se obtuvieron con buena pureza, por lo que esta técnica analítica permitió determinar la fórmula molecular y, por ende, la masa molar exacta de cada uno.

Los espectros de absorción en la región del UV-Visible en disoluciones acuosas a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en MeOH y aplicando la ecuación de Lambert-Beer se obtuvieron los valores del coeficiente de extinción molar para cada máximo. Los máximos ubicados en la región del UV se asocian a transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ en el ligante diimina y de la indometacina; el valor obtenido de coeficiente de extinción molar lo confirma, ya que la literatura informa que para estas transiciones ϵ debe ser mayor a $10\ 000\text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

En la región del visible todos los compuestos presentaron un máximo en aproximadamente 660 nm, éste se debe a las transiciones $d_{xy,yz} \rightarrow d_{xy}$ y $d_{x^2-y^2} \rightarrow d_{xy}$ en el centro metálico de Cu(II). De igual manera, el valor obtenido para ϵ concuerda con la transición de tipo d-d que la literatura informa debe de encontrarse entre 1 y $10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Se observó descomposición térmica para todos los compuestos en un intervalo de temperaturas de entre 143 y 180 °C. La determinación conductométrica se llevó a cabo en disoluciones 1 mmol L^{-1} del compuesto de coordinación en MeOH a 25 °C; dichos compuestos presentan una conductividad eléctrica entre 82.4 y $105.9 \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ por lo que se determinó que se comportan como electrolitos tipo 1:1 en estas condiciones.

La susceptibilidad magnética se determinó por el método de Gouy y el valor del momento magnético se encuentra entre 1.66 y 2.22 MB; por lo que puede sugerirse que todos los compuestos poseen un electrón desapareado atribuible al centro metálico de cobre con una configuración electrónica $[\text{Ar}]d^9$ en un estado de oxidación 2+ y son complejos de alto espín. La resonancia paramagnética electrónica muestra espectros de tipo anisotrópico axial prólata característico de centros de Cu(II) con acoplamiento hiperfino como resultado de la interacción del electrón desapareado del Cu(II) ($S=1/2$) con el espín nuclear del cobre [^{63}Cu (abundancia isotópica=69.17 %, $I=3/2$) y ^{65}Cu (abundancia isotópica=30.83 %, $I=3/2$)]; generando un cuarteto de señales en la región paralela. Se observa desdoblamiento superhiperfino en la región perpendicular debido al acoplamiento entre el electrón desapareado del Cu(II) ($S=1/2$) con el espín nuclear de los dos nitrógenos de la diimina [^{14}N (abundancia isotópica=99.632 %, $I=1$) y ^{15}N (abundancia isotópica del 0.368 %, $I=1/2$)].

La voltamperometría cíclica permitió determinar el comportamiento redox de los compuestos de coordinación. Debido a que el proceso relacionado con la actividad biológica de los compuestos es la reducción de Cu(II) a Cu(I) y la reoxidación de este Cu(I) a Cu(II), se llevó a cabo el estudio a diferentes velocidades en dicha ventana de potencial. El proceso involucra el intercambio de un solo electrón; sin embargo, la separación entre el E_{pc} y E_{pa} es mucho mayor a 60 mV, por lo que se determinó que ambos compuestos presentan un comportamiento cuasi-reversible; es decir, la transferencia electrónica es lenta y no se encuentra controlada por la difusión de las especies a la superficie del electrodo.

Se llevó a cabo la determinación de la CI_{50} en células HeLa (línea celular de cáncer cervicouterino). El valor obtenido se comparó con el del *cis*-platino; el cual es el tratamiento de primera elección para neuroblastomas humanos. Es posible observar que a excepción del compuesto $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$, todos los compuestos sintetizados son más activos que el *cis*-platino y aquellos cuyo ligante primario es 1,10-fenantrolina son más activos que aquellos con 2,2'-bipiridina; además para ambas familias de compuestos se observa que la presencia de sustituyentes metilo en la diimina aumenta la actividad (disminuye la CI_{50}) respecto al compuesto análogo sin sustituyentes.

Compuesto	$CI_{50}(\mu\text{mol L}^{-1})$
$[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$	2.3 ± 0.02
$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$	0.72 ± 0.10
$[\text{Cu}(5,6\text{-difimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$	0.67 ± 0.02
$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$	1.0 ± 0.03
$[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$	25.2 ± 1.07
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$	7.87 ± 0.40
$[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$	2.87 ± 1.02
<i>Cis</i> -platino	10.9

La selección de los posibles monómeros y polímeros que podrían conformar el nanogel se llevó a cabo considerando las condiciones del microambiente tumoral (temperatura superior a los 37 °C y pH disminuido hasta 5.5).

La N-isopropilacrilamida y el chitosán fueron seleccionados como los componentes principales del nanogel, debido a que ambos presentaron un efecto hipercrómico en todo el intervalo de concentraciones utilizadas y por tanto la formación de una nueva especie. En este caso se observan ligeros cambios en la absorbancia de la nueva especie de acuerdo con la temperatura del sistema, lo cual es deseado para el nanogel y por tanto se decidió que ésta se emplearía en la síntesis del nanogel.

Conclusiones

- Se lograron sintetizar y caracterizar siete compuestos de coordinación pertenecientes a la tercera generación de Casiopeínas.
- Todos los compuestos contienen al anión nitrato fuera de la esfera de coordinación. Con base en los resultados de RPE los compuestos de coordinación presentan un centro metálico de cobre en estado de oxidación 2⁺ con una geometría pirámide de base cuadrada distorsionada, cuya posición axial se encuentra ocupada por una molécula de agua.
- En disolución de DMSO los compuestos de coordinación estabilizan Cu^{II} y Cu^I; sin embargo, se comportan como sistemas cuasi-reversibles.

Bibliografía

Cáncer, Organización Mundial de la Salud. Consultado en: <http://www.who.int/features/qa/15/es/>. Consultado 18 de mayo de 2017, 20:15 horas.

Casas F.J.S., Moreno M.V., Sánchez G.A., Sánchez L.J.L. y Sordo R.J., 2002. *Química Bioinorgánica*. España. Editorial síntesis. p 137-162.

Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V. y Koleva-Kolarova, R., Copper in the human organism. *Trakia Journal of Science*. 2011, 9(1), 88-98.

United States Patent 1992, vol. RE 35,458

Tovar Tovar, A., Ruiz-Ramirez, L., Campero, A., Romerosa, A., Moreno Esparza, R., Rosales Hoz, M. J. *Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (Casiopeína III-ia®) with methionine, by UV-Visible and EPR techniques*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2004, 98, 1045-1053.

García Ramos J.C., Galindo Murillo R., Cortés Guzman F., Ruiz Azuara L., *Metal-Based Grug-DNA Interactions*. *J. Mex. Chem. Soc.* 2013, 57(3), 245-259.

Kachadourian, R., Brechbuhl, H.M., Ruiz Azuara, L., Gracia Mora, I., *Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*. *Toxicology*. 2010, 268, 176-183.

DrugBank <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00328>. Consultado: 18 de noviembre de 2016, 12:35 horas.

Weder Jane E., Hambley Trevor W., Kennedy Brendan J. Anti-Inflammatory dinuclear copper (II) complexes with inomethacin. Synthesis magnetism and EPR spectroscopy. Crysta structure of the N,N-dimethylformamide adduct. *Inorg. Chem.* 1999, 38, 1736-1744.

Yassin Nemat Z., El-Shenawy Siham M., Abdel-Rahman Rehab F., Yakoot Mostafa, Hassan Mohamed, Helmy Sherine Effect of a topical copper indimethacin gel on inflammatory parameters in a rat model of osteoarthritis. (2015) Dovepress Vol. 9, 1491-1498.