



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CUANTIFICACIÓN DE S-ALIL CISTEÍNA (SAC) EN CEREBRO DE RATA  
MEDIANTE HPLC**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ROXANA AVALOS CHACÓN**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



---

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: RACHEL MATA ESSAYAG

**VOCAL:** Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

**SECRETARIO:** Profesor: JOSE EDUARDO ROA CORIA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

**2° SUPLENTE:** Profesor: IRMA SUSANA ROJAS TOME

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUAREZ”, LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL

SE AGRADECE A LA **FUNDACIÓN ARMSTRONG** POR LA BECA OTORGADA A LA ALUMNA (**ROXANA AVALOS CHACÓN**) DURANTE EL PERIODO DE JULIO A DICIEMBRE DE 2016.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR UN DONATIVO DE **CONACYT No. 241655**

**ASESOR DEL TEMA:**

DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

DRA. IRMA SUSANA ROJAS TOMÉ \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE (S):**

ROXANA AVALOS CHACÓN \_\_\_\_\_



---

## ÍNDICE

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	3
2.1	El ajo.....	3
2.1.1	Extracto de ajo envejecido (EAE) .....	4
2.2	S-alilcisteína (SAC).....	5
2.2.1	Importancia biológica de la SAC en diferentes patologías.....	7
2.2.2	SAC en el modelo de isquemia reperfusión y otros padecimientos neurológicos.....	8
2.2.3	Farmacocinética y distribución en tejidos de la SAC .....	12
2.2.4	Toxicidad .....	17
2.3	Validación de métodos bioanalíticos .....	18
3	Justificación.....	21
4	Hipótesis .....	21
5	Objetivos .....	22
6	Metodología .....	23
6.1	Reactivos .....	23
6.2	Síntesis de la SAC .....	23
6.2.1	Caracterización de la SAC.....	23
6.3	Animales .....	23
6.3.1	Modelo de isquemia.....	24



---

6.3.2	Animales para cuantificación de la SAC en el estriado, corteza e hipocampo.....	25
6.4	Método bioanalítico para la cuantificación de SAC en cerebro de rata	26
6.4.1	Preparación de las muestras de tejido y derivatización de la SAC	27
6.4.2	Evaluación del sistema .....	27
6.4.3	Validación del método bioanalítico.....	28
6.5	Análisis estadístico.....	32
7	Resultados y Discusión .....	33
7.1	Síntesis de SAC .....	33
7.2	Método bioanalítico para la cuantificación de la SAC .....	35
7.2.1	Desarrollo del método.....	35
7.3	Evaluación del sistema .....	38
7.3.1	Precisión .....	38
7.3.2	Linealidad .....	38
7.4	Validación del método.....	40
7.4.1	Selectividad.....	40
7.4.2	Límite inferior de cuantificación.....	45
7.4.3	Curva de calibración .....	46
7.4.4	Precisión y exactitud .....	47
7.4.5	Recobro .....	48



---

7.4.6	Estabilidad de la muestra.....	49
7.5	Cuantificación de la SAC en el estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata.....	51
8	Conclusiones.....	57
9	Referencias.....	58
10	Espectros .....	66



---

## 1 Resumen

El ajo es una especie que tiene diversos usos tanto culinarios como medicinales. El proceso de envejecimiento del ajo genera diferentes compuestos que están presentes en menor cantidad en la planta fresca, uno de estos compuestos es la S-alilcisteína (SAC), un aminoácido organosulfurado al cual se le han atribuido los efectos farmacológicos del extracto de ajo envejecido (EAE) además de que ha servido para su estandarización. Se han reportado diversos efectos clínicos de la SAC como antihipertensivo, cardioprotector, disminución de la presión sanguínea, hepatoprotector, neuroprotector y renoprotector, así como ser un potente antioxidante tanto directo como indirecto, que se ha evaluado en diferentes patologías como la isquemia cerebral y la enfermedad de Alzheimer.

En el presente estudio se cuantificó el nivel de SAC en diferentes regiones del cerebro de rata como estriado, corteza e hipocampo tanto en animales sanos como en animales sometidos a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión. Para ello, se desarrolló y validó un método bioanalítico utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (por sus siglas en inglés HPLC) acoplado a un detector UV. Se observó que en condiciones normales, la SAC se acumula mayoritariamente en hipocampo; así mismo, posterior al evento de isquemia/reperfusión se observó una mayor acumulación de la SAC en el estriado izquierdo e hipocampo izquierdo en comparación a la cantidad acumulada en los mismos tejidos de animales que no fueron sometidos a isquemia.

La mayor cantidad de SAC en tejidos que sufrieron isquemia podría estar asociada con la alteración en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) que ocurre durante el evento de isquemia/reperfusión.



---

Dada la mayor acumulación de la SAC en hipocampo, se podría proponer el uso de este nutracéutico como agente terapéutico en enfermedades donde el hipocampo se vea afectado como en la enfermedad de Alzheimer.





---

## 2 Introducción

### 2.1 El ajo

El ajo (*Allium sativum*) se ha utilizado a lo largo de la historia no solo con fines culinarios, sino también con fines medicinales por muchas culturas a lo largo de la historia de la humanidad (Block et al., 1985; Hahn et al., 1996).

El ajo es una fuente rica en compuestos organosulfurados, los cuales son responsables en gran parte de sus propiedades medicinales, así como de su sabor y aroma (Revisado en Lawson et al., 1998).

Hoy en día se consumen diferentes preparaciones en forma de tabletas, cápsulas, aceites, polvo o la especie fresca. Cada una de éstas presentaciones tiene una composición química diferente (Lawson et al.; 2005).

La alina constituye el 1% de los componentes primarios del ajo fresco y durante el almacenamiento de los dientes de ajo a temperatura ambiente se acumula naturalmente. Así mismo, el ajo fresco contiene una pequeña cantidad de S-allylcysteína (SAC) (Amagase et al., 2001). En los diferentes libros de herbolaria de todo el mundo se han descrito procedimientos para su manipulación como cortar, hornear, hervir o dejar envejecer el ajo. El proceso de cortado favorece la transformación de la alina en alicina mediante la enzima alinasa. A la alicina se le han atribuido diferentes propiedades del ajo como antibacterial, antiviral, antiparasitario, inhibidor de la agregación plaquetaria y vasodilatador (Oomen et al., 2004; Borlinghaus et al., 2014 Agarwal et al., 1996; Eilat et al., 1995; Hirsch et al., 2000; Mayeux et al., 1988). Por otro lado, se ha demostrado que la alicina es inestable a temperatura ambiente (37°C) y se metaboliza rápidamente, por lo que no tiene una alta biodisponibilidad; limitando así, su uso. En Oriente, el envejecimiento del ajo es la manera más tradicional de incrementar los beneficios de los extractos de esta especie y de disminuir su toxicidad (Yan-Yan, 2012).



---

### 2.1.1 Extracto de ajo envejecido (EAE)

El EAE es una de las preparaciones del ajo que más se ha estudiado. Consiste en dejar envejecer el ajo fresco por aproximadamente 20 meses en etanol (15-20%) dentro de tanques de acero a temperatura ambiente; sin embargo, se ha demostrado que la cantidad de SAC presente en el extracto se mantiene constante después de los primeros 3 meses de envejecimiento. El extracto es posteriormente filtrado y concentrado a bajas temperaturas (Revisado en Colín-González et al., 2012; Sang et al., 2013)

El proceso de envejecimiento modifica los compuestos irritantes y tóxicos presentes en el ajo fresco y genera nuevos compuestos a través de diferentes reacciones enzimáticas.

Los principales cambios durante el proceso de envejecimiento son los siguientes (Revisado en Colín-González et al., 2012):

- Hidrólisis de la  $\gamma$ -glutamilcisteína a SAC y S-1-propenilcisteína.
- Incremento de cistina debido a la hidrólisis de proteínas
- Formación de tiosulfatos provenientes de la alina.
- Pérdida completa de los tiosulfatos después de 3 meses debido a la formación de compuestos volátiles (alilsulfuros), los cuales se evaporan por completo.

Se ha demostrado que el EAE tiene una alta biodisponibilidad y la SAC al ser el componente principal de este extracto se ha utilizado para estandarizarlo (Amagase et al., 2001; Revisado en Lawson et al., 1998).

Existe evidencia de que el EAE aminora el daño oxidativo implicado en el proceso de envejecimiento del humano, así como en diferentes enfermedades como alteraciones cardiovasculares, cáncer, isquemia, Alzheimer y otras condiciones degenerativas ( Revisado en Colín-González et al., 2012).

El EAE contiene derivados de aminoácidos solubles en agua, que son los productos mayoritarios; además de alilsulfuros, flavonoides y saponinas que son liposolubles. Dentro de los aminoácidos presentes en el EAE, la SAC y S-alilmercaptocisteína



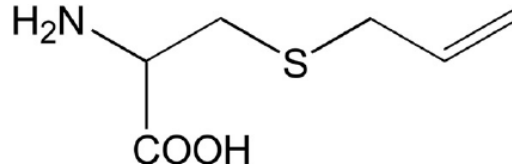
son los principales constituyentes, los cuales han demostrado tener una potente actividad antioxidante. De esta manera el EAE funciona mejor como antioxidante en comparación con otras preparaciones de ajo fresco (Borek, 2001).

Hoy en día, en México no se comercializa el EAE, sin embargo, en países como Estados Unidos y Japón sí, a través de cápsulas, tabletas y en forma líquida.

## 2.2 S-alilcisteína (SAC)

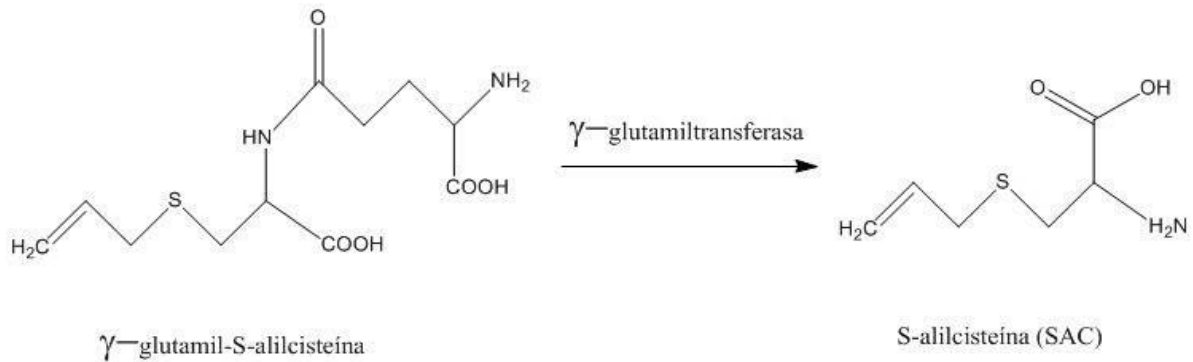
La SAC (Figura 1) es el componente principal del EAE y al cual se le han atribuido los diversos efectos biológicos de esta preparación.

La SAC es un aminoácido organosulfurado; es un polvo blanco de olor característico, soluble en agua, no higroscópico, cuyo punto de fusión es 223.3-223.7°C (Kodera et al., 2002).

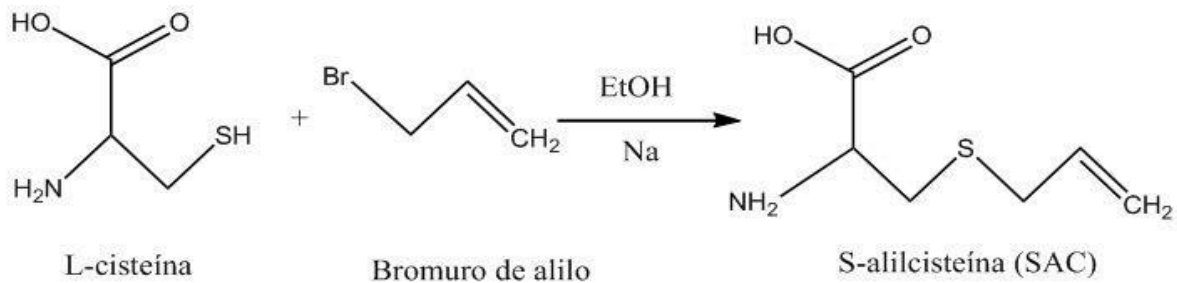


**Figura 1.** Estructura de la S-alilcisteína (SAC).

En el EAE, la SAC se forma por una reacción enzimática en la cual la  $\gamma$ -glutamylcisteína presente en el ajo fresco es transformada a SAC por la enzima  $\gamma$ -glutamyltransferasa (Figura 2); sin embargo, también se puede sintetizar químicamente a través de la reacción entre la L-cisteína y el bromuro de alilo (Figura 3) (Maldonado et al., 2003).



**Figura 2.** Síntesis de la SAC.



**Figura 3.** La SAC también puede ser sintetizada mediante una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular entre la L-cisteína monohidratada y el bromuro de alilo.

La SAC es un compuesto estable que permanece inalterado por más de 2 años. Cuando se almacena por largo tiempo se puede observar un cambio en la coloración de blanco a amarillo, sin descomposición. Bajo condiciones básicas (NaOH 2 N, 50°C, 6 días), se observa la presencia de alilmercaptano y alilsulfuro como productos de descomposición. Sin embargo, en condiciones ácidas (HCl 6 N, 50°C, 6 días) no se observa la ruptura del enlace C-S. Estas observaciones indican que la SAC puede ser absorbida en el tracto gastrointestinal después de su administración oral sin presentar cambios (Revisado en Colín-González et al., 2012).



### 2.2.1 Importancia biológica de la SAC en diferentes patologías

Se han reportado diversos efectos de importancia terapéutica comprobados farmacológicamente de la SAC como antihipertensivo, cardioprotector, disminución de la presión sanguínea, hepatoprotector, neuroprotector y renoprotector, los cuales se han asociado con sus propiedades antioxidantes (Yu et al., 2012).

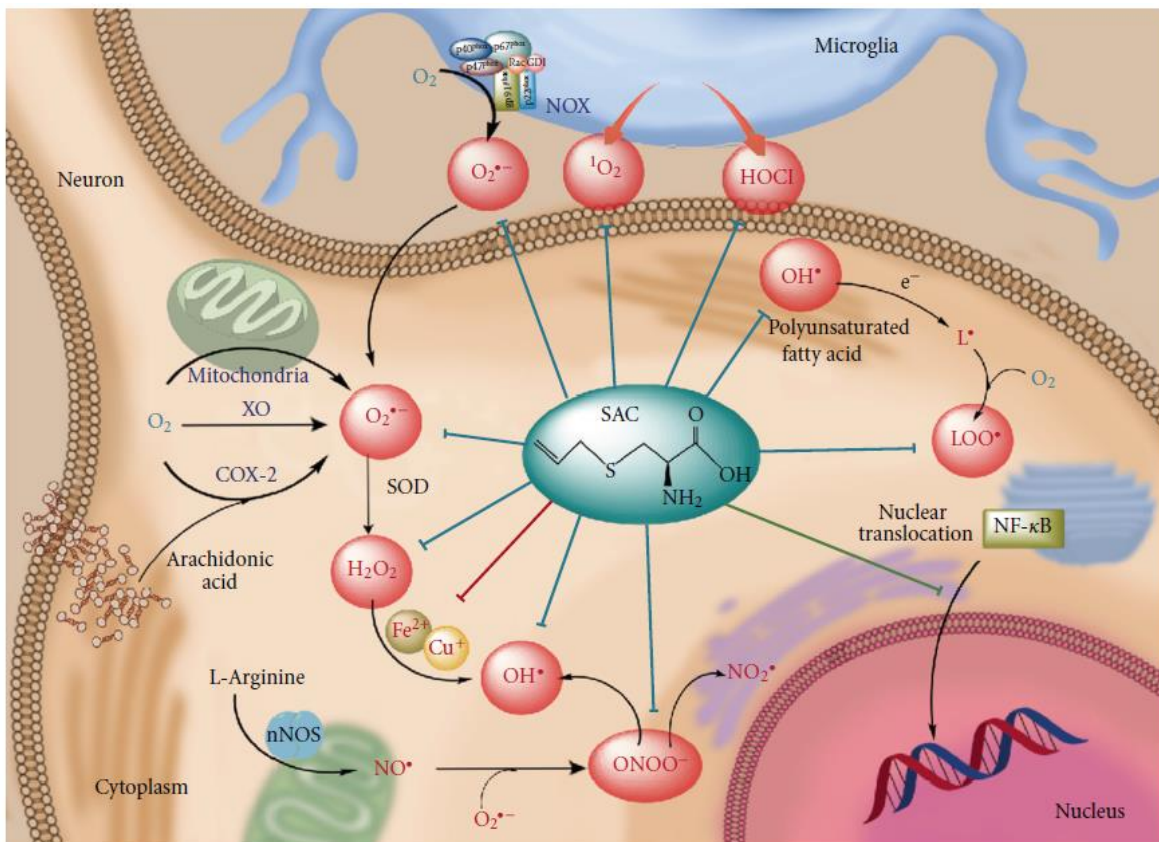
Como agente antioxidante, la SAC tiene la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) como anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) y el oxígeno singulete ( $O_2^{\bullet}$ ), entre otros (Figura 4). La actividad antioxidante de la SAC se debe a la presencia de su grupo tiol, el cual al ser un nucleófilo puede donar su protón fácilmente a una especie electrofílica, neutralizándola o haciéndola menos reactiva. Adicionalmente, la SAC activa diferentes enzimas antioxidantes y el factor de transcripción Nrf2 e inactiva enzimas pro-oxidantes como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa y la NADPH oxidasa (Figura 4) (Revisado en Colín-González et al., 2012; Franco-Enzastiga., 2017).

El efecto de la SAC también ha sido estudiado en un modelo de diabetes en ratas, en donde se ha observado que la administración oral diaria de la SAC ayuda a reducir los niveles de glucosa en sangre, aumenta los niveles de insulina, disminuye los niveles de glucoproteínas en sangre, posee un efecto anitilipidémico y en hígado regula la lipogénesis (Saravavanan et al., 2010).

La SAC podría ser una alternativa terapéutica en las enfermedades cardiovasculares, debido a su efecto cardioprotector e hipolipidémico en modelos de infarto al miocardio, ya que incrementa los niveles de lipoproteínas de alta densidad, las cuales tienen una función cardioprotectora. (Padmanabhan, 2006). Además, la SAC podría ayudar en el tratamiento de enfermedades que involucran la hipertensión, ya que se ha reportado que reduce la hipertensión en ratas sometidas a infarto al miocardio (Cruz et al., 2007).



Finalmente, se sabe que en pulmón la SAC atenúa la fibrosis pulmonar y la inflamación aguda inducida por la administración de tetracloruro de carbono, efecto atribuido a su capacidad para atrapar radicales libres e inducir el aumento de glutatión (Mizuguchi et al., 2006).



**Figura 4.** Mecanismos antioxidantes asociados a la SAC. Tomada de Colín-González et al., 2012.

## 2.2.2 SAC en el modelo de isquemia reperfusión y otros padecimientos neurológicos

La isquemia cerebral se define como una interrupción del suministro de sangre al cerebro, interrumpiendo el flujo de oxígeno y nutrientes necesarios para mantener el funcionamiento de las células del cerebro (Dirnagl et al., 1999). En el



---

proceso de isquemia se pueden distinguir dos tipos de regiones, la zona de infarto y la zona de penumbra (Ruíz et al., 2003).

La zona de infarto es la región del cerebro en la cual, la mayoría de los elementos celulares están muertos, debido a que esta región es la que circunda la arteria afectada y estas células dependen de la irrigación de dicho vaso. Al estar bloqueado, las células mueren por necrosis al no poder llevar a cabo sus funciones vitales (Sharp, 2004).

La zona de penumbra es una región de tejido cerebral poco perfundida que rodea a la zona de infarto. Tiene un suministro de sangre por debajo del umbral de viabilidad a largo plazo y debido a esto, las neuronas de esta región son susceptibles a ser rescatadas (Sharp, 2004).

En condiciones de isquemia, el flujo sanguíneo disminuye por debajo de 7 mL/100g/min en la zona de infarto, mientras que la zona de penumbra se encuentra alrededor de 7 a 17 mL/100g/min (Mehta et al., 2007).

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en el proceso de isquemia reperusión. Existe evidencia de que las ERO y las ERN participan de manera importante en la inducción del daño cerebral isquémico. Se sabe que éstas se producen dentro de los primeros 30 min del evento de reperusión y que la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) induce daño oxidante al ADN desde los primeros 30 min y hasta las 24 h de reperusión (Won et al., 2001).

La SAC ha sido evaluada en un modelo focal de isquemia en ratones, observándose un efecto neuroprotector reduciendo el volumen de infarto, mejorando la conducta neurológica y previniendo la pérdida neuronal (Ashafag et al., 2012).

Debido a la alta demanda energética, las neuronas dependen únicamente de la producción de ATP mitocondrial. Cualquier afección en las mitocondrias provoca alteraciones en la producción de ATP y un incremento en el nivel de ERO, dichos eventos son considerados cruciales para que las neuronas mueran por necrosis o apoptosis y es la zona de penumbra la que resulta mayormente afectada en el evento de isquemia/reperusión (Moro et al., 2005).



---

La isquemia hace muy vulnerable al cerebro contra el ataque de radicales libres, los cuales pueden desencadenar en muerte neuronal ya que induce disfunciones mitocondriales (Atif et al., 2009).

Existe evidencia que sugiere que los antioxidantes aminoran las alteraciones inducidas en el evento de isquemia (van Leyen et al., 2006; Yousuf et al., 2007).

Se ha observado que la SAC al ser un antioxidante presenta un efecto neuroprotector en el modelo de isquemia/reperfusión inducido en ratones al modular la disfunción mitocondrial en el hipocampo. En el cerebro isquémico, la generación de ERO es la principal causa de daño neuronal que altera las propiedades estructurales y funcionales de los lípidos y proteínas presentes en las células del cerebro (Slemmer et al., 2008). En el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) se ha reportado un incremento en la peroxidación de lípidos debido a la acción de las ERO generadas durante la isquemia/reperfusión. La mitocondria tiene sus propias defensas antioxidantes que combaten las ERO generadas en ella durante la fosforilación oxidativa. El GSH mitocondrial es considerado la primera línea de defensa contra las ERO ya que está involucrado en la eliminación de  $H_2O_2$  por la glutatión peroxidasa. La glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa participan en el mantenimiento del GSH intracelular reducido. Durante la isquemia se sabe que hay un incremento significativo en los niveles de  $H_2O_2$  intracelular así como una disminución en los niveles de GSH y de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sarkar et al., 2006).

Al administrar la SAC por vía oral se ha observado una disminución en los niveles de peroxidación de lípidos así como una disminución de los niveles de  $H_2O_2$  intracelular. Además, el contenido de GSH y la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se ven incrementados, atribuyéndole esta propiedad a la capacidad de la SAC de atrapar radicales libres generados en el cerebro tras la isquemia (Kim et al., 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que el consumo de SAC en la dieta normal, reduce el área de infarto, las disfunciones conductuales, así como la tasa de mortalidad debido a este padecimiento (Myung et al., 2014).





---

La hipoxia también es un fenómeno que se presenta en el evento de isquemia debido a la falta de oxígeno en el tejido afectado, lo cual puede provocar que la célula muera. Actualmente se ha demostrado que en un modelo de hipoxia química, la SAC muestra un efecto protector, promoviendo la viabilidad y supervivencia de las células, aunque no de manera dosis dependiente (Orozco-Ibarra et al., 2016).

El potencial de la SAC en el sistema nervioso abarca varias patologías además de la isquemia, observándose efectos positivos y mejoramiento de la conducta en modelos experimentales de Alzheimer, Huntington y Parkinson (Garcia et al., 2010, Rojas et al., 2011, Nishiyama et al., 2001).

En cuanto al modelo de Alzheimer se sabe que esta es una de las principales formas de demencia senil, debida principalmente a: la agregación de placas  $\beta$  amiloides ( $A\beta$ ); la hiperfosforilación de la proteína asociada a microtúbulo tau (MAPT); neuroinflamación; y pérdida de neuronas colinérgicas. El EAE y la SAC han demostrado tener un potencial efecto anti amiloidogénico tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. El EAE ha protegido las estructuras celulares ante el daño generado por los agregados  $A\beta$ ; mientras que *in vitro*, la SAC ha demostrado poder disociar estos agregados. Por otro lado, la SAC puede prevenir la neurodegeneración en el hipocampo al atenuar el estrés de retículo endoplásmico. Otro aspecto importante de la SAC es su capacidad para inhibir la activación de caspasa 3, la cual es una caspasa involucrada en la muerte celular (Ray et al., 2011).

Moriguchi et al. (1997) han reportado efectos positivos del EAE y la SAC en cultivos de neuronas hipocampales, ya que incrementan la supervivencia de las ramas axonales de las neuronas. A partir del análisis de relación estructura-actividad, se determinó que el grupo tioalil presente en compuestos organosulfurados como la SAC es esencial para la actividad neurotrófica. Estos autores propusieron que la SAC no solo actúa como antioxidante sino también como una molécula neurotrófica.

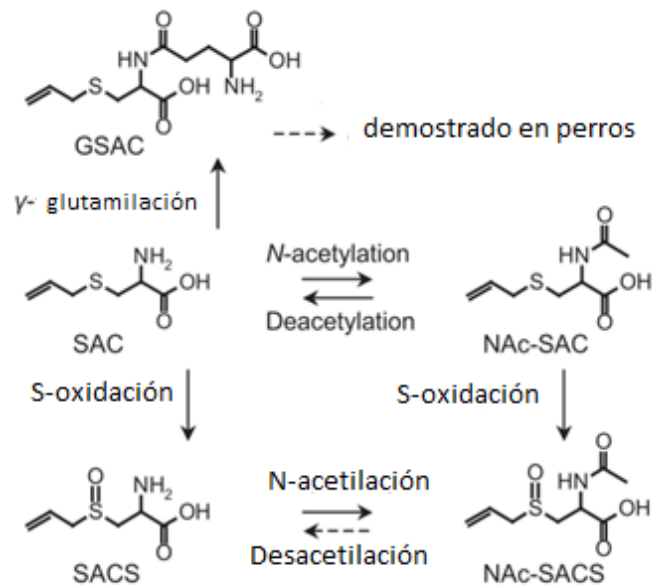


---

### 2.2.3 Farmacocinética y distribución en tejidos de la SAC

Hoy en día la farmacocinética de la SAC no ha sido ampliamente estudiada en humanos; sin embargo, se han realizado diferentes estudios en animales como ratas, ratones y perros; observándose una alta biodisponibilidad tras su administración oral: 98.2, 103.0 y 87.2% para ratas, ratones y perros, respectivamente. La cuantificación de la SAC en plasma se realizó utilizando la técnica de HPLC, derivatizando previamente la SAC empleando fenilisotiocianato (PITC) (Nagae et al., 1994).

Se han identificado cuatro metabolitos de la SAC en la orina de ratas: N-acetil-S-alilcisteína (NAc-SAC), sulfóxido de N-acetil-S-alil-L-cisteína (NAc-SACS) y sulfóxido de S-alil-L-cisteína (SACS) (Krause et al., 2002). En plasma de perros, adicionalmente de los metabolitos mencionados, también se encontró L- $\gamma$ -glutamil-S-alil-L-cisteína (GSAC). La cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo empleando la técnica de HPLC acoplado a un detector de masas (HPLC/MS), lo cual evita el paso de derivatización de la SAC (Amano et al., 2015). En la figura 5 se muestra una propuesta de vía metabólica de la SAC.



**Figura 5.** Propuesta de vía metabólica de la S-alilcisteína (SAC) en ratas y perros. NAc-SAC: N-acetil-S-alilcisteína; NAc-SACS: N-acetil-S-alil-L-cisteína; SACS: Sulfóxido de S-alil-L-cisteína; GSAC: L- $\gamma$ -glutamil-S-alil-L-cisteína. Modificada de Amano et al., 2015

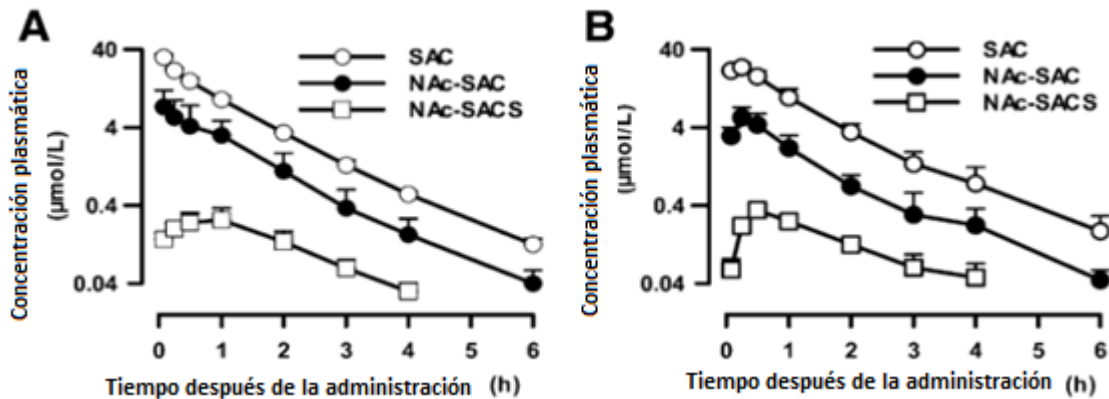
Los metabolitos NAc-SAC y SACS se producen por N-acetilación y S-oxidación, respectivamente. La formación de NAc-SACS puede ocurrir por dos vías: la S-oxidación de NAc-SAC y la N-acetilación de SACS (Amano et al., 2015).

Cuando un compuesto sufre metabolismo de primer paso hepático, generalmente la biodisponibilidad tras su administración oral incrementa de manera dosis dependiente debido a la saturación del metabolismo en el hígado. Debido a la alta biodisponibilidad de la SAC, tras la administración oral de una dosis baja de la SAC (5 mg/Kg), se sugiere que la SAC no sufre metabolismo de primer paso. La SAC es un aminoácido soluble en agua, cuya absorción está mediada por transportadores localizados en el lumen intestinal de mamíferos (Amano et al., 2014).

La figura 6 muestra que tras la administración de una dosis de SAC de 5 mg/Kg tanto de manera oral como de manera intravenosa es posible observar una fase



rápida de absorción seguida de una eliminación lenta. La mayor concentración de SAC en plasma se alcanza a los 30 min después de su administración. La concentración de SAC en plasma fue mayor que la de sus metabolitos también estudiados como NAc-SAC y NAc-SACS.



**Figura 6.** Perfil de concentración en plasma de SAC y sus metabolitos NAc-SAC y NAc-SACS después de la administración de SAC (5 mg/Kg) por vía intravenosa (A) y por vía oral (B). Modificada de Amano et al., 2014.

En ratas, después de una administración de 5 mg/kg por vía oral e intravenosa, se observó que la SAC fue excretada en mayor medida como metabolitos N-acetilados: NAc-SAC y NAc-SACS en orina; sin embargo, en plasma la concentración de SAC fue mayor que la de sus metabolitos. Se sabe que los aminoácidos son altamente reabsorbidos de la orina a través de diferentes transportadores presentes en el riñón (Bröer et al., 2008). El valor de depuración renal obtenido en ratas y perros es considerado como bajo, lo cual indica que la SAC sufre una extensa reabsorción renal en el túbulo proximal de la nefrona, mientras que sus metabolitos NAc-SAC y NAc-SACS no y por lo tanto, son eliminados fácilmente. (Amano et al., 2015). La mayor excreción de la SAC ocurre por la orina; sin embargo, en bilis también se han encontrado metabolitos de la SAC. En la tabla 1 se resumen los parámetros farmacocinéticos de la SAC en ratas después de una administración oral e intravenosa del aminoácido.



**Tabla 1.** Parámetros farmacocinéticos de la SAC. Modificada de Amano et al., 2014

<b>Parámetros farmacocinéticos</b>	<b>Intravenosa</b>	<b>Oral</b>
$C_{m\acute{a}x}$ , $\mu\text{mol/L}$	$38 \pm 5.3$	$24 \pm 2.2$
$T_{m\acute{a}x}$ , h	-	$0.19 \pm 0.10$
$t_{1/2}$ , h	$0.84 \pm 0.098$	$1.1 \pm 0.23$
Depuración, $\text{L h}^{-1} \text{kg}^{-1}$	$1.1 \pm 0.087$	-
Depuración <sub>r</sub> , $\text{L h}^{-1} \text{kg}^{-1}$	0.016	-
Biodisponibilidad, %	-	98
ABC, $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}$		
SAC	$29 \pm 2.3$	$28 \pm 6.1$
NAC-SAC	$7.7 \pm 4.7$	$6.2 \pm 1.5$
NAC-SACS	$0.56 \pm 0.20$	$0.61 \pm 0.17$

$C_{m\acute{a}x}$ : Concentración máxima;  $T_{m\acute{a}x}$ : Tiempo máximo;  $t_{1/2}$ : Tiempo de vida media; Depuración<sub>r</sub>: Depuración renal; ABC: Área bajo la curva.

El tiempo de vida media de la SAC tras una administración oral se ha reportado de 1.2 h, mientras que por vía intravenosa es de 0.84 h.

Después de su administración oral, la SAC se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y puede encontrarse en diferentes tejidos después de las 8 h de administración (Nagae et al., 1994). El tejido donde se alcanza una mayor concentración es el riñón ( $C_{m\acute{a}x}=65.7 \text{ mg/Kg}$  a los 10 min). El tiempo de vida media de eliminación varía entre los diferentes tejidos, así el tiempo más largo se observa en el hígado (2.2 h) y el de menor tiempo es el cerebro (1.2 h) (Yan et al., 2005).

Existen pocos estudios que cuantifiquen la SAC en diferentes órganos. En la tabla 2 se muestra un estudio en el que se administró una dosis de SAC de 50 mg/Kg a ratas y se cuantificó la concentración máxima de SAC empleando diferentes órganos. En riñón es donde se observa una mayor cantidad del aminoácido y el mayor tiempo de vida media. De los órganos estudiados, el cerebro es donde se cuantifica una menor cantidad de SAC y el tiempo de vida media menor (Yan et al., 2005). Sin embargo, actualmente no existe ningún estudio que cuantifique la SAC



en diferentes regiones del cerebro, hasta ahora únicamente se han llevado a cabo cuantificaciones en cerebro total.

**Tabla 2.** Cuantificación de la S-alilcisteína (SAC) en diferentes órganos después de la administración de una dosis de SAC de 50 mg/Kg. Modificada de Yan et al., 2005.

Parámetro Tejido	$C_{max}$ (mg/Kg)	$ABC_{0-t}$ (mg·h/ Kg)	$T_{1/2}$ (h)
Riñón	65.7	169.2	2.1
Hígado	58.1	103.5	2.2
Corazón	43.3	118.8	2.1
Bazo	43.3	100.6	1.9
Pulmón	35.1	94.3	1.3
Cerebro	26.7	70.7	1.2

$C_{m\acute{a}x}$ : Pico de concentración máxima;  $ABC_{0-t}$ : Área bajo la curva de concentración contra tiempo, del tiempo 0 hasta la última concentración cuantificable;  $T_{1/2}$ : tiempo de vida media de eliminación.

Para realizar la cuantificación de SAC en diferentes órganos, el equipo de investigación empleó la técnica de HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. Para lo cual fue necesario derivatizar la SAC empleando aldehído ftálico (OPA) y 2-mercaptoetanol.

Los métodos de cuantificación de la SAC principalmente se han desarrollado con la finalidad de utilizarlos en estudios de farmacocinética. Este tipo de métodos han utilizado HPLC acoplado a diferentes detectores, principalmente masas; lo cual ha permitido cuantificar SAC en concentraciones muy pequeñas.

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos hidrofílicos sulfurados se han empleado diversos métodos utilizando HPLC. Sin embargo, las interferencias con otros compuestos no sulfurados han dificultado su análisis mediante métodos basados en la absorción en la región UV. Por ello, se han implementado técnicas como HPLC/MS, postcolumna acoplado a un detector de sulfuro específico y HPLC



---

acoplado a un detector de intercambio de catión (Matsumoto et al., 2014; Lee et al., 2015). Estas técnicas han permitido cuantificar cantidades de SAC del orden de nanogramos.

#### **2.2.4 Toxicidad**

La SAC es 30 veces menos tóxica que otros compuestos del ajo como la alicina o el alildisulfuro. La dosis letal por vía intraperitoneal en ratas es de 3.34 g/Kg, la cual es similar a la de otros L-aminoácidos como la metionina (Revisado en Colín-González et al., 2012).

Después de su administración oral durante un mes, los efectos negativos que se observaron a dosis  $\geq 500$  mg/Kg de SAC fueron los siguientes (Kodera et al., 2002):

- Disminución del peso corporal en ambos géneros.
- Aumento del pH urinario en machos.
- Disminución de los niveles de proteínas urinarias en hembras y urobilinógeno en machos. El urobilinógeno es un metabolito de la bilirrubina, generado por las bacterias intestinales. Por lo que esta información sugiere que la SAC podría tener efectos sobre la flora intestinal.
- Incremento de los niveles de glucosa en el suero de hembras, sugiriendo que la SAC induce atrofia del páncreas y disminuye la secreción de insulina.
- Disminución del hematocrito.

Por otro lado, en un estudio subcrónico realizado en el laboratorio, se observó que al administrar SAC durante 90 días por vía intragástrica en diferentes grupos de animales con dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg no se encontró evidencia que muestre un efecto tóxico en los parámetros de citometría hemática ni en marcadores de daño reanal, hepático, ni pancreático. Por otro lado, tampoco se observaron alteraciones morfológicas en tejidos como bazo, riñón, hígado, pulmón, páncreas, cerebro y corazón (Bautista y Garza, 2016).



---

### 2.3 Validación de métodos bioanalíticos

Una vez que se ha desarrollado el método para la cuantificación del analito de interés, éste método debe ser validado. La validación es el proceso de obtención de evidencia documentada que muestre que el método desarrollado cumple con los criterios establecidos y por lo tanto sirve para el fin para el cual fue diseñado (Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos, FDA, 2013).

La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA: Food and Drug Administration por sus siglas en inglés), quien emitió la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos, indica los parámetros a evaluar y los criterios que se deben cumplir en métodos analíticos para la cuantificación de fármacos en matrices biológicas. También incluye algunas consideraciones generales como que todas las curvas de calibración y puntos control del analito deben prepararse en la misma matriz en la que se cuantificarán las muestras problema o de interés y que el contenido de disolvente usado en ellas no debe ser mayor al 5% del volumen final preparado.

En la tabla 3, se presentan los criterios que establece la guía emitida por la FDA:





**Tabla 3.** Criterios establecidos en la guía de validación de métodos bioanalíticos emitida por la FDA

<b>Parámetro</b>	<b>FDA 2013</b>
<b>Selectividad</b>  Comprobar que los componentes endógenos no interfieran en la detección	Analizar blancos
<b>Límite inferior de cuantificación (LIC)</b>	Debe ser al menos 5 veces mayor que la respuesta de la señal del ruido. Realizar 5 inyecciones. El porcentaje de coeficiente de variación (%CV) y la exactitud no deben ser mayores a 20%
<b>Curva de calibración</b>	Analizar 6 curvas en diferentes días.  Cada curva debe contener una muestra blanco, una muestra cero y al menos 6 concentraciones. Elegir el modelo matemático más sencillo que describa la respuesta. La concentración calculada de cada punto de la curva debe estar dentro del 15% del valor nominal, excepto el límite de cuantificación, el cual puede estar en el 20%.  Al menos el 75% de los puntos de la curva deben cumplir con el criterio, incluyendo el LIC. Los puntos que no cumplan deben ser excluidos y el modelo matemático no debe cambiar.
<b>Recobro</b>	Comparar la respuesta analítica de muestras extraídas de la matriz biológica con muestras no extraídas de la matriz.



Continuación

<b>Parámetro</b>	<b>FDA 2013</b>
<b>Precisión</b>	Analizar en diferentes corridas, al menos por quintuplicado 3 concentraciones dentro del rango de trabajo. Puede cambiarse de analista, laboratorio, equipo y/o reactivos. El %CV de cada punto no debe ser mayor al 15%, excepto para el LIC donde no debe ser mayor a 20%.
<b>Exactitud</b>	Analizar en diferentes corridas, al menos por quintuplicado, 3 concentraciones dentro del rango de trabajo. Calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal. El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor al 15%, excepto para el LIC, donde no debe ser mayor al 20%
<b>Estabilidad</b>	Analizar al menos por quintuplicado los puntos control bajo y alto inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones de estabilidad. Se interpolan sus respuestas en curvas recién preparadas. La concentración obtenida debe de estar dentro del 15% de la concentración nominal. Se debe evaluar la estabilidad a corto y largo plazo y en ciclos de congelación-descongelación.
Probar las condiciones de temperatura, tiempo, etc, en las que se mantendrán las muestras durante el estudio.	



---

### **3 Justificación**

En los últimos años se ha observado un aumento en el número de incidencias de enfermedades complejas, entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas. Numerosos estudios proponen a la SAC como un potente fármaco para el tratamiento de diferentes enfermedades, dado su efecto antioxidante y neuroprotector. De la SAC se conoce su farmacocinética y se sabe que tiene una biodisponibilidad alta; sin embargo, no se han realizado estudios sobre la cantidad de SAC presente en diferentes regiones del cerebro. Únicamente existe un estudio en el que se cuantifica SAC en el cerebro total de rata.

La cuantificación de la SAC mediante HPLC se ha dificultado debido al tamaño pequeño y la alta polaridad de la molécula, por lo que se han empleado técnicas de HPLC/MS; sin embargo, en el laboratorio no se cuenta con este equipo y ha sido de gran importancia desarrollar un método de cuantificación con los recursos que se cuenta, es decir HPLC/UV con una bomba isocrática.

### **4 Hipótesis**

Dado que los mayores efectos farmacológicos de la SAC se han observado principalmente en células de hipocampo, se espera que sea esta región del cerebro donde se acumule una mayor cantidad de SAC, tras su administración intragástrica.



---

## 5 Objetivos

### Objetivo General:

Establecer cómo es la distribución de la SAC en estriado, corteza e hipocampo.

### Objetivos Particulares:

- Sintetizar y caracterizar la SAC.
- Desarrollar un método cromatográfico que permita cuantificar la SAC en diferentes regiones de cerebro de rata.
- Validar el método cromatográfico desarrollado apegándose a las especificaciones de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos (FDA, 2013).
- Cuantificar el nivel de la SAC tanto en animales sanos como en animales sometidos a 1 h isquemia y 24 h de reperusión tras la administración de una dosis de 1 g/kg por vía oral mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a UV (HPLC-UV).



---

## **6 Metodología**

### **6.1 Reactivos**

Para la síntesis de SAC se utilizaron clorhidrato de L-cisteína monohidratada, bromuro de alilo, etanol y sodio metálico de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Para el desarrollo y validación del método bioanalítico se ocuparon fenilisotiocianato (PITC), de Sigma Aldrich, metanol y acetonitrilo (ACN) grado HPLC pertenecientes a la marca comercial J.T. Baker.

Todos los demás reactivos fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

### **6.2 Síntesis de la SAC**

En un matraz de bola de 250 mL se colocaron 10.5 g de L-cisteína monohidratada en 180 mL de etanol absoluto con agitación constante. Se adicionaron 5.2 g de sodio metálico y cuando éste se disolvió se adicionaron 5.4 mL de bromuro de alilo y se dejó reaccionar durante 1 h. Se adicionó agua fría y se dejó reaccionando 1 h más. Posteriormente, se evaporó el exceso de etanol y se precipitó el compuesto con ácido acético glacial. El precipitado se filtró y se lavó con etanol frío.

#### **6.2.1 Caracterización de la SAC.**

El compuesto obtenido se caracterizó determinando su punto de fusión y enviándolo a infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN<sup>1</sup>H) y espectrometría de masas (EM), en la USAI, Facultad de Química, UNAM.

### **6.3 Animales**

Durante el desarrollo del protocolo se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar de 280-320 g de peso. Los animales se colocaron en cajas de acrílico, cada una con 6 ratas y se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura (25°C ±



---

3°C), humedad ( $50 \pm 10\%$ ) e iluminación (ciclos de 12 h luz-oscuridad). Los animales tuvieron libre acceso al alimento (LaboratoryRodentDiet 5001; PMI Feed Inc., Richmon, IN, USA) y agua. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. Protocolo 07/13 aprobado en el INNN. Durante el desarrollo experimental, se realizó el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

### **6.3.1 Modelo de isquemia**

La inducción de la isquemia cerebral se realizó mediante la oclusión de la arteria cerebral media siguiendo el método propuesto por Longa et al. (1989).

Los animales se anestesiaron en una cámara con una mezcla de isofluorano/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> 2.5/20/80%. La cirugía se inició con una incisión longitudinal de 1 cm en la región supraesternal en dirección cefálica para exponer la arteria carótida interna, externa y común. Se cauterizaron y cortaron las arterias occipital, tiroideas y pterigopalatina. Seguido de esto, se realizó tracción con una seda en la región distal del nacimiento de la arteria carótida externa, se cauterizó y cortó por arriba de la seda, de igual forma se realizó tracción a la región del nacimiento de la arteria carótida externa, omitiendo la cauterización. Por debajo de la sutura se colocó un clip y se realizó una micro incisión en la arteria carótida externa en el espacio comprendido entre las dos suturas por donde se introdujo un filamento de nylon (3-0) de 30 mm de longitud para llegar a la carótida interna y finalmente para bloquear el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media durante 1 h.

Transcurrido el tiempo de oclusión (isquemia), las ratas se anestesiaron nuevamente para retirar el filamento, dando inicio a la reperfusión.

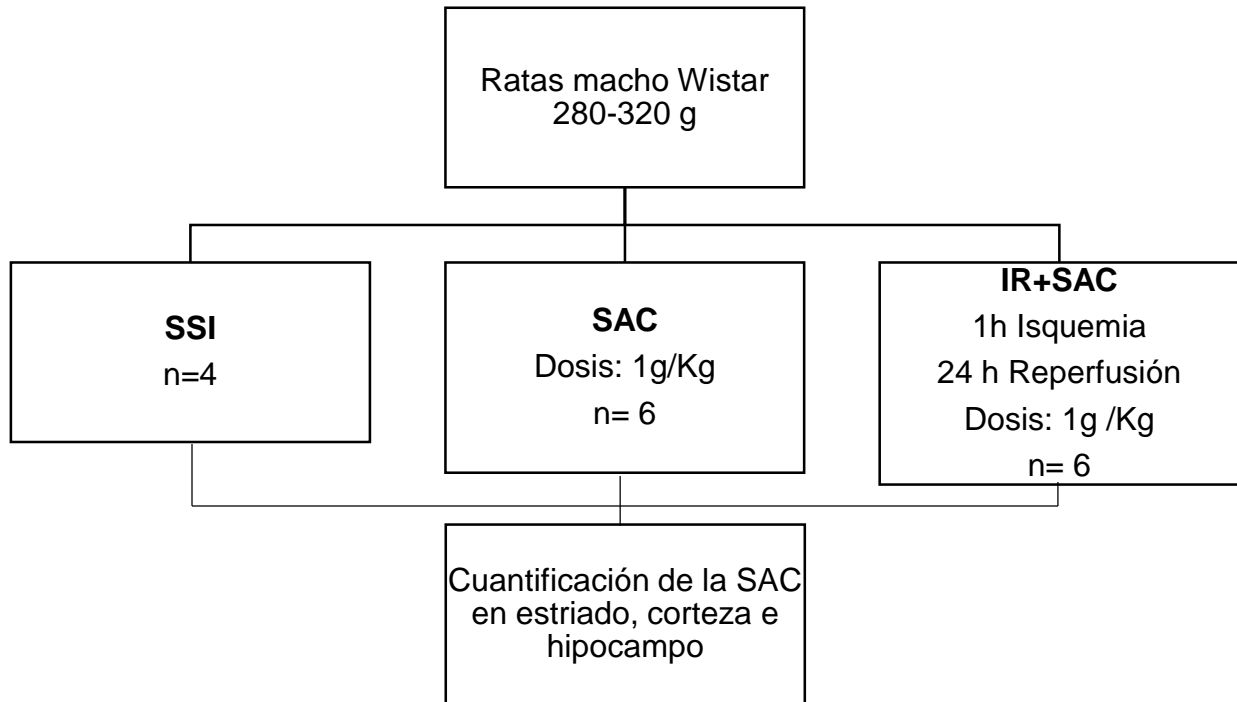


---

### **6.3.2 Animales para cuantificación de la SAC en el estriado, corteza e hipocampo**

Para el desarrollo y validación del método bioanalítico de cuantificación de la SAC fue necesario emplear muestras de tejido de animales sanos.

Posteriormente, se trabajó con tres grupos de animales (Figura 7). El primero, denominado como SSI fueron animales sanos, los cuales no fueron sometidos a isquemia cerebral. Se les administró solución salina isotónica y se sacrificaron 30 min después de la administración. El segundo grupo denominado como SAC fueron animales sanos, los cuales no fueron sometidos a isquemia cerebral. Se les administró una dosis de 1 g/kg de SAC por vía intragástrica y después de 30 min se sacrificaron para la extracción de estriado, corteza e hipocampo. El tercer grupo denominado IR+SAC fueron animales que se sometieron a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión, transcurrido este tiempo se les administró una dosis de SAC de 1 g/kg por vía intragástrica y después de 30 min se sacrificaron para la extracción del estriado, corteza e hipocampo.



**Figura 7.** Diseño experimental para la cuantificación de SAC en ratas

#### **6.4 Método bioanalítico para la cuantificación de SAC en cerebro de rata**

El desarrollo y validación del método bioanalítico se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca AGILENT 1260. Equipado con un detector UV-visible HPLC 1260 modelo G13148; un inyector automático HPLC 1260 modelo G1313A y una bomba isocrática HPLC 1260 modelo G131013.

El análisis cromatográfico cuantitativo se llevó a cabo empleando una columna Nova Pak HR C18 de 3.9 mm de diámetro interno, 300 mm de largo y 6 µm de tamaño de partícula interna.





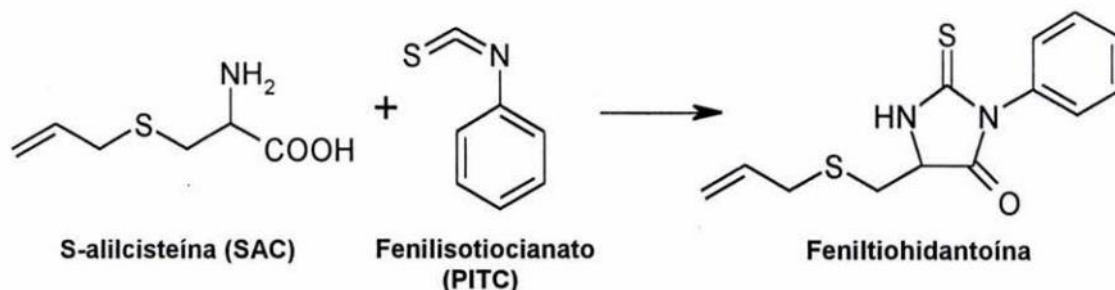
Como sistema de elución se empleó un sistema isocrático de ACN:H<sub>2</sub>O (50:50) a un flujo de 1.0 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL. La longitud de onda utilizada fue 254 nm.

#### 6.4.1 Preparación de las muestras de tejido y derivatización de la SAC

Cada tejido se homogenizó en metanol absoluto; se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min a 4°C y se extrajo el sobrenadante.

Se tomó una alícuota de 200 µL del sobrenadante obtenido en el punto anterior y se adicionaron 400 µL de metanol absoluto. La mezcla se agitó durante 20 s y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se liofilizó.

Al residuo obtenido de la liofilización se le agregaron 200 µL del reactivo PITC (metanol-trietilamina-fenilisotiocianato-agua 7:1:1:1) y se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 30 min para llevar a cabo la reacción de derivatización (Figura 8). Nuevamente la mezcla se liofilizó y el residuo obtenido se resuspendió en 1.0 mL de fase móvil (ACN:H<sub>2</sub>O 50:50).



**Figura 8.** Reacción de derivatización de la SAC con fenilisotiocianato (PITC)

#### 6.4.2 Evaluación del sistema

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se evaluaron la linealidad y precisión del sistema. Para ello se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de SAC en agua destilada. Las muestras se derivatizaron de acuerdo con lo indicado en el numeral 6.4.2.



---

#### **6.4.2.1 Precisión**

La precisión del sistema se determinó mediante el análisis de cinco réplicas de disoluciones preparadas en tres niveles de concentración (30, 400 y 900 µg/mL). Cada nivel se preparó a partir de una solución stock de 50 mg/mL de SAC.

#### **6.4.2.2 Linealidad**

La linealidad se determinó preparando tres curvas de calibración, con siete niveles de concentración de SAC (10, 50, 100, 200, 500, 800 y 1000 µg/mL). Cada curva se preparó partiendo de una solución stock de SAC de 50 mg/mL.

#### **6.4.3 Validación del método bioanalítico**

La validación del método bioanalítico se llevó a cabo de acuerdo con los criterios establecidos en la revisión 1 de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA en el 2013. De acuerdo con esta guía, los parámetros de desempeño que se deben evaluar para validar los métodos bioanalíticos cromatográficos son: selectividad, curva de calibración, precisión, exactitud, I recobro, límite inferior de cuantificación y estabilidad de la muestra.

Todas las muestras empleadas en la validación del método se prepararon a partir de un homogenizado de los tejidos de interés del cerebro de ratas sanas (estriado derecho, estriado izquierdo, corteza frontal derecha, corteza frontal izquierda, hipocampo derecho e hipocampo izquierdo). Los tejidos se prepararon de acuerdo con lo indicado en el numeral 6.4.1; posteriormente se añadió una alícuota de SAC de las soluciones de trabajo a diferentes concentraciones dependiendo de la concentración final de SAC deseada considerando que se resuspendieron en 1.0 mL de fase móvil. Las muestras se derivatizaron de acuerdo con lo indicado en el numeral 6.4.1.



#### **6.4.3.1 Selectividad**

Se analizaron blancos de muestra que contenían la matriz biológica sin la SAC con muestras que contenían la matriz biológica adicionando una cantidad conocida de SAC: 10 µg/mL (límite inferior de cuantificación) y 1000 µg/mL (límite máximo de cuantificación). Se compararon muestras que contenían el homogenizado de los seis tejidos: estriado derecho, estriado izquierdo, corteza frontal derecha, corteza frontal izquierda, hipocampo derecho e hipocampo izquierdo con muestras que contenían únicamente cada tejido.

#### **6.4.3.2 Límite inferior de cuantificación**

Para estimar el límite de cuantificación se realizaron diluciones seriales hasta encontrar la concentración mínima que presentara una respuesta identificable de por lo menos cinco veces la señal del ruido.

#### **6.4.3.3 Curva de calibración**

Se prepararon seis curvas de calibración en el intervalo de 10 a 1000 µg/mL. Los niveles de concentración empleados fueron: 10, 50, 100, 200, 500, 800 y 1000 µg/mL (Tabla 4) empleando un homogenado de estriado derecho e izquierdo, corteza frontal derecha e izquierda e hipocampo derecho e izquierdo de cerebro de rata. Las muestras fueron preparadas en el homogenizado de los seis tejidos y la SAC fue derivatizada de acuerdo con el numeral 6.4.1.

Cada curva se analizó en el sistema cromatográfico. Una vez obtenidos los datos analíticos se realizó una regresión lineal para evaluar este parámetro de desempeño del método.



**Tabla 4.** Preparación de las soluciones para las curvas de calibración analizadas en el sistema cromatográfico.

Concentración de la solución de trabajo (mg/mL)	Alícuota tomada ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad de SAC en la alícuota ( $\mu\text{g}$ )	Volumen final (mL)	Concentración final ( $\mu\text{g/mL}$ )
0.1	100	10	1.0	10
0.5	100	50	1.0	50
1	100	100	1.0	100
2	100	200	1.0	200
5	100	500	1.0	500
8	100	800	1.0	800
10	100	1000	1.0	1000

#### **6.4.3.4 Exactitud, precisión y recobro**

Para evaluar estos parámetros de desempeño se prepararon por quintuplicado muestras en tres niveles de concentración: 30  $\mu\text{g/mL}$  (bajo), 400  $\mu\text{g/mL}$  (medio) y 900  $\mu\text{g/mL}$  (alto).

Con los datos obtenidos se determinó la exactitud del método mediante el cálculo de la concentración recuperada, y del promedio de ésta, se obtuvo la desviación estándar respecto al valor nominal de las concentraciones evaluadas.

La precisión se estimó a través de la repetibilidad mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido con la concentración recuperada en las muestras a cada nivel de concentración.

Finalmente, para evaluar el recobro, se preparó adicionalmente una segunda serie de muestras en los mismos niveles de concentración, pero estas sin tejido, es decir, únicamente la alícuota de solución de SAC preparada en agua destilada. El recobro



se evaluó comparando las respuestas analíticas entre las muestras de SAC preparadas en tejido y las que únicamente fueron preparadas en agua destilada.

**Tabla 5.** Preparación de las soluciones inyectadas en el cromatógrafo para evaluar la precisión del sistema.

Concentración de la solución de trabajo (mg/mL)	Alícuota tomada ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad de SAC en la alícuota ( $\mu\text{g}$ )	Volumen final (mL)	Concentración final ( $\mu\text{g/mL}$ )
0.3	100	30	1.0	30
4	100	400	1.0	400
9	100	900	1.0	900

#### **6.4.3.5 Estabilidad de la muestra**

Se evaluó la estabilidad de las muestras a corto y largo plazo y también después de tres ciclos de congelación y descongelación.

Para evaluar el parámetro de estabilidad se prepararon las muestras por triplicado en tres niveles de concentración: 10, 400 y 900  $\mu\text{g/mL}$ . Con los resultados obtenidos se calculó la concentración recuperada, su desviación absoluta respecto al valor nominal y la desviación estándar.

- **Estabilidad a corto plazo**

Previo a su análisis cromatográfico las muestras se almacenaron a temperatura ambiente por 24 h.

- **Estabilidad a largo plazo**

Previo a su análisis cromatográfico las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 30 días.

- **Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación**



---

En esta condición, la estabilidad se evaluó en tres ciclos. El primer ciclo se evaluó congelando las series a  $-70^{\circ}\text{C}$ , lo cual ocurría entre 2 y 3 horas. Una vez congeladas las muestras se retiraron del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su descongelación total (tiempo promedio entre 15 y 20 min). Al término de este ciclo una alícuota de esta muestra se analizó en el sistema cromatográfico y el resto de la solución se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para iniciar el segundo ciclo. Este procedimiento se repitió hasta completar los tres ciclos.

### **6.5 Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron mediante una prueba de t-Student usando el software Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.



## 7 Resultados y Discusión

### 7.1 Síntesis de SAC

La síntesis de la SAC se realiza a través de una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular ( $SN_2$ ). La reacción se llevó a cabo para generar el anión del cloruro de L-cisteína en solución etanólica anhidra en presencia de sodio metálico, mismo que reaccionó con el electrófilo, el bromuro de alilo (Figura 8).

El compuesto se obtuvo como un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 221.5-222°C y un rendimiento de reacción del 60%. El punto de fusión reportado por Kodera et al. (2002) es de 222°C, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado previamente (Tabla 6).

En el espectro de IR (espectro 1) se observó en 3428  $cm^{-1}$  una banda ancha que pertenece al estiramiento de enlace N-H de una amina primaria, además de una banda en 2975  $cm^{-1}$  correspondiente a vibraciones C-H saturado; así mismo en 1614  $cm^{-1}$  se observó una banda característica correspondiente al ácido carboxílico y en 1585  $cm^{-1}$  una banda intensa de vibración C=C.

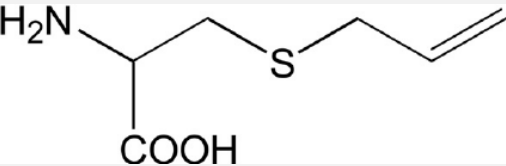
En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 2), se observan en 2.94 ppm y 3.05 ppm dos señales doble de dobles, que corresponden a dos protones del grupo CH<sub>2</sub> adyacente al átomo de azufre (c-β); en 3.20 ppm se observa un doblete que corresponde a los protones alílicos; en 3.89 ppm se aprecia un doble de dobles que integra para un protón que corresponde al protón α del grupo carbonilo. Entre 5.23 y 5.17 ppm se observa una señal múltiple que integra para dos protones pertenecientes a protones vinílicos terminales, también se observó una señal múltiple de 5.87 a 5.77 ppm que integra para un protón vinílico.

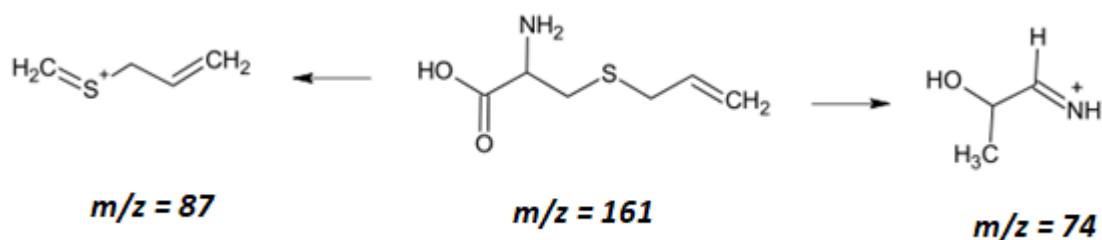
En el espectro de EM (Espectro 3), se observó el ión molecular en una relación masa/carga (m/z) de 161 m/z con una abundancia relativa del 8.18%, que corresponde al ión molecular de la SAC, así como un pico base en una m/z de 87 y



en 74, con una abundancia del 77.2%. El patrón de fragmentación sugerido para la SAC se muestra en la figura 9.

**Tabla 6.** Caracterización estructural de la SAC.

<b>COMPUESTO</b>	<b>SAC</b>
	<b>IR (KBr, cm<sup>-1</sup>)</b> 3428 (-NH), 2977(-CH sat), 1616 (-COO-), 1584(COO-), 926 (C-S-C).
<b>PUNTO DE FUSIÓN: 221.5-222.0°</b>	<b>RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)</b> H-β <sub>1</sub> 2.94 (dd, J= 7.6 Hz, 15 Hz, 1H) H-β <sub>2</sub> 3.05 (dd, J= 4.4 Hz, 14.8 Hz, 1H) -CH <sub>2</sub> -alílico 3.20 (d, J= 7.2 Hz, 2H) -H-α 3.89 (dd, J= 8 Hz, 4.4 Hz, 1H) =CH <sub>2</sub> 5.23-5.17 (m, 2H) -CH= 5.87-5.77 (m, 1H)
<b>RENDIMIENTO: 60%</b>	<b>EM (IE) m/z</b> 161 (M <sup>+</sup> , 8.18), 116(9.09), 89(58,18), 88(59.9), 87(100), 74(77.2), 45(14.5), 41(27.2), 39(10), C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> SO <sub>2</sub> N



**Figura 9.** Patrón de fragmentación sugerido para la SAC.





## 7.2 Método bioanalítico para la cuantificación de la SAC

### 7.2.1 Desarrollo del método

Para el desarrollo del método de cuantificación de la SAC en diferentes regiones del cerebro de rata se partió de lo reportado previamente (Maldonado, 2004) y de ahí se realizaron las modificaciones necesarias para obtener la resolución óptima.

Se consideró el espectro de absorción al UV de la SAC (Figura 10) para la elección de la longitud de onda de detección óptima; eligiéndose 254 nm como la longitud de detección, ya que es en ésta longitud donde se observa el máximo de absorción del derivado de la SAC.

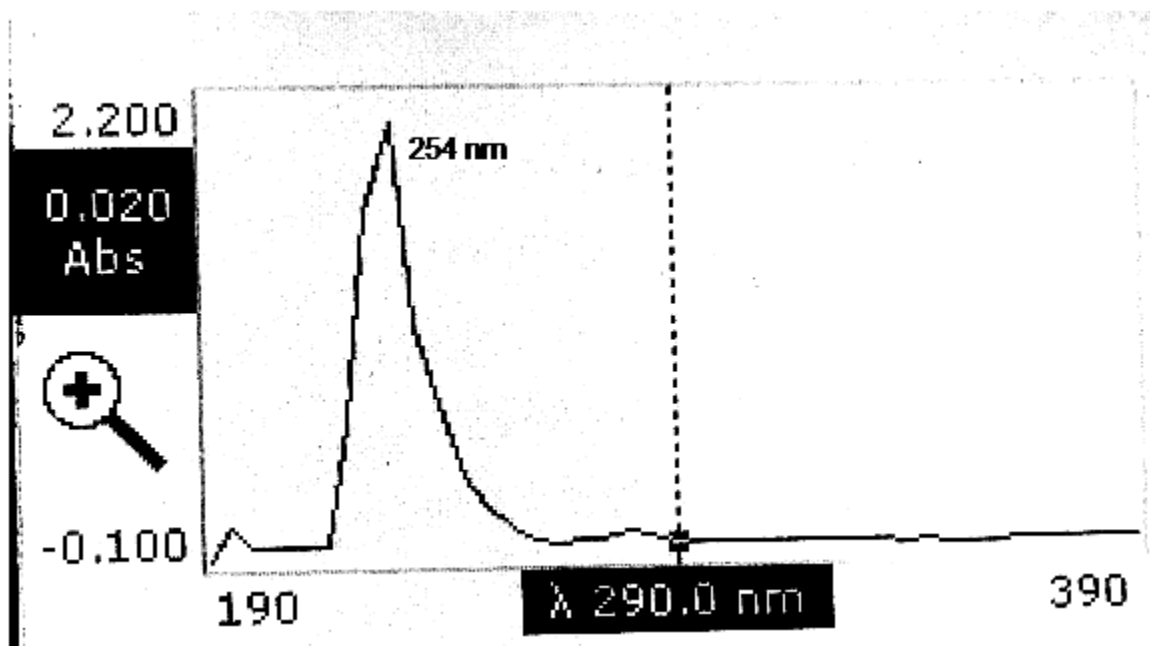


Figura 10. Espectro de absorción de la SAC al UV.



Las condiciones de análisis se muestran en la tabla 7:

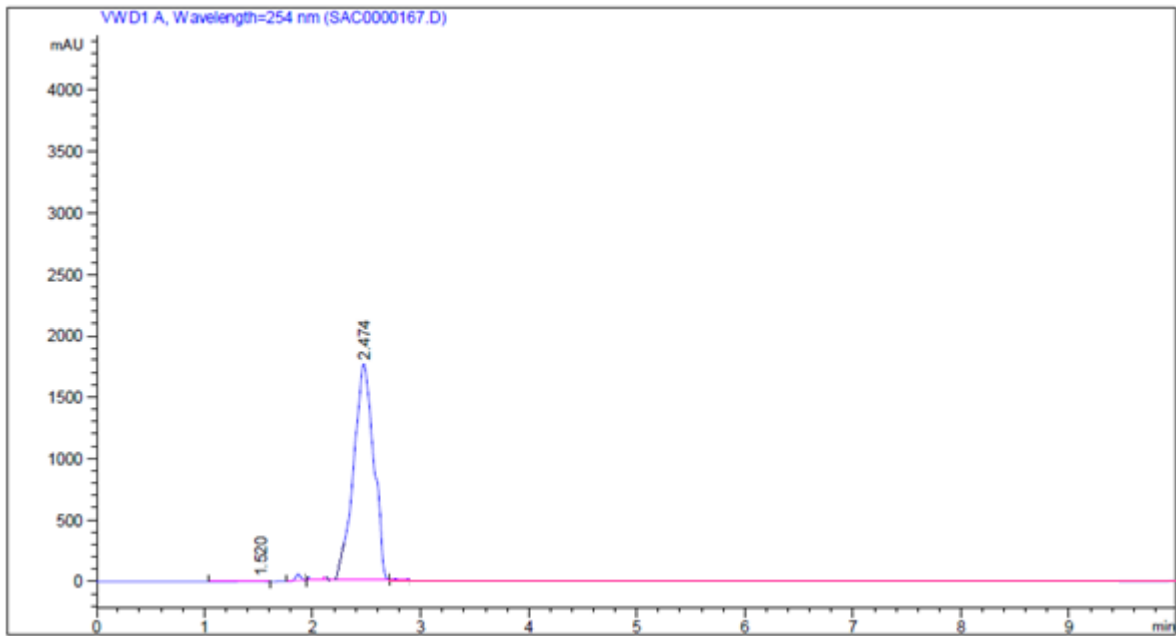
**Tabla 7.** Condiciones finales de análisis para la cuantificación de SAC mediante HPLC.  
*Fase Móvil* *Acetonitrilo:Agua (50:50)*

<i>Columna</i>	C <sub>18</sub>
<i>Volumen de inyección</i>	20 µL
<i>Flujo</i>	1.0 mL/min
<i>Longitud de detección</i>	254 nm

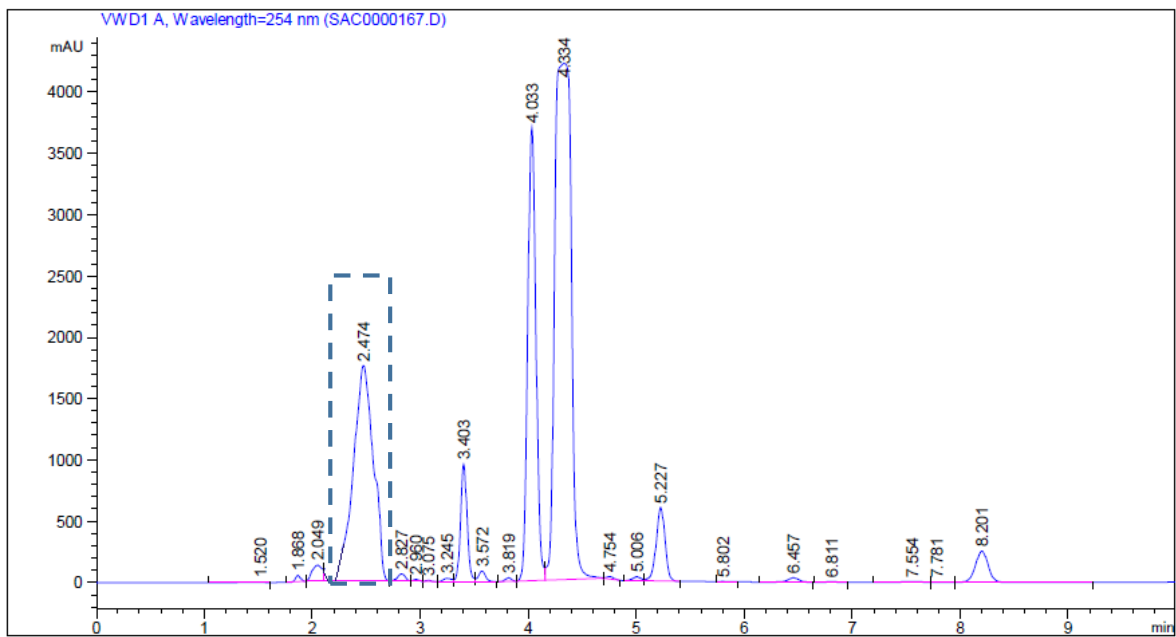
Empleando las condiciones cromatográficas mencionadas en la tabla 7, el tiempo de retención del compuesto de interés fue de 2.4 a 2.6 min.

En la figura 11 se muestra el cromatograma obtenido con una disolución acuosa de SAC y sometida al proceso de derivatización. En ésta figura se observa únicamente un pico a los 2.4 min, con lo cual se puede decir que el estándar de SAC con el que se trabajó está puro.

En la figura 12 se muestra el cromatograma obtenido con una disolución de SAC preparada en la matriz biológica (homogenado de estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata) y sometida al proceso de derivatización. En dicho cromatograma se observa el pico a los 2.4 min correspondientes al derivado de la SAC y adicionalmente aparecen otras señales que pueden estar asociadas con otros componentes de la matriz biológica.



**Figura 11** Cromatograma obtenido con el estándar de la SAC en disolución acuosa a una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$



**Figura 12.** Cromatograma obtenido con el estándar de la SAC preparado en la matriz biológica a una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$



## 7.3 Evaluación del sistema

### 7.3.1 Precisión

Con el cálculo del coeficiente de variación de la respuesta de cinco muestras se evaluó la precisión del sistema. El coeficiente de variación es un valor estadístico que representa la variabilidad inherente asociada con la respuesta analítica y que puede ser originada por el analista, el equipo, los instrumentos de medición, entre otros (ICH, 2005). De acuerdo con la tabla 8, se observa que el coeficiente de variación obtenido fue menor a 2.0% en los tres niveles de concentración que se evaluaron, por lo tanto, se puede decir que el sistema muestra una buena precisión.

**Tabla 8** Precisión del sistema para la cuantificación de SAC.

	Muestra control baja 30 $\mu\text{g/mL}$	Muestra control intermedia 400 $\mu\text{g/mL}$	Muestra control alta 900 $\mu\text{g/mL}$
1	87.21833	965.34189	2155.89723
2	88.32452	961.24381	2150.22165
3	88.11893	969.88724	2154.88261
4	86.44971	962.11742	2152.28369
5	85.32767	960.33873	2159.24123
Promedio	87.08783	963.7858	2154.5053
S	1.236421	3.897964	3.4566629
CV (%)	1.5	0.40	0.16

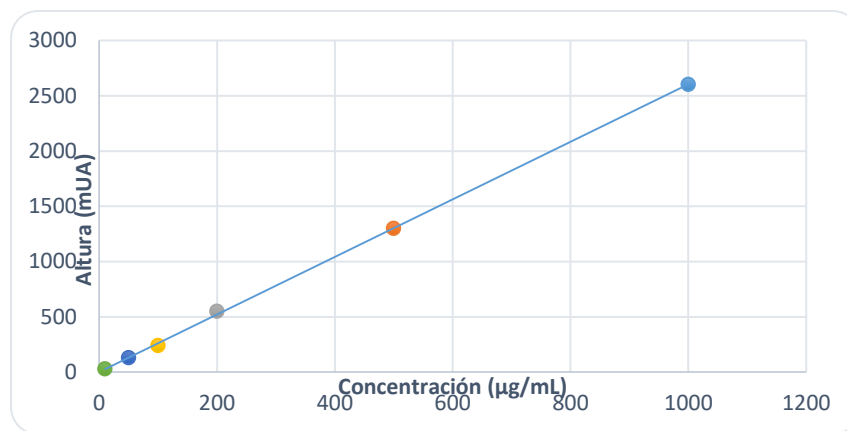
### 7.3.2 Linealidad

Se realizó una regresión lineal para ajustar las respuestas obtenidas por el analito en función de su concentración y así encontrar el modelo matemático que mejor describa este comportamiento. El comportamiento observado al relacionar la



concentración con la respuesta obtenida se muestra en la figura 13. En la cual, se observa que el coeficiente de correlación calculado fue mayor a 0.999, indicando con ello que existe una relación relativamente fuerte entre las variables. Asimismo, en la tabla 9 se muestra el valor del intercepto y la pendiente, así como sus intervalos de confianza.

Con base en estos resultados se concluye que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones de 10 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 13** Gráfica que muestra la linealidad del sistema para cuantificar el derivado de la SAC.

Ecuación que describe el modelo:  $2.602x+1.656$

Coefficiente de correlación (r):0.9997

Coefficiente de determinación ( $r^2$ ):99.7%



**Tabla 9** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar la SAC.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	1.656	0.070	-10.946	9.834
Pendiente	2.602	3.742	0.376	0.396

## 7.4 Validación del método

La validación de métodos bioanalíticos incluye la demostración de que todos los procedimientos de un método en particular, usado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada, son confiables y reproducibles para el uso que se pretende (FDA, 2013).

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño evaluados:

### 7.4.1 Selectividad

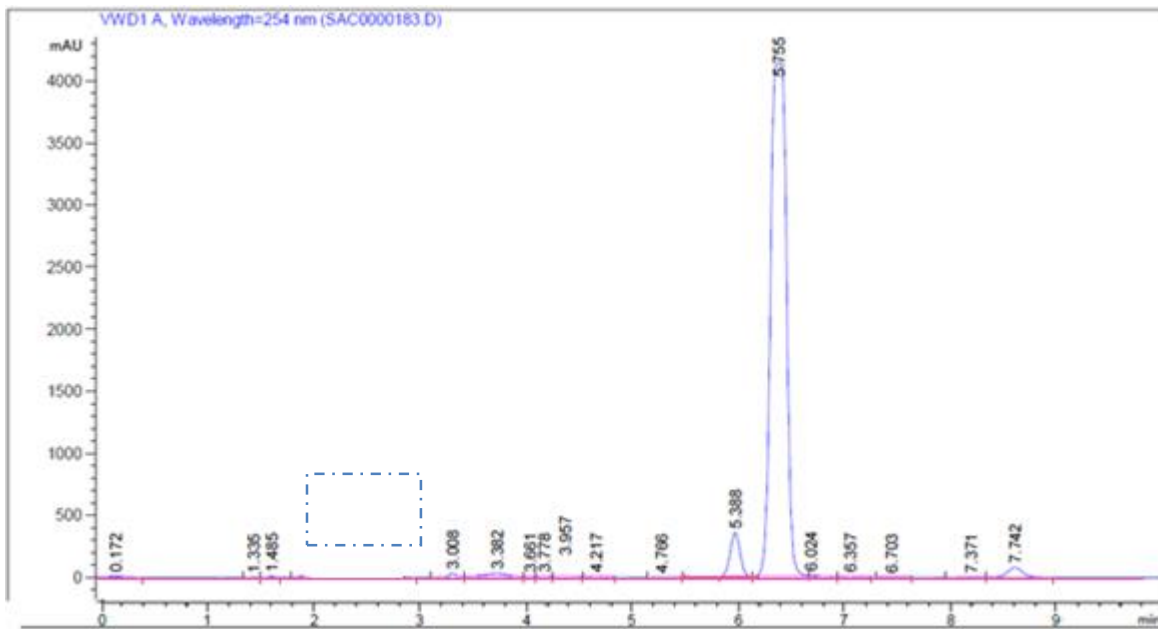
La selectividad es la capacidad de un método analítico para cuantificar y diferenciar el analito en presencia de otros compuestos presentes en la muestra. Entre las sustancias que pueden interferir se encuentran compuestos endógenos de la matriz biológica y los productos de degradación (FDA,2013).

En las figuras 14-19 se muestran: el cromatograma obtenido de la matriz biológica (Figura 14); la coelución de una disolución acuosa de SAC derivatizada (100 µg/mL) y una muestra de SAC preparada en el homogenado de estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata y derivatizada (100 µg/mL) (Figura 15); una muestra del derivado de la SAC en un homogenado de estriado, corteza e hipocampo (Figura 16); una muestra del derivado de la SAC en estriado (Figura 17); una muestra del

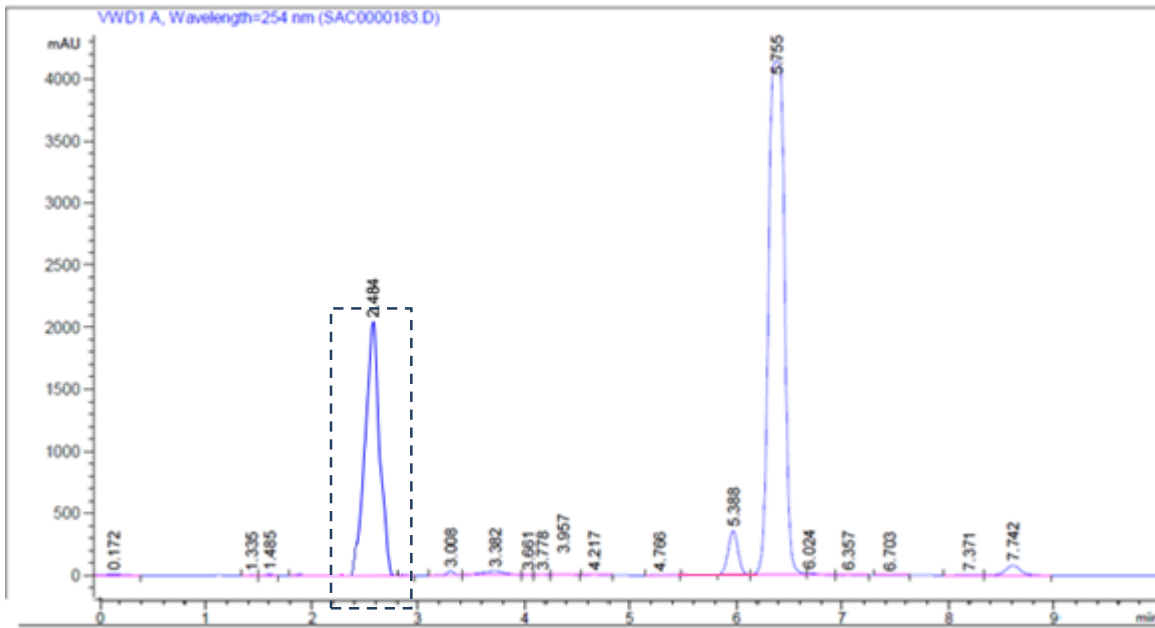


derivado de la SAC en corteza (Figura 18) y una muestra del derivado de la SAC en hipocampo (Figura 19).

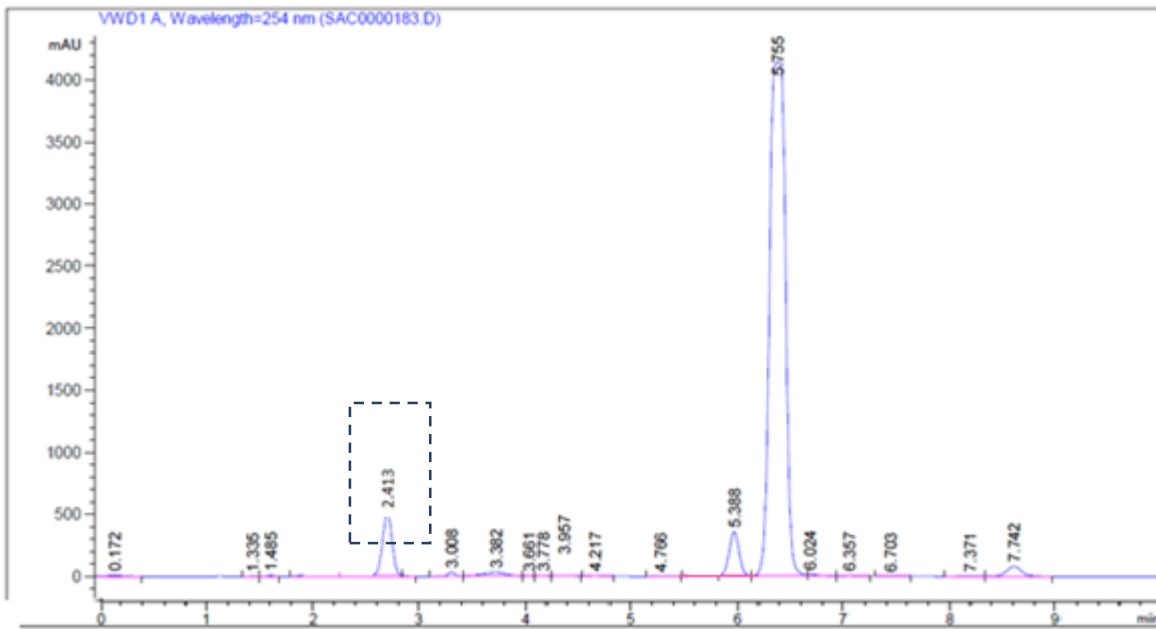
No se observa ninguna señal en tiempo 2.1-2.9 min en la matriz biológica (Figura 14), dentro del cual se encuentra el pico correspondiente al analito de interés. Mientras que puede observarse un pico entre 2.4 y 26 min en los homogenados de los diferentes tejidos estudiados (Figuras 16-19).



**Figura 14** Muestra que contiene únicamente la matriz biológica (estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata). No se observa ninguna señal en el tiempo 2.1-2.9 min, dentro del cual se encuentra el pico correspondiente al analito de interés.

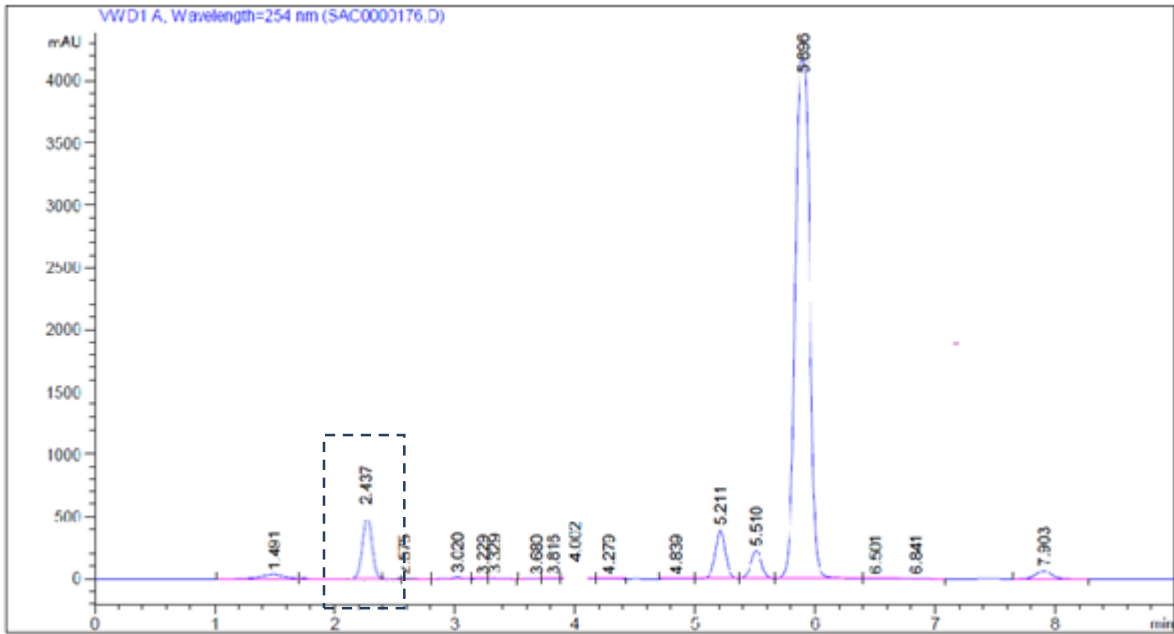


**Figura 15** Muestra que representa la coelución de una disolución acuosa de SAC (100 µg/mL) y una disolución de SAC preparada en la matriz biológica (100 µg/mL).

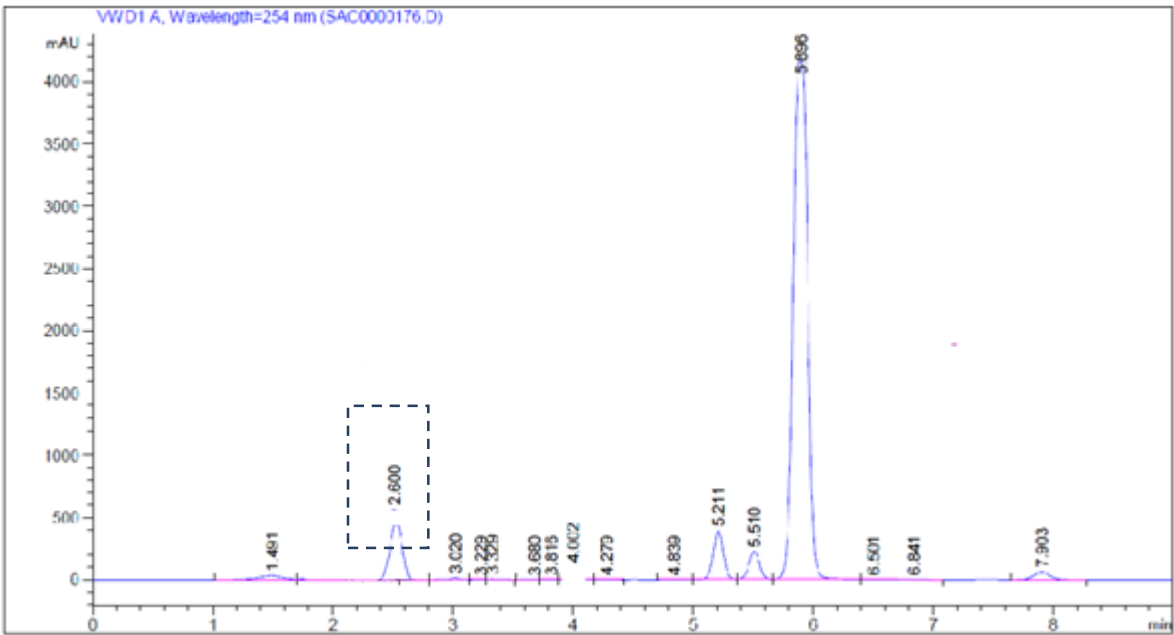


**Figura 16** Muestra que contiene el derivado de la SAC en el homogenado de una mezcla de estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata.

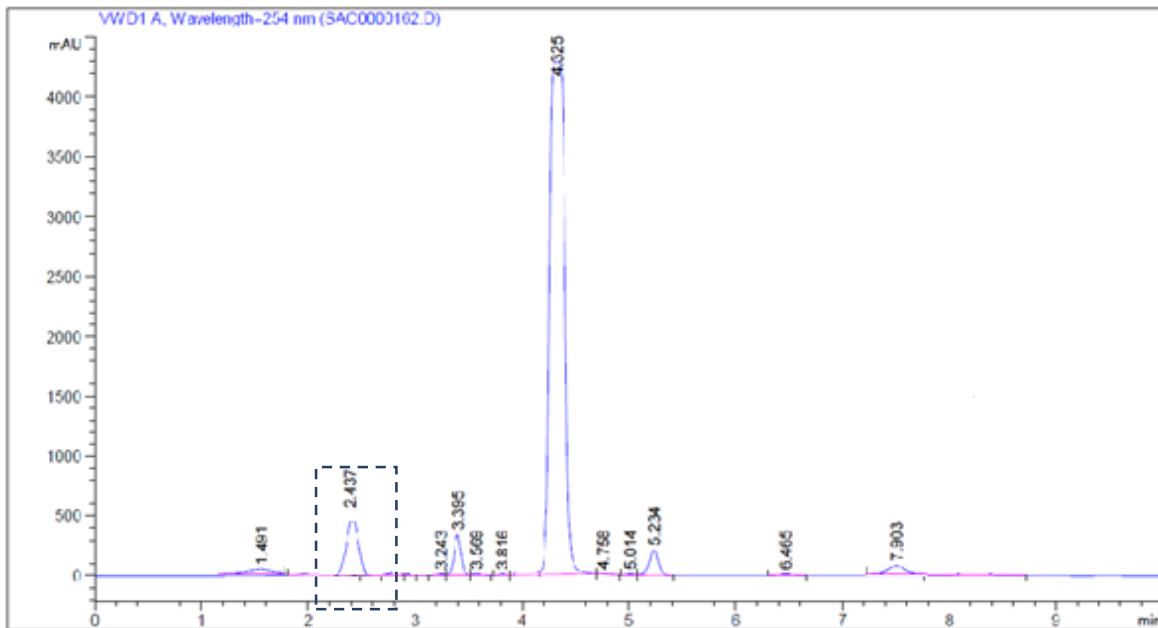




**Figura 17** Muestra que contiene el derivado de la SAC en homogenado de estriado de cerebro de rata.



**Figura 18** Muestra que contiene el derivado de la SAC en el homogenado de corteza de cerebro de rata.



**Figura 19** Muestra que contiene el derivado de la SAC en el homogenado de hipocampo de cerebro de rata.

De acuerdo con los cromatogramas presentados en la figuras 14-19 se observa que no hay interferencia por parte de los reactivos en la cuantificación del analito una vez que éste ha sido derivatizado. Por otro lado, no existe diferencia entre los cromatogramas de las muestras que se presentan en un homogenado de estriado, corteza e hipocampo en comparación con las muestras preparadas únicamente en un tejido, lo anterior sugiere que el método analítico nos permitirá cuantificar el analito en las regiones del cerebro de rata que son de nuestro interés. Con base en estos resultados la validación del método fue realizada empleando un homogenado de los tres tejidos de interés (estriado, corteza e hipocampo), siguiendo el proceso descrito en el numeral 6.4.1 para la preparación de los tejidos y derivatización de la SAC.



#### 7.4.2 Límite inferior de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de desempeño del método analítico que determina la capacidad cuantitativa del método a bajas concentraciones de la muestra.

La concentración mínima en la cual la señal es por lo menos cinco veces mayor que la señal del ruido fue 10 µg/mL. En la tabla 10 se presentan los resultados para la precisión y exactitud del límite inferior de cuantificación de la SAC. Como se puede apreciar en la tabla 10, la precisión y la exactitud para el límite de cuantificación de la SAC presentan valores de 0.83 y 3.24, respectivamente. La variación obtenida fue menor al 20% y la desviación de la media de la concentración recuperada respecto a su valor nominal también es menor al 20%. Por lo tanto, los resultados cumplen con los requerimientos especificados en la guía de validación para establecer esta concentración como límite de cuantificación.

**Tabla 10.** Precisión y exactitud del límite inferior de cuantificación de la SAC.

No. De muestra	Concentración recuperada (µg/mL)
1	10.49
2	10.27
3	10.32
4	10.28
5	10.26
Promedio	10.32
DE	0.085
CV (%)	0.83
Exactitud (%)	3.24

DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.



### 7.4.3 Curva de calibración

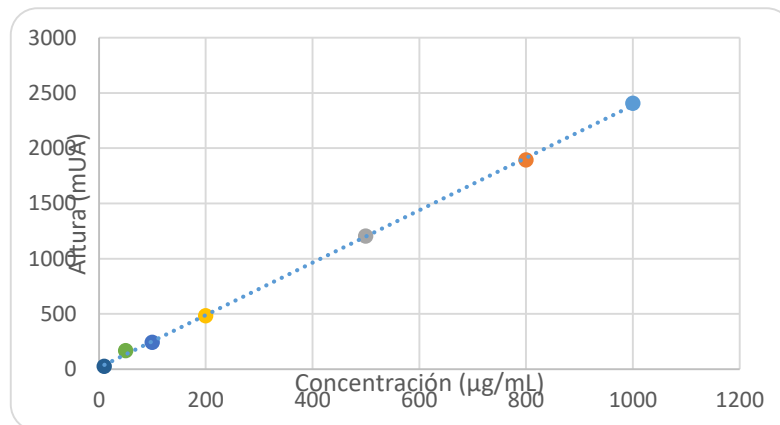
El intervalo de concentraciones en el que se evaluó la linealidad se estableció con base en la concentración máxima esperada y el límite de cuantificación.

Las muestras utilizadas fueron preparadas en un homogenado de estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata sana.

En la figura 20 se ilustra la relación existente entre el área y la concentración del analito de interés. Con base en esto, se puede concluir que la respuesta obtenida para el analito es directamente proporcional a su concentración.

El análisis de los datos mediante una regresión lineal permitió estimar un coeficiente de correlación mayor a 0.999, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Así mismo, en la tabla 11 se muestra el valor del intercepto y la pendiente, así como sus intervalos de confianza.



**Figura 20** Gráfica de linealidad del método bioanalítico para cuantificar el derivado de la SAC.



Ecuación que describe el modelo:  $2.374 \cdot \text{Concentración} + 13.877$

Coefficiente de correlación (r): 0.9996

Coefficiente de determinación ( $r^2$ ): 99.96%

**Tabla 11.** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar la SAC.

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	13.877	1.306	-15.19	42.94
Pendiente	2.374	0.0214	2.32	2.43

#### 7.4.4 Precisión y exactitud

La precisión del método se evaluó con base en la repetibilidad. En la tabla 12 se presentan los valores de los coeficientes de variación calculados para el análisis de las muestras de la SAC en los tres niveles de concentración. En todos los casos el coeficiente de variación obtenido fue menor al 3%. Por consiguiente, la variación obtenida está dentro de los límites permitidos por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA y que debe ser menor a 15%.

En la misma tabla 12 se presentan los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método. La diferencia absoluta entre el promedio del porcentaje recuperado y el valor nominal es menor al 3% en los tres niveles de concentración evaluados. De esta manera los resultados cumplen con la especificación establecida en la guía, la cual indica que la diferencia absoluta debe ser menor al 15%.



Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que el método presenta buena exactitud y precisión para cuantificar la SAC en los tejidos cerebrales empleados.

**Tabla 12.** Resultados para la precisión y exactitud del método bioanalítico para la cuantificación de la SAC.

No. muestra	Concentración recuperada ( $\mu\text{M}$ )		
	Muestra control baja 30 $\mu\text{M}$	Muestra control media 400 $\mu\text{M}$	Muestra control alta 900 $\mu\text{M}$
1	30.01	400.02	900.52
2	29.98	399.98	899.68
3	30.04	400.17	900.13
4	30.05	400.24	900.15
5	30.14	400.80	900.96
Promedio	30.04	400.24	900.30
DE	0.05	0.30	0.43
CV (%)	0.18	0.07	0.05
Exactitud (%)	0.0013	0.0006	0.0003
Diferencia con el valor nominal	0.15	0.06	0.03

#### 7.4.5 Recobro

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos al evaluar el recobro en la matriz biológica (mezcla de homogenado de estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata sana). Los promedios obtenidos con las respuestas de cada analito en la matriz biológica y en la fase móvil son similares; por consiguiente, los porcentajes de recobro calculado son cercanos al 100% en los tres niveles de concentración. De acuerdo con los valores de los coeficientes de variación calculados, se observa además, que el recobro es preciso y consistente para la



cuantificación de la SAC. De esta manera, los resultados cumplen con lo emitido por la FDA.

**Tabla 13.** Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método bioanalítico de cuantificación de la SAC.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\bar{x}$ Altura del analito en Fase Móvil	$\bar{x}$ Altura del analito en la matriz biológica	$\bar{x}$ Recobro (%)
30	85.097	85.062	99.96
400	964.477	964.325	99.98
900	2150.465	2150.393	100.00
		Promedio	99.98
		DE	0.02
		CV (%)	0.02

DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

#### 7.4.6 Estabilidad de la muestra

En la tabla 14 se presentan los resultados que se obtuvieron al evaluar la estabilidad de las muestras en diferentes condiciones. La media de la diferencia absoluta respecto al valor nominal se encuentra entre 13.32 y 0.12% para la muestra control baja, entre 1.00 y 0.04% para la muestra control intermedia y entre 0.44 y 0.02% para la muestra control alta. De acuerdo con la guía de validación de métodos bioanalíticos la muestra es estable si el porcentaje de variación es menor al 15%. De ahí se deduce que las muestras de SAC son estables bajo las condiciones evaluadas.



**Tabla 14.** Resultados de estabilidad de la SAC bajo diferentes condiciones.

	Muestra control baja 30 µg/mL		Muestra control intermedia 400 µg/mL		Muestra control alta 900 µg/mL	
	Media concentración recuperada ± S (µg/mL)	Diferencia respecto al VN (%)	Media concentración recuperada ± S (µg/mL)	Diferencia respecto al VN (%)	Media concentración recuperada ± S (µg/mL)	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24 h a Tamb	30.04±0.02	0.12	400.02±0.01	0.04	900.02±0.01	0.02
Ciclo 1 Congelación-Descongelación	29.05±0.01	3.14	399.08±0.06	0.24	899.03±0.01	0.11
Ciclo 2 Congelación-Descongelación	29.06±0.01	3.13	399.07±0.03	0.23	899.03±0.01	0.11
Ciclo 3 Congelación-Descongelación	28.05±0.01	6.49	398.08±0.02	0.48	898.02±0.01	0.22
Estabilidad a largo plazo	26.0±0.01	13.32	396.0±0.03	1.00	896±0.04	0.44

En este trabajo se llevó a cabo la validación del método bioanalítico para la cuantificación de la SAC en diferentes regiones del cerebro de rata. Este trabajo muestra evidencia documentada de que el método implementado cumple con los fines para los cuales fue diseñado.

Hasta ahora se han descrito diferentes métodos de cuantificación para la SAC empleando diferentes técnicas, principalmente HPLC acoplado a diferentes detectores como masas; sin embargo, fue necesario desarrollar un método utilizando un detector de UV, dados los recursos con los que se cuenta en el laboratorio. El desarrollo de este método implicó llevar a cabo un proceso de derivatización de la SAC para su detección.





---

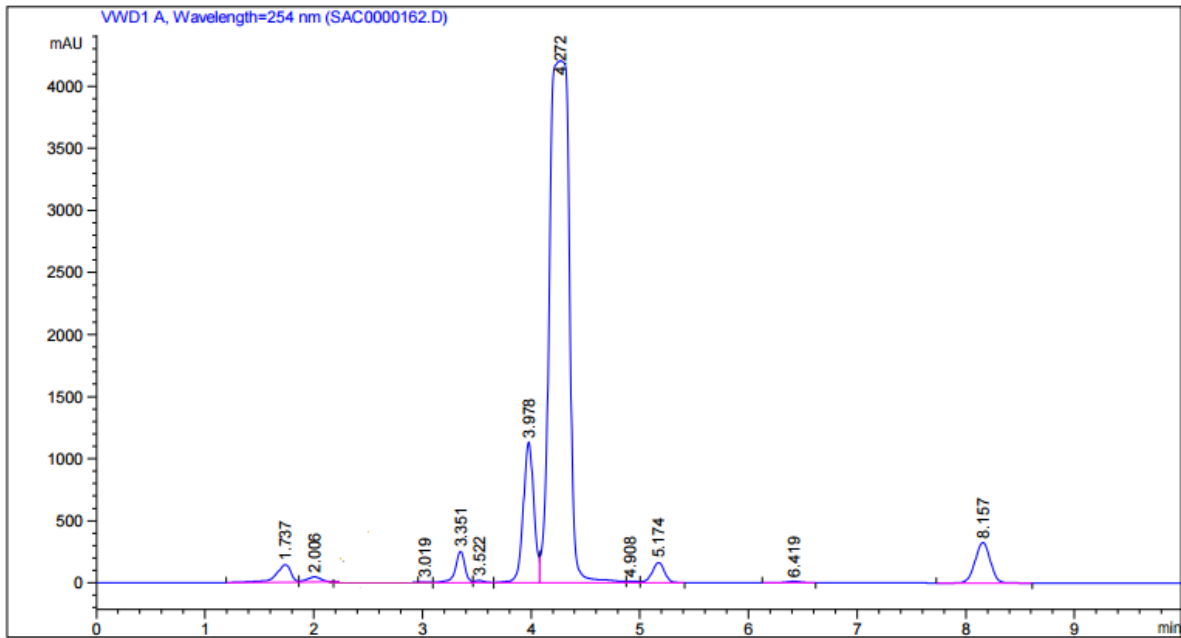
## 7.5 Cuantificación de la SAC en el estriado, corteza e hipocampo de cerebro de rata

Se cuantificó la cantidad de SAC presente en el estriado derecho, estriado izquierdo, corteza derecha, corteza izquierda, hipocampo derecho e hipocampo izquierdo de rata. Se trabajó con muestras de 3 grupos de animales, los cuales fueron administrados por vía intragástrica como se menciona a continuación: 1) Grupo control (n=4), se le administró solución salina isotónica únicamente; 2) grupo SAC (n=6), se le administró SAC disuelta en solución salina isotónica (1 g/kg); 3) grupo IR+SAC (n=6), los animales se sometieron a 1 h de isquemia y 24 h de reperfusión, transcurrido este tiempo se les administró SAC disuelta en solución salina isotónica (1 g/kg).

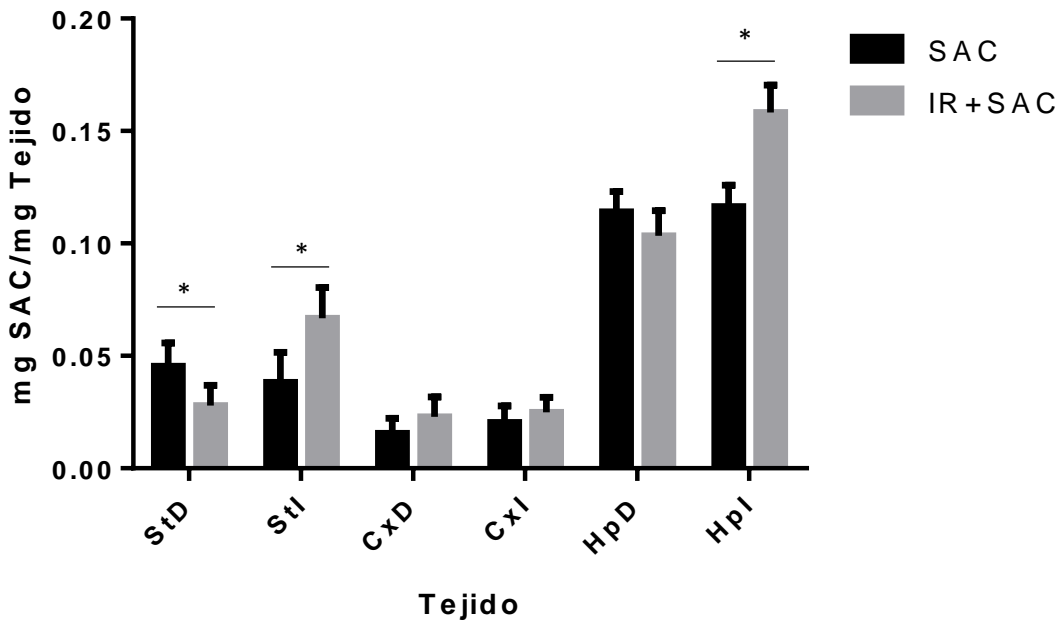
Todos los animales se sacrificaron 30 min después de la administración de la solución salina isotónica o de la SAC.

La figura 21 muestra que no se detectaron niveles de SAC (tiempo entre 2 y 3 min del cromatograma) al realizar un homogenado de las 3 regiones estudiadas (estriado, corteza e hipocampo) de los animales del grupo control.

Por otro lado, la figura 21 muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de la SAC en los grupos SAC e IR+SAC, que recibieron este compuesto en ausencia y presencia de isquemia.



**Figura 21** Cromatograma obtenido de las muestras del grupo control (administrados con solución salina isotónica) en homogenizado de estriado, corteza e hipocampo.



**Figura 22** Cuantificación de la SAC en estriado derecho (StD), estriado izquierdo (StI), corteza derecha (CxD), corteza izquierda (CxI), hipocampo derecho (HpD) e hipocampo izquierdo (HpI) de cerebro de rata sin isquemia y en condiciones de isquemia/reperfusión tras la administración de la SAC (1g/Kg).

Es importante resaltar que la cuantificación de la SAC en diferentes regiones del cerebro de rata (estriado, corteza e hipocampo) no se ha reportado por algún otro grupo de investigación, ya que únicamente existen estudios en los cuales se cuantifican los niveles de SAC en homogenado de cerebro total de rata.

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media (isquemia/reperfusión) al que fueron sometidos los animales consiste en la inserción de un filamento que reduce el flujo sanguíneo de la arteria cerebral media en el hemisferio izquierdo del cerebro, dañándose el estriado izquierdo, la corteza izquierda y en algunas ocasiones el hipocampo izquierdo. Mientras que estas mismas regiones, pero del hemisferio derecho pueden ser empleadas como control.



---

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 22, se observa que sin isquemia (barras negras) existe una mayor acumulación de la SAC en el hipocampo en comparación con el estriado y la corteza, siendo ésta última la región que muestra la menor cantidad de SAC.

Por otro lado, bajo condiciones de isquemia/reperfusión (barras grises), se observa un aumento significativo en la cantidad de SAC que se acumula en los tejidos de estriado e hipocampo izquierdos, en comparación con los tejidos obtenidos del mismo lado, pero sin isquemia/reperfusión (Figura 22). Esto probablemente podría deberse a la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) que se presentan en el evento de isquemia/reperfusión. Sin embargo, esta hipótesis aún debe ser evaluada.

La BHE es una barrera física y metabólica localizada en los capilares. Está compuesta por la unidad neurovascular que incluye células endoteliales, astrocitos, pericitos, neuronas y una matriz extracelular alrededor de los vasos (Yang et al., 2011). Existe otra barrera anatómica y fisiológica importante en el metabolismo de las células del sistema nervioso central, llamada lámina basal; ésta barrera expresa un gran número de canales iónicos y transportadores (Mehta, 2007).

Al mantener la homeostasis en el sistema nervioso, la BHE provee protección a las células neuronales contra moléculas neurotóxicas que se encuentren en la circulación al transportar selectivamente únicamente moléculas requeridas para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso.

La permeabilidad de la BHE está regulada en respuesta a varios estímulos o estresores, los cuales pueden ejercer efectos positivos o negativos. La permeabilidad de la BHE se puede incrementar por dos procesos. El primero es el transporte paracelular, el cual está asociado con la pérdida de las uniones estrechas entre las células endoteliales. La expresión de ocludina, un componente de las uniones estrechas, es altamente suprimida por diferentes patologías, incluyendo el estrés oxidativo. Una disminución en la expresión de ocludina resulta en el



---

incremento de la permeabilidad de la BHE (Ramirez et al., 2009; Lochhead et al., 2010). El segundo proceso involucra un desbalance en el transporte de nutrientes a través de la BHE, en el cual está involucrada la formación de vesículas en las células endoteliales del cerebro (Revisado en Saunders et al., 2012; Siegenthaler et al., 2013).

Sabiendo que durante la reperusión se generan una gran cantidad de ERO y ERN y por lo tanto estrés oxidante, se podría esperar un incremento en la permeabilidad de la BHE (Yang et al., 2011), lo cual a su vez favorece el desbalance del paso de nutrientes al cerebro, permitiendo el paso de diferentes moléculas, entre ellas, probablemente la SAC y debido a esto se observa una mayor acumulación del compuesto en los animales que han sido sometidos a isquemia.

Por otro lado, se sabe que en la BHE existen diferentes transportadores responsables del paso de moléculas al cerebro; en cuanto a los aminoácidos el principal transportador en células endoteliales cerebrales son los L1 que transportan aminoácidos neutros (Abbott et al., 2010; Hawkins et al., 2006).

El transportador L1 media el transporte de leucina, isoleucina, triptófano, valina, tirosina, fenilalanina, metionina y treonina. Bajo condiciones fisiológicas normales estos aminoácidos compiten por el transportador L1. En cuanto al sistema y+, este media el transporte de aminoácidos como lisina, arginina y ornitina (Hawkins et al., 2006).

Adicionalmente, las células endoteliales de cerebro expresan un transportador dependiente de sodio que transporta aminoácidos pequeños neutros (ASCT) como alanina, cisteína, serina, glicina, treonina, valina, leucina, isoleucina y metionina (Abbott et al. 2010; Pardridge et al., 2005; Revisado en Zlokovic, 2008). La SAC al ser un análogo de la cisteína, probablemente llegue al cerebro mediante este tipo de transportadores.



---

Los sistemas transportadores mantienen la concentración de aminoácidos en el cerebro al 10% de la concentración del aminoácido en plasma (Revisado en Zlokovic, 2008); sin embargo, al existir un desbalance en la BHE es probable que estos transportadores no funcionen de manera adecuada y permitan el paso descontrolado de moléculas.

Por otro lado, un resultado que llama la atención es el hecho de que el hipocampo es la región cerebral estudiada donde existe una mayor acumulación de la SAC en comparación con los otros tejidos tanto en condiciones de isquemia/reperfusión como en condiciones normales, sugiriendo que el uso de este compuesto podría ser relevante en aquellos padecimientos asociados al hipocampo como la enfermedad de Alzheimer u otras demencias, e incluso el infarto cerebral (Revisado en Colín-González et al., 2012).

Otro hecho que llama la atención es que el hipocampo de animales control muestra una mayor cantidad de 8-hidroxideoxiguanosina (marcador de daño al DNA por las ERO) en comparación con el estriado y la corteza (Franco-Enzástiga et al., 2017); sugiriendo que la acumulación de la SAC en el hipocampo podría estar relacionada con los mayores niveles de daño oxidativo que se observan en esta región.

La corteza y el estriado son otras dos regiones del cerebro que se ven afectadas cuando los animales se someten a un proceso de isquemia/reperfusión, sin embargo, únicamente en el estriado izquierdo se observó un aumento significativo en la cantidad de SAC presente después del evento de isquemia/reperfusión; probablemente debido a que el estriado es una de las principales regiones afectadas debido a la cirugía implementada.



---

## 8 Conclusiones

El método de cuantificación desarrollado cumplió con las especificaciones establecidas por la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA en 2013, por lo tanto el método cumple con el fin para el cual fue diseñado.

El hipocampo es la región cerebral donde se acumula una mayor cantidad de SAC en animales sanos.

La isquemia/reperfusión induce una mayor acumulación de SAC en hipocampo y estriado, izquierdo probablemente debido a un aumento en la permeabilidad de la BHE.



---

## 9 Referencias

Aged Garlic Extract. 2006. Research Experts from peer Reviewed Scientific Journals and Scientific Meetings, Wakunaga of America, USA.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* Vol. 37, pp. 13-25.

Alfieri A, Srivastava S, Siow RC, Modo M, Fraser PA, Mann GE. 2011. Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke. *J. Physiol.* Vol. 598, pp. 4125-4136.

Alfieri A, Srivastava S, Siow RC, Cash D, Modo M, Duchen MR, Fraser PA, Williams SC, Mann GE. 2013. Sulforophane, preconditioning of the Nrf2/OH-1 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disruption and neurological deficits in stroke. *Free Radic Biol Med.* Vol. 65, pp. 1012-1022.

Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* Vol 131, pp. 955S-962S.

Amano H, Daichi K, Kenji I. 2014. Pharmacokinetics of S-allyl-L-cysteine in rats is characterized by high oral absorption and extensive renal reabsorption. *J Nutr.* Vol, pp. 317-324.

Amano H, Kazamori D, Itoh K, Kodera Y. 2015. Metabolism, Excretion of S-Allyl-L-Cysteine in Rats and Dogs. *Drug Met. Dis.* Vol. 43, pp. 749-755.

Ashafaq M, Khan MM, Shadab Raza S, Ahmad A, Khuwaja G, Javed H, Khan A, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. 2012. S-allylcysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutr Res.* Vol. 32, pp. 133-143.





---

Atif E, Yousuf S, Agrawal SK. 2009. S-allylcysteine diminishes cerebral ischemia-induced mitochondrial dysfunctions in hippocampus. *Bra Res*. Vol. 1265, pp. 128-137.

Bautista SM, Garza LP. 2016. Evaluación de la toxicidad subcrónica de la S-alilcisteína en *rattus novergicus wistar* macho: reporte de parámetros bioquímicos y morfológicos. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Block E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci Ame*. Vol. 252, pp. 114-119.

Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr*. Vol 131, pp. 1010-1015.

Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke MC, Nwachukwu ID, Slusarenko AJ. 2014. Allicin: Chemistry and biological properties. *Molec*. Vol. 19, pp. 12597-12618.

Bröer S. 2008. Aminoacid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev*. Vol. 88, pp. 249-286.

Rojas P, Serrano-García N, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Ruiz-Sánchez E. 2011. S-allylcysteine, a garlic compound, protects against oxidative stress in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism in mice. *J. Nutr Biochem*. Vol. 22, pp. 937-944.

Colín-González Ana L, Santana Ricardo A, Silva-Islas Carlos A, Chánez-Cárdenas Maria E, Santamaría Abel, Maldonado Perla D. 2012. Review Article. The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract and S-allylcysteine induced protection. *Oxid Med and Cell Long*. Vol. 2012, pp. 1-16.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischemic stroke: an integrative view. *Trends Neurosci*. Vol. 22, pp. 391-397.



---

Franco-Enzástiga U, Santana-Martínez RA, Silva-Islas CA, Barrera-Oviedo D, Cháñez-Cárdenas ME, Maldonado PD. 2017. Chronic Administration of S-Allylcysteine Activates Nrf2 Factor and Enhances the Activity of Antioxidant Enzymes in the Striatum, Frontal Cortex and Hippocampus. *Neurochem Res.* Vol. , pp. 1-11.

García E, Villeda-Hernández J, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Santamaría A. 2010. S-allylcysteine reduces the MPTP-induced striatal cell damage via inhibition of pro inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase expressions in mice. *Phytomed.* Vol. 18, pp. 65-73.

Hahn G. 1996. History, folk medicine, and legendary uses of garlic. The science and therapeutic application *Allium sativum L.* and related species. Editores H.P. Koch and L.D Lawson, pp. 1-24

Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR. 2006. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr.* Vol. 136, pp. 218S-226S.

Kodera Y, Ayumi Suzuki , Osamu Imada , Shigeo Kasuga , Isao Sumioka , Atsushi Kanezawa , Nobuo Taru , Masanori Fujikawa , Shinji Nagae , Koji Masamoto , Katsuhiko Maeshige , Kazuhisa Ono. 2002. Physical, chemical and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J Agr and Food Chem.* Vol. 50, pp. 622-32.

Königsberg MF.2007. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo, *REB.* Vol. 26, pp. 18-25.

Krause RJ, Glocke SC, Elfarra AA. 2002. Sulfoxides as urinary metabolites of S-allyl-L-cysteine in rats: evidence for rats and dogs. *Ame Soc Pharm Exp Ther.* Vol. 43, pp. 749-755.

Lawson L. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. *Phyt of Eur: Chem and Biol Act. Serie 691,* pp. 179-209.



---

Lawson LD, Gardner CD. 2005. Composition, stability and bioavailability of garlic products used in clinical trials. *J. of Agr and Food Chem.* Vol. 53, pp. 6254-6261.

Lee S, Nae In Chang Miyoung Yoo Jung Hoon Choi Dongbin .2015. Development and validation of S-allyl-L-cysteine in rat plasma using pharmacokinetics studies. *J Chromatogr Sci.* Vol. 53, pp. 54-59.

Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, DeMarco KM, Nametz N, Davis TP. 2010. Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occluding during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab.* Vol. 30, pp. 1625-1636.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* Vol. 42, pp. 3323-3328.

Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. 2003. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Rad Bio and Med.* Vol. 35, pp. 317-324.

Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* Vol. 4, pp. 319-323.

Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y, Kodai S, Tsukioka T, Inoue K, Okada S, Suehiro S. 2006. S-allylcysteine attenuated CCl<sub>4</sub>- induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *Biofactor.* Vol. 26, pp. 81-92.

Moriguchi T, Matsuura H, Koder Y, Itakura Y, Katsuki H, Saito H, Nishiyama N.1997. Neurotrophic activity of organosulfur compounds having a thioallyl group on cultured rat hippocampal neurons. *Neuroche, Res.* Vol. 22, pp. 1449-1452.



---

Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, Lizasoain I. 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Rad Biol Med*. Vol. 39, pp. 1291-1304.

Ji-Myung Kim, Namsoo Chang, Won-Ki Kim, Hyang Sook. 2014. Dietary S-allylcysteine reduces mortality with decreased incidence of stroke and behavioral changes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Bio Biot and Biochem*. Vol. 70, pp. 1969-1971.

Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y. 1994. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med*. Vol. 60, pp. 214-217.

Nishiyama N, Moriguchi T, Morihara N, Saito H. 2001. Ameliorative effect of S-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice. *J. Nutr*. Vol. 131, pp. 1093-1095.

Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanisms as anti-oxidants. *Neurochem Int*. Vol. 29, pp. 135-143.

Oomen S, Anto RJ, Srinivas G, Karunagaran D. 2004. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur. J. Pharmacol*. Vol 485, pp. 637-646.

Orozco-Ibarra, M., Muñoz-Sánchez, J., Zavala-Medina, M. E., Pineda, B., Magaña-Maldonado, R., Vázquez-Contreras, E., Chánez-Cárdenas, M. E. 2016. Aged garlic extract and S-allylcysteine prevent apoptotic cell death in a chemical hypoxia model. *Biol. Res*. Vol.49 (7).

Padmanabhan M, Prince P. 2006. Preventive effect of S-allylcysteine in lipid peroxidases and antioxidants in normal and isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats: A histopathological study. *Tox*. Vol. 224, pp. 128-137.



---

Pardridge WM. 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *Neuro Rx*. Vol. 2, pp. 3-14.

Ramírez SH, Potula R, Fan S, Eidem T, Papugani A, Reichenbach N, Dykstra H, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Persidsky Y. 2009. Methamphetamine disrupts blood-brain barrier function by induction of oxidative stress in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. Vol. 29, pp. 1933-1945.

Ray B, Chauhan NB, Lahiri DK. 2011. The “Aged garlic extract” (AGE) and one of its active ingredients S-allylcysteine (SAC) as potential preventive and therapeutic agent for Alzheimer’s disease (AD). *Curr Med Chem*. Vol. 18, pp. 3306-3313.

Ruíz-Sandoval JL, González-García CK, García-Navarro V, Gutiérrez-Manjarrez Fa, González-Cornejo S. 2003. Enfermedad vascular cerebral isquémica en los hospitales mexicanos. *Rev Mex Neurosci*. Vol. 24, pp. 319-323.

Sang EB, Seung YC, Yong DW, Seon HL, Hyun J. 2013. Changes in S-allylcysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. *Food Sci and Tech*. Vol. 55, pp. 397-402.

Saravanan G, Ponmurugan P, Shabana M. 2009. Modulatory effects of S-allylcysteine on glucose metabolism in streptozotocin diabetic rats. *J Func Foods*. Vol. 1, pp. 336-340.

Sarkar S, Das N. 2006. Mannosylated liposomal flavonoid in combating age-related ischemia-reperfusion induced oxidative damage in rat brain. *Mech Ageing Dev*. Vol. 127, pp. 391-397.

Saunders N, Liddelw S, Dziegielewska K. 2012. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol*, Vol. 3



---

Shah ZA, Li R, Ahmad AS, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, Doré S. 2010. The flavonol (-) epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway. *J. Cereb Blood Flow Metab.* Vol. 30, pp. 1951-1961.

Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, Bernaudin M. 2004. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *Neuro Rx.* Vol. 1, pp. 26-35.

Shi H, Jing X, Wei X, Perez RG, Ren M, Zhang X, Lou H. 2015. S-allylcysteine activates the Nrf-2 dependent antioxidant response and protects neurons against ischemic injury *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurochem.* Vol. 133, pp. 298-308.

Siegenthaler JA, Sohet F, Daneman R. 2013. Sealing off the CNS: cellular and molecular regulation of blood brain barrierogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* Vol. 13, pp. 1057-1064.

Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT. 2008. Antioxidant and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem.* Vol. 15, pp. 404-414.

Matsutomo T, Koderá Y. 2014 Development of an analytical method for sulfur compounds in aged garlic extract with the use of a postcolumn high performance liquid chromatography method with sulfur specific detection. *J Nutr.* Vol. 146, pp. 450S-455S.

van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. 2006. Baicalein and 12/15 lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke.* Vol. 37, pp. 3014-3018.

Won MH, Kang T, Park S, Jeon G, Kim Y, Seo JH, Choi E, Chung M, Cho SS. 2001. The alterations of N-methyl-D-aspartate receptor expressions and oxidative DNA damage in the CA1 area at the nearly time after ischemia-reperfusion insult. *Neurosci Lett.* Vol. 301, pp. 139-142.



---

Yan C.K, Zeng F.D. 2005. Pharmacokinetics and tissue distribution of S-allylcysteine. *Asian J. Drug. Met. Pharm.* Vol. 5, pp. 61-69.

Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda MN, Khan MB, Ishrat T, Islam F. 2007. Selenium plays a modulatory role against cerebral ischemia induced neuronal damage in rat hippocampus. *Brain Res.* Vol. 1147, pp. 218-225.

Yu J, Feng L, Hu H, Zhou Y. 2012. Effect of SAC an oxidative stress and No availability in placenta: Potential benefits to preeclampsia. *Plac.* Vol. 33, pp- 487-494.

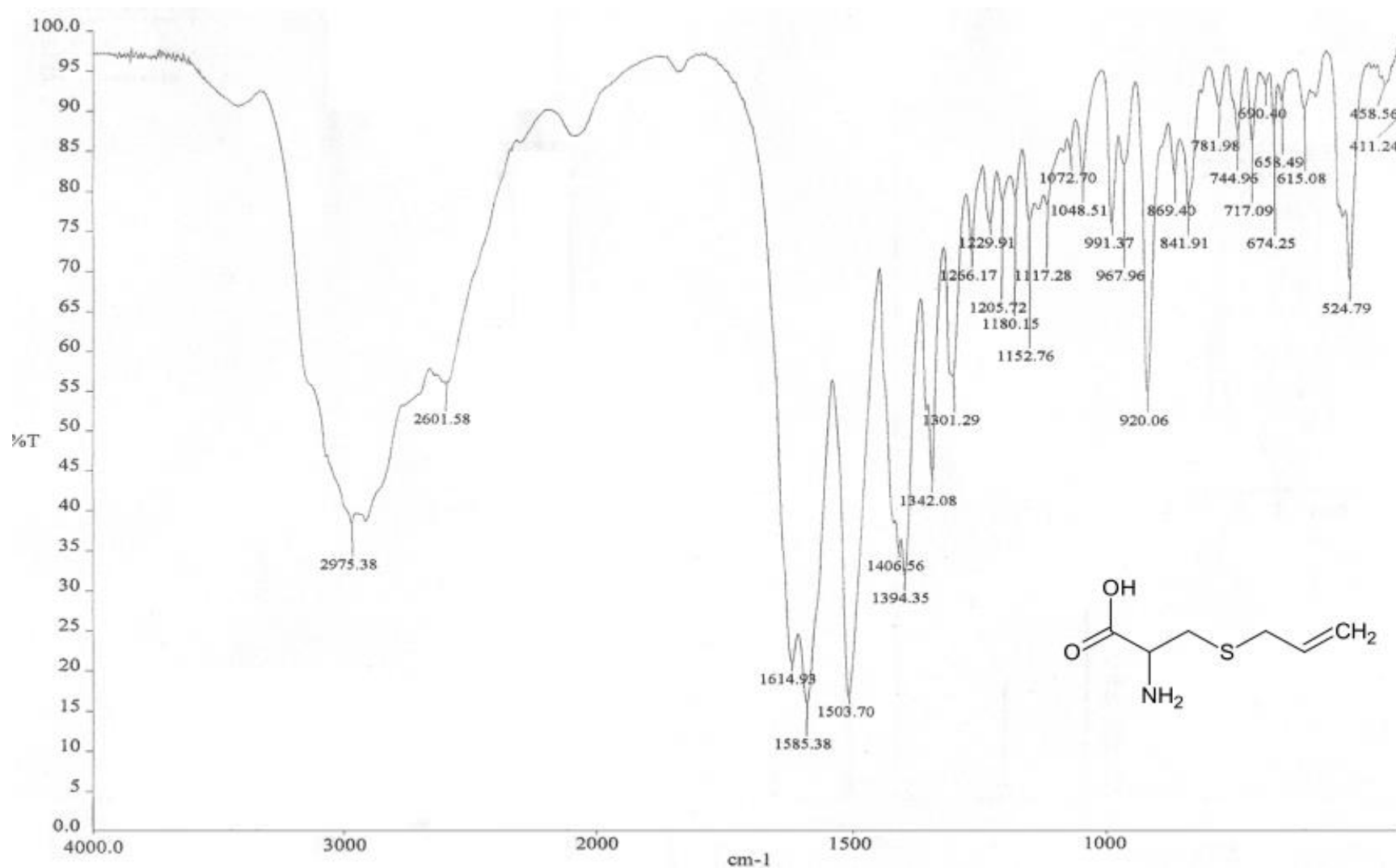
Xiao Zhai, Xiao Chen , Jiazi Shi , Duo Shi , Zhouheng Ye , Wenwu Liu , Ming Li , Qijin Wang , Zhimin Kang , Hongda Bi , Xuejun Sun. 2011. Lactulose ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inducing hydrogen by activating Nrf2 expression. *Free Radic Biol Med.* Vol. 65, pp. 731-741.

Zlokovic BV. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* Vol. 57, pp. 178-201.



## 10 Espectros

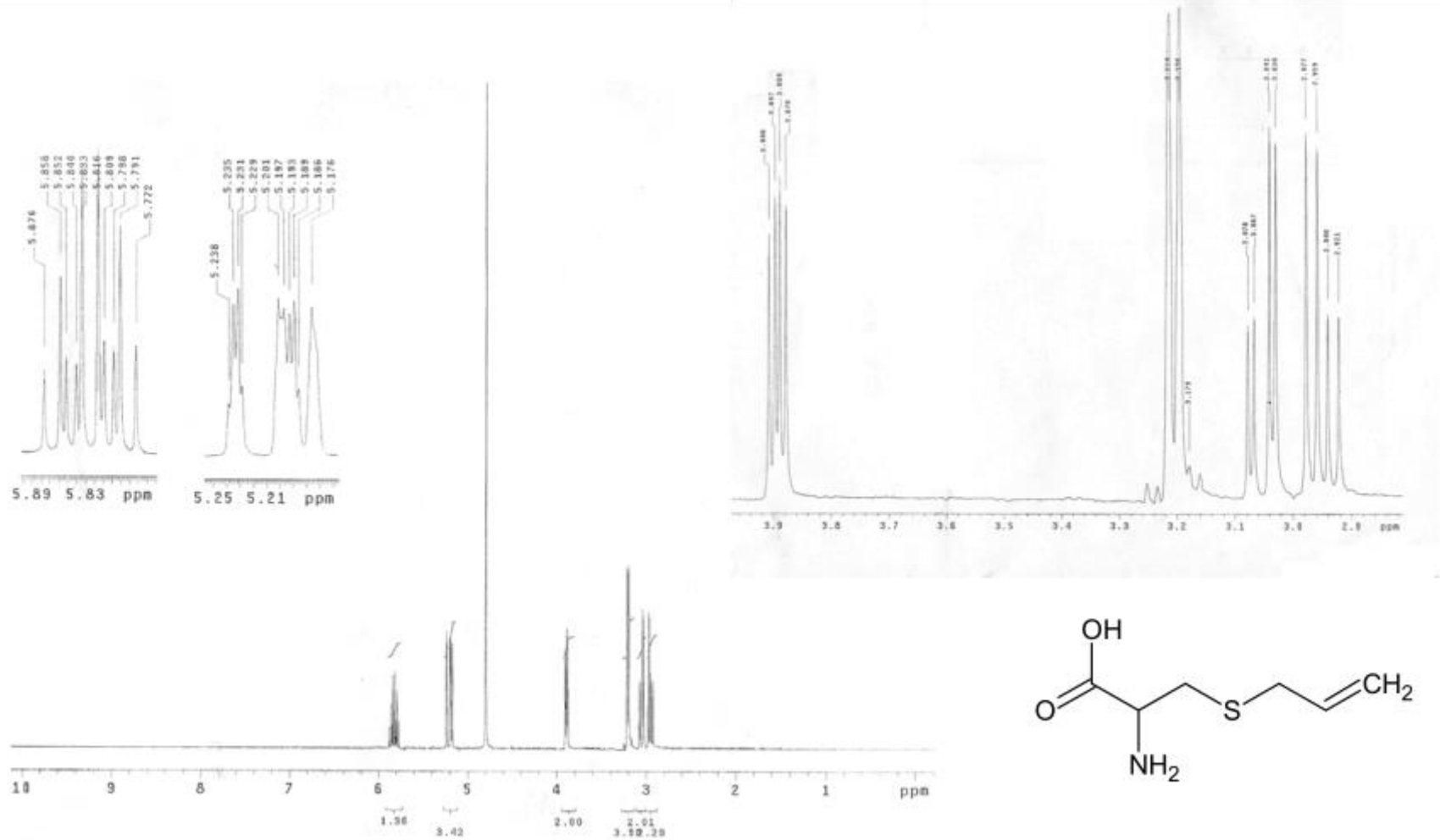
Espectro 1. Espectro de infrarrojo (IR) de la SAC.







Espectro 2. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN<sup>1</sup>H) de la SAC.





Espectro 3. Espectrometría de masas (EM) de la SAC.

