



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
“Francisco García Salinas”

Unidad Académica de Ciencias Químicas
Maestría en Ciencia y Tecnología Química

TESIS

“Evaluación de la expresión génica placentaria de Slc38a4 en ratones BALB/c bajo tratamiento con levetiracetam y correlación con niveles plasmáticos”

Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología Química

Nombre del alumno:

Yessica Zapata Vázquez.

Director (es):

Dra en C. Blanca Patricia Lazalde Ramos

Dra en C. Marisol Galván Valencia

Dra en C Martha Guadalupe Sosa Macías

DICIEMBRE 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

INGENIERÍA QUÍMICA

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

QUÍMICO EN ALIMENTOS

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA



Q.F.B. YESSICA ZAPATA VÁZQUEZ
PRESENTE

La Dirección de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, le notifica que el Comité de Revisión de su Documento de Tesis de Maestría, integrada por los Docentes-Investigadores: Dra. en C. Marisol Galván Valencia, Dra. en C. Martha Sosa Macías, Dra. en C. Argelia López Luna, Dr. en C. Raúl Adrián Martínez Orozco, Dra. en C. Blanca Patricia Lazalde Ramos . Han concluido la revisión del mismo y han dado su aprobación para su respectiva presentación.

Por lo anterior, se le autoriza la impresión definitiva de su Tesis de Maestría, a fin de dar trámite a la sustentación de su Examen de Grado de Maestría en Ciencia y Tecnología Química.

ATENTAMENTE

Zacatecas, Zac; 11 de Noviembre del 2020

DR. EN C. JORGE LUIS AYALA LUJÁN
DIRECTOR DE LA UNIDAD ACADÉMICA
DE CIENCIAS QUÍMICAS

Unidad Académica
Ciencias Químicas



MAESTRÍA
EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA
QUÍMICA
2016-2020

CLAVE 32USU0007J

Campus UAZ Siglo XXI Carretera Zacatecas - Guadalajara Km. 6
Ejido La Escondida C.P. 98160 Zacatecas, Zac. Tel: (492) 925 6690 Ext. 4650





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
"Francisco García Salinas"



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

INGENIERÍA QUÍMICA

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

QUÍMICO EN ALIMENTOS

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA



CIRCULAR

Una vez revisado el DOCUMENTO DE TESIS titulado: "Evaluación de la expresión génica placentaria de *Sic38a4* en ratones BALB/c bajo tratamiento con levetiracetam y correlación con sus niveles séricos", de la Q.F.B. Yessica Zapata Vázquez con número de Matrícula 33140577. Se solicita a los Miembros del Jurado de Exámen que se citan al calce, tengan a bien aprobar la impresión del documento para continuar los trámites necesarios ante la Rectoría de la Universidad Autónoma de Zacatecas y programar la realización del Examen de Grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Zacatecas, Zacatecas., a 09 de noviembre de 2020.

Dr. en C. Sergio Miguel Durón Torres
Responsable de la Maestría en Ciencia
y Tecnología Química.

Unidad Académica
Ciencias Químicas



MAESTRÍA
EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA
QUÍMICA
2016-2020

REVISÓ Y APROBÓ

Dra. en C. Marisol Galván Valencia

Dra. en C. Martha Sosa Macías

Dra. en C. Argelia López Luna

Dr. en C. Raúl Adrián Martínez Orozco

Dra. en C. Blanca Patricia Lazalde Ramos



CLAVE 32USU0007J
Campus UAZ Siglo XXI Carretera Zacatecas - Guadalajara Km. 6
Ejido La Escondida C.P. 98160 Zacatecas, Zac. Tel: (492) 925 6690 Ext. 4650

DEDICATORIA

Dedicada con amor y cariño a mi familia en especial a mis padres quienes me apoyaron en todo momento para cumplir mis sueños y siempre creyeron en mí. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios, perseverancia y empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Mis logros se los debo a ellos en especial el de lograr concluir la Maestría en Ciencia y Tecnología Química.

Con mucho amor para Pablo y Adriana.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Etnofarmacología Biomédica y el Laboratorio de Neuropatología y Productos Naturales de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química (MCTQ) de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, al igual que en el Laboratorio de Biología Molecular del CIIDIR-IPN Unidad Durango. Se contó con los apoyos financieros otorgados el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de maestría con registro No (CVU) 936913.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar, quiero agradecer a Dios. Gracias por haberme dado las fuerzas y paciencia para lograr terminar con este proyecto de investigación. Por haber iluminado y ser guía en mi camino, en cada momento que parecía no tener solución gracias por haberme dado la sabiduría para continuar y no rendirme.

Me gustaría agradecer sinceramente a la Dra. Blanca Lazalde por ser fuente de conocimientos y orientación para mí, gracias por su persistencia y motivación que han sido fundamentales para mi formación académica. De igual forma a la Dra. Marisol Galván quien ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa. A la Dra. Martha Sosa y el futuro Doctor Ricardo Blanco por guiarme en un nuevo campo de investigación, por su comprensión y paciencia. También me gustaría agradecer los consejos recibidos y la ayuda que me ha brindado sinceramente la Dra. Claudia Reyes y la Dra. Argelia, gracias por estar siempre cuando las he necesitado. Gracias a cada uno de ustedes se han ganado mi lealtad y admiración.

De una forma especial agradezco a mis Padres que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar la maestría y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible. Asimismo, agradezco infinitamente a mis Hermanas; Noemi, Thalía y Valeria que con sus palabras me hacían sentir orgulloso de lo que soy y de lo que les puedo enseñar. A mis sobrinos quienes son mi mayor alegría; Juny, Chemis y Celes.

Agradezco a mis amigas que, aunque ya no las vea tan seguido siempre han estado ahí Diana, Daisy, Silvia, Karen y Reyna. Al igual que a grandes personas con las cuales tuve la oportunidad de trabajar; Fany y Clara. A mis compañeros de la maestría que se convirtieron en amigos, gracias por esos viajes y comidas para relajarnos y desestresarnos; Erika, Paulina y Miguel. Me dio mucho gusto haber coincidido con personas tan agradables como ustedes.

Por último, quiero agradecer a mi novio Cesar quien siempre ha estado para mí en momentos difíciles, quien nunca ha dejado de creer en mí y me impulsa a ser mejor cada día. Gracias por estar a mi lado y brindarme tanto cariño amor.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	14
1. Antecedentes	16
Levetiracetam.	16
1.1.1. Indicaciones terapéuticas.....	16
1.1.2. Mecanismo de acción	16
1.1.3. Efectos adversos	17
1.1.4. Posología e indicaciones	18
Farmacocinética de LEV.....	18
1.1.5. Absorción.....	18
1.1.6. Distribución	18
1.1.7. Biotransformación	18
1.1.8. Eliminación	19
Cuantificación de LEV en fluidos biológicos.	19
Cambios fisiológicos durante el embarazo y sus consecuencias farmacocinéticas.	22
1.1.9. Absorción.....	23
1.1.10. Distribución	23
1.1.11. Metabolismo.....	23
1.1.12. Excreción	23
Cambios farmacocinéticos de LEV durante el embarazo	24
Placenta.....	25
1.1.13. Fisiología placentaria	25
1.1.14. Histología placentaria	25
1.1.15. Circulación Placentaria.....	26
Transporte Placentario.....	27
1.1.16. Difusión simple	28
1.1.17. Difusión facilitada	28
1.1.18. Transporte activo.....	28
1.1.19. Pinocitosis.....	29
Proteínas transportadoras en placenta.....	30
1.1.20. Proteínas transportadoras ABC	30
1.1.21. Proteínas transportadoras SLC	32

Familia de transportadores Slc38 y placenta.....	35
1.1.22. Transportador Slc38A4.....	38
2. Justificación.....	39
3. Hipótesis.....	41
4. Objetivos.....	42
Objetivo general	42
Objetivos específicos.....	42
5. Material y métodos.....	43
Fase I: Validación HPLC/UV para la determinación de Levetiracetam.....	43
Condiciones Cromatográficas y equipo de trabajo.....	43
i. Reactivos y equipos	43
ii. Sistema cromatográfico.....	43
iii. Soluciones de trabajo	43
iv. Sueros control	43
Extracción de levetiracetam	44
Validación del método analítico por HPLC/UV	44
v. Rango:.....	45
vi. Linealidad.....	45
vii. Precisión:.....	45
viii. Exactitud.....	46
ix. Recuperación absoluta (recobro):.....	46
x. Estabilidad de la muestra:.....	47
xi. Sensibilidad:	48
xii. Selectividad:	48
Determinación de la concentración de LEV en suero de ratones Balb-c.	49
Población de estudio.....	49
Fase II. Expresión Placentaria de SLC38A4.....	51
Análisis de expresión genética en placenta.....	51
xiii. Obtención de muestra de tejido placentario	51
xiv. Extracción de ARN de tejido placentario	51
xv. Evaluación de la integridad del ARN	51
xvi. Síntesis de ADNc.....	51
xvii. RTq-PCR de SCL38A4 placentario	52
xviii. Mezcla de reacción para la RTq-PCR para el gen SLC38A4	52
xix. Condiciones de la RTq-PCR para el gen SLC38A4	53

Fase III. Correlación entre la concentración de LEV en suero y la expresión de Slc38a4 en placenta de ratones Balb-c.....	53
a) Medidas antropométricas	53
b) Peroxidación hepática, renal y peroxidación fetal.....	53
Análisis Estadístico.....	54
6. Resultados.....	55
Fase I: Validación HPLC/UV para la determinación de Levetiracetam.....	55
Condiciones cromatográficas	55
Métodos de Extracción de Levetiracetam.....	59
Validación del Método Analítico.....	61
i. Rango de concentración.....	62
ii. Linealidad.....	62
iii. Precisión.....	63
iv. Exactitud.....	63
v. Recobro Absoluto.....	64
vi. Estabilidad de la Muestra.....	65
vii. Sensibilidad.....	68
viii. Selectividad.....	69
Determinación de la concentración de LEV en suero de ratones Balb-c.....	71
Fase II. Expresión Placentaria de SLC38A4	72
a. Evaluación de la integridad del RNA.....	72
b. Evaluación de la expresión génica de SLC38A4.....	73
Fase III. Correlación entre la concentración de LEV en suero y la expresión de Slc38a4 en placenta de ratones Balb-c.....	74
Fase IV. Medidas antropométricas y estrés oxidativo	74
a. Medidas antropométricas de los productos no natos	74
b) Estrés oxidativo.....	77
7. Discusión.....	81
Fase I: Validación HPLC/UV para la determinación de Levetiracetam.....	81
Fase II. Medidas antropométricas y Estrés oxidativo	87
a. Medidas antropométricas	87
b. Estrés Oxidativo.....	88
Fase III. Evaluación de la expresión génica placentaria de Slc38a4.....	89
Fase IV. Correlación entre la concentración de LEV en suero y la expresión de Slc38a4 en placenta de ratones Balb-c.....	89
8. Conclusiones.....	90
9. Perspectivas.....	90

10.	Referencias Bibliográficas.....	91
11.	Anexos	96
a.	Anexo A: Comité de Bioética.....	96
12.	Cronograma de actividades:	97
c.	Constancias Congresos.....	98
	98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros Farmacocinéticos del LEV. Tomada de (Lorenzo et al., 2008)	18
Tabla 2. Métodos reportados para la cuantificación de LEV.....	20
Tabla 3. Cambios fisiológicos en el embarazo y sus consecuencias farmacocinéticas.....	22
Tabla 4. Hormonas que intervienen en la función placentaria. Tomada de (Evain-Brion & Malassine 2003).....	25
Tabla 5. Transportadores ABC en placenta. Tomada de (Staud et al., 2012).....	31
Tabla 6. Transportadores SLC en placenta. Tomada de (Staud et al., 2012)	33
Tabla 7. Familia de Transportadores SLC38. Tomado de (Bröer, 2014)	36
Tabla 8. Comparativa de los parámetros de validación establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, 2013 y FDA.	44
Tabla 9. Condiciones de la RT-PCR para la síntesis de ADNc.....	53
Tabla 10. Condiciones Cromatográficas.	58
Tabla 11. Áreas obtenidas de las concentraciones evaluadas de la curva de calibración en solución de levetiracetam.	58
Tabla 12. Solventes utilizados para la extracción de levetiracetam.	59
Tabla 13. Resultados obtenidos de la linealidad y recobro de LEV en suero de acuerdo con los diferentes solventes utilizados de extracción.	61
Tabla 14. Resultados de la correlación entre la concentración del analito y respuesta.	62
Tabla 15. Resultados obtenidos del intra-análisis de LEV.....	63
Tabla 16. Resultados obtenidos del inter-análisis de LEV.....	63
Tabla 17. Resultados obtenidos de la repetibilidad y reproducibilidad de LEV para la obtención de la exactitud del método analítico.	64
Tabla 18. Capacidad de recuperación de Levetiracetam.	65
Tabla 19. Resultados obtenidos de la estabilidad a corto plazo de LEV	65
Tabla 20. Estabilidad de las muestras procesada de LEV.....	66
Tabla 21. Estabilidad a largo plazo de Levetiracetam.....	66
Tabla 22. Estabilidad de LEV en ciclos de Congelación-Descongelación.	67
Tabla 23. Límite de cuantificación y detección.	69
Tabla 24. Valores antropométricos de los productos no natos en los grupos de estudio.	74
Tabla 25. Peroxidación lipídica.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química de LEV.....	16
Figura 2. Mecanismo de acción de Levetiracetam.	17
Figura 3. Metabolitos de LEV.....	19
Figura 4. Cambios farmacocinéticos en la disposición de fármaco durante el embarazo y relaciones farmacocinéticas básicas.	22
Figura 5. Esquema de la Circulación Feto-Materna Humana.	27
Figura 6. Mecanismos de transporte placentario	27
Figura 7. Visualización esquemática de la barrera placentaria.	29
Figura 8. Transportadores ABC.....	32
Figura 9. Transportadores SLC.	34
Figura 10. Transporte vectorial a través de la placenta.	34
Figura 11. Representación de los transportadores SLC38 en placenta.....	39
Figura 12. Modelo animal.....	50
Figura 13. Espectro correspondiente al estándar de levetiracetam.....	55
Figura 14. Cromatogramas en solución de los analitos evaluados a las condiciones cromatográficas establecidas.	56
Figura 15. Cromatograma correspondiente a la mezcla en solución de levetiracetam y captopril.....	57
Figura 16. Curva de calibración de Levetiracetam en solución.	59
Figura 17. Curvas de calibración de LEV en suero con diferentes solventes.	60
Figura 18. Curvas de calibración del analito LEV en suero.	62
Figura 19. Cromatograma obtenido después de someter a 3 ciclos de Congelación y descongelación las muestras de LEV.	68
Figura 20. Cromatogramas correspondientes al analito de LEV y su estándar interno captopril.....	69
Figura 21. Cromatogramas obtenidos de la selectividad del método.	70
Figura 22. Número de productos no natos en los grupos de estudio.....	75
Figura 26. Electroforesis de RNA en gel de agarosa.....	73
Figura 28. Peroxidación Hepática en los grupos de estudio.....	79
Figura 29. Peroxidación Renal en los grupos de estudio.....	79

ABREVIATURAS

ABC	Transportadores dependientes de ATP
ATP	Adenosin Trifosfato
AUC	Área bajo la curva
BCRP	Proteína de resistencia en cáncer de mama
BM	Membrana Basolateral
CL	Aclaramiento
CNT	Transportadores de nucleósidos
CTB	Citotrofoblasto
CV	Coeficiente de variación
CYP450	Citocromo P 450
DS	Desviación Estándar
EI	Estándar Interno
FAEs	Fármacos Antiepilépticos
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormona folículo estimulante
HCG	Gonadotropina Coriónica Humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LEV	Levetiracetam
LIC	Límite inferior de cuantificación
MATE	Proteínas de extrusión multidroga y toxina
MCA	Muestra control alto
MCB	Muestra control baja
MCD	Muestra control diluida
MCM	Malformación congénita mayor
Mcm	Muestra control medio
MDR1	Proteína de resistencia a múltiples fármacos
MVM	Membrana Apical
OAT	Transportadores de aniones orgánicos
OATPs	Polipéptidos de transporte de aniones orgánicos
OCT	Transportadores de cationes orgánicos
OCTN	Transportadores de carnitina
PC	Punto de Control
P-gp	Glicoproteína P
pH	Potencial de hidrógeno
R	Coeficiente de correlación
RCIU	Restricción del crecimiento intrauterino
RQ	Expresión relativa
SLC	Transportadores de solutos
STB	Sincitiotrofoblasto
TR	Tiempo de retención
UGT	Uridinadifosfato glucuroniltransferasa
UV	Ultravioleta
Vd	Volumen de distribución

RESUMEN

La epilepsia es una afección común en la mujer embarazada, aproximadamente 1 de cada 200 embarazadas se encuentra expuesto a fármacos antiepilépticos, siendo el levetiracetam (LEV) el fármaco de mayor uso durante el embarazo. La placenta es una barrera de circulación materna fetal, por lo que el grado de exposición fetal a sustancias exógenas será determinado por el transporte y la biotransformación a nivel placentario de dichas sustancias. El objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión génica placentaria del gen Slc38A4 en ratones BALB/c y correlacionarlo con la concentración sérica de LEV. Se validó el método analítico por HPLC/UV para la cuantificación del fármaco, bajo lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013, utilizando como estándar interno captopril y una columna fase reversa C18 (5 μ m, 150 x 4,6 mm). La expresión génica se determinó en modelo murino (ratones hembra Balb-c preñadas), administrando una dosis de 100 mg/kg/día de LEV, el sacrificio fue a los 13 y 18 días de gestación. Se obtuvo sangre mediante punción cardiaca y se obtuvieron medidas antropométricas de los productos no natos, así como las placentas para extraer RNA y se evaluó la expresión del gen mediante q-PCR. También se cuantificó malondialdehído (MDA) para determinar el estrés oxidativo en hígado, riñón y productos fetales. El método analítico validado presentó exactitud, precisión, linealidad, selectividad y reproducibilidad en las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil ácido fosfórico 0.43%: acetonitrilo (90:10), pH 6.8, longitud de onda de 231 nm, flujo de 1.5 mL/min, volumen de inyección de 15 μ l, tiempo de corrida de 8 min, tiempos de retención de 1.56 ± 0.07 y 3.9 ± 0.125 min para el estándar interno y LEV respectivamente. En relación con las medidas antropométricas de los productos no natos (número de productos, peso, talla y ancho), los resultados muestran un decremento en el número de productos en las ratonas expuestas a LEV en el día 13 de gestación, de igual manera, se observó un decremento en el peso y talla de los productos expuestos a LEV en comparación con los no expuestos. Referente a la peroxidación hepática, los animales gestantes presentaron concentraciones mayores de MDA que los no gestantes, de igual manera, los expuestos a LEV presentan un aumento en las concentraciones de MDA en comparación con los no expuestos. Con respecto a la peroxidación renal, la gestación no se asoció a un incremento del estrés oxidativo a nivel renal, ni con la exposición a LEV. En cuanto a la peroxidación fetal, el tiempo de gestación incrementa las concentraciones de MDA en los productos no natos. Por otra parte, la expresión del gen Slc38a4 decrecienta a los 13 días e incrementa a los 18 días en el grupo expuesto a LEV en relación con el no expuesto.

Abstract

Epilepsy is a common condition in pregnant women, approximately 1 in 200 pregnant women is exposed to antiepileptic drugs, levetiracetam (LEV) being the drug of most use during pregnancy. The placenta is a barrier to fetal maternal circulation, so the degree of fetal exposure to exogenous substances will be determined by the transport and biotransformation of these substances at the placental level. The objective of the present work was to determine the placental gene expression of the Slc38A4 gene in BALB/c mice and to correlate it with the serum concentration of LEV. The analytical method was validated by HPLC / UV for drug quantification, according to the NOM-177-SSA1-2013, captopril was used as internal standard and a reverse phase column C18 (5 μ m, 150 x 4,6 mm). Gene expression was determined in a murine model (pregnant Balb-c female mice), a dose of 100 mg/kg/day LEV was administered, the mice sacrifice was at 13 and 18 days of gestation. Blood was obtained by cardiac puncture and anthropometric measurements of non-native products were obtained, as well as the placentas to extract RNA and gene expression was evaluated by q-PCR. Malondialdehyde (MDA) was also quantified to determine oxidative stress in liver, kidney, and fetal products. The validated analytical method presented accuracy, precision, linearity, selectivity and reproducibility with the following chromatographic conditions; mobile phase 0.43% phosphoric acid: acetonitrile (90:10), pH 6.8, wavelength of 231 nm, flow of 1.5 mL / min, injection volume of 15 μ l, run time of 8 min, retention times of 1.56 ± 0.07 and 3.9 ± 0.125 min for the internal standard and LEV respectively. In relation to the anthropometric measurements of unborn products (number of products, weight, size, and width), results show a decrease in the number of products in mice exposed to LEV on day 13 of gestation, similarly, a decrease in the weight and size of the products exposed to LEV was observed compared to those not exposed. Regarding liver peroxidation, pregnant mice had higher concentrations of MDA than non-pregnant mice, similarly, those exposed to LEV show an increase in MDA concentrations compared to those not exposed. Regarding renal peroxidation, pregnancy was not associated with increased oxidative stress at the renal level, nor with exposure to LEV. Regarding fetal peroxidation, the gestation time increases the concentrations of MDA in non-native products. On the other hand, the expression of the Slc38a4 gene decreases at 13 days and increases at 18 days in the group exposed to LEV in relation to the not exposed group.

1. Antecedentes

Levetiracetam.

Es un fármaco antiepiléptico derivado de la pirrolidona que no tiene relación química con otros medicamentos antiepilépticos existentes, es de segunda generación y fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) el 30 de noviembre de 1999 y en Europa en 2000 (Koc G *et al.*, 2018). Es el enantiómero (S) del análogo etílico del piracetam, en la clase de medicamentos nootrópicos que se consideran "farmacológicamente seguros" (Wright *et al.*, 2013).

El levetiracetam cuyo nombre químico y fórmula son (S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidona acetamida y $C_8H_{14}N_2O_2$ [Figura 1], tiene un peso molecular de 170.21 g/mol, es muy soluble en agua, parcialmente soluble en metanol y etanol e insoluble en solventes no polares como el hexano (Sarmiento *et al.*, 2014). Su estructura química no tiene relación con ninguna otra clase de antiepilépticos (Wright *et al.*, 2013).

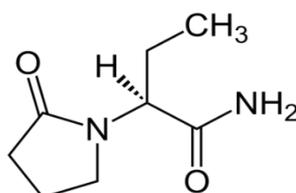


Figura 1. Estructura Química de LEV. (Sarmiento *et al.*, 2014)

1.1.1. Indicaciones terapéuticas

Es utilizado principalmente en el tratamiento de epilepsias parciales y posiblemente también es eficaz en las crisis generalizadas primarias (mioclónicas, ausencias y crisis GTC) y epilepsias fotosensibles. Cada vez es más utilizado en mujeres epilépticas embarazadas debido a su amplio espectro (Tomson *et al.*, 2009).

1.1.2. Mecanismo de acción

El lugar de unión del LEV en el cerebro es una proteína de la membrana de las vesículas presinápticas denominada SV2A. Esta proteína se ha relacionado con la modulación de la exocitosis de vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisores, lo cual parece contribuir al mecanismo de acción antiepiléptico del fármaco. Los modelos animales muestran que la afinidad por SV2A está asociada con la protección contra las convulsiones, lo que la convierte en un objetivo importante para los nuevos

FAEs. También inhibe los canales de potasio y calcio tipo N. [Figura 2] (Howard et al., 2018; Wright *et al.*, 2013).

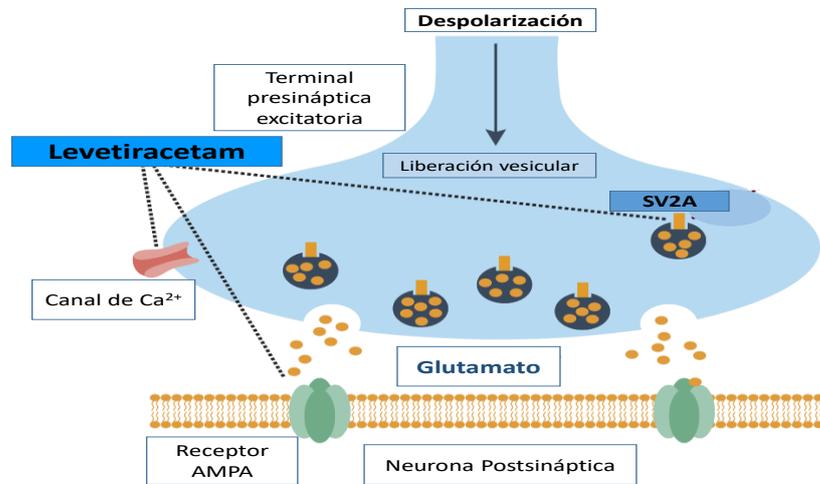


Figura 2. Mecanismo de acción de Levetiracetam.

El Lev bloquea canales de Ca^{2+} , aumenta la corriente de Cl^- y se une a la proteína presináptica SV2A.

1.1.3. Efectos adversos

Como principales efectos secundarios se encuentra somnolencia y agresividad, especialmente durante las primeras semanas de tratamiento (McEvoy, GK. 2007).

>10% de frecuencia

Astenia (11-15%), dolor de cabeza (14-19%), infección (11-15%), aumento de la presión arterial (17% en niños <4 años), somnolencia (11-15%), fatiga (10-11%), anorexia (3-13%), debilidad (9-15%), nasofaringitis (7-15%), tos (2-11%) (Anello *et al.*, 2018).

1-10% de frecuencia

Infección viral (2%), asma (2%), mareo (5-9%), nerviosismo (2-10%), amnesia (2%), ansiedad (2-3%), ataxia (3%), depresión (2-5%), hostilidad (10%), parestesia (2%), sinusitis (2%), diplopía (2%), ambliopía (2%), conjuntivitis (2-3%), albuminuria (4%) (Anello *et al.*, 2018).

<1% de frecuencia

Prueba de función hepática anormal, desinencia, eccema, neutropenia, hematocrito disminuido, leucopenia, tendencias suicidas, hepatitis, pancreatitis, supresión de la médula ósea y necrólisis epidérmica (Anello *et al.*, 2018).

1.1.4. Posología e indicaciones

Terapia complementaria para las convulsiones parciales: En adultos se requiere una dosis inicial de 500 mg dos veces al día, con una dosificación ascendente gradual hasta un máximo de 3 g/día. El pico sérico y el área bajo la curva (AUC) son directamente proporcionales a la dosis administrada (Carretero, 2002).

Farmacocinética de LEV.

1.1.5. Absorción

Presenta una absorción intestinal rápida mayor al 90%, disminuye su actividad farmacológica con los alimentos, pero estos no modifican su absorción total. Alcanza concentraciones plasmáticas máximas en 0.6 - 1.3 h y tiene una biodisponibilidad cerca del 100% y $t_{1/2}$ es de 6 - 8 h [Tabla 1] (Lorenzo *et al.*, 2008).

Tabla 1. Parámetros Farmacocinéticos del LEV. Tomada de (Lorenzo *et al.*, 2008)

Absorción.	Efecto enzimático, por CYP450.	Unión a proteínas.	Efecto del LEV sobre otros fármacos.	Efecto de otros fármacos sobre este.
>90%	No Presenta	<10%	Ninguno.	Ninguno

1.1.6. Distribución

Ni el LEV ni su metabolito primario se unen significativamente a las proteínas plasmáticas (< 10%). El volumen de distribución del LEV es de aproximadamente 0.5 a 0.7 L/kg, un valor cercano al volumen corporal de agua total. Al igual que otros FAEs, LEV cruza la barrera hematoencefálica y posee una buena penetración tisular sin acumularse en los tejidos (Santos Zambrano *et al.*, 2011).

1.1.7. Biotransformación

El levetiracetam no es metabolizado extensamente, y no participan las isoformas del citocromo P450 hepático. Su vía metabólica principal es la hidrólisis enzimática del grupo acetamida llevada a cabo en tejidos, incluyendo células sanguíneas. El metabolito principal es ucb L057 (24% de la dosis), el cual es inactivo farmacológicamente. (Alrabiah H. 2019). Se han identificado 2 metabolitos menores, uno de ellos obtenido de la

hidroxilación del anillo pirrolidona (1.6% de la dosis) y el otro, por la apertura del anillo pirrolidona (0.9% de la dosis) [Figura 3] (PLM, 2018). No se ha evidenciado interconversión enantiomérica *in vivo* para el levetiracetam o para su metabolito principal (Strolin Benedetti *et al.*, 2004.).

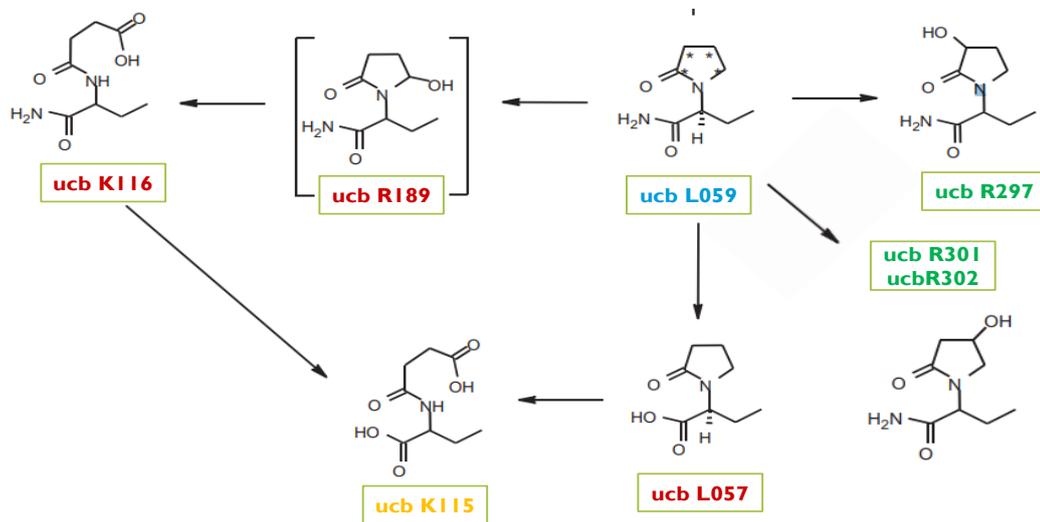


Figura 3. Metabolitos de LEV. Modificada de Strolin Benedetti *et al.*, 2004.

1.1.8. Eliminación

El promedio de depuración corporal total es de 0.96 ml/min/kg. Se excreta principalmente por vía renal (95% de la dosis), con una eliminación proporcional al aclaramiento de creatinina, por lo que su tiempo de vida media se incrementa en casos de insuficiencia renal. La depuración renal de levetiracetam y de ucb L057 es de 0.6 y 4.2 ml/min/kg respectivamente, lo que indica que el levetiracetam es excretado por filtración glomerular con la subsecuente reabsorción tubular y que el metabolito primario también se excreta por secreción tubular activa, además de la filtración glomerular. Un porcentaje mínimo del 0.3% de la dosis es eliminada por vía fecal (Tomson *et al.*, 2007).

Cuantificación de LEV en fluidos biológicos.

Diversos métodos han sido reportados para la cuantificación de LEV en fluidos biológicos, tales como espectrometría de masas, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta presión HPLC (Sarmiento *et al.*, 2014). En la Tabla 2 se muestran los parámetros evaluados de los métodos reportados.

Tabla 2. Métodos reportados para la cuantificación de LEV.

<i>Ref.</i>	<i>Método</i>	<i>Columna</i>	<i>Flujo</i> (ml/min)	<i>Fase móvil</i>	<i>Tiempo de retención</i> (min)	λ (nm)	<i>Estándar interno</i>	<i>Rango</i> (sensibilidad)	<i>Fluido</i>
Sarmiento 2014	HPLC/UV	Fase reversa C8 5 μ m, 250 x 4,6 mm.	1,2	Ácido fosfórico al 5%: acetonitrilo (90:10 v/v).	5.2	205	Captopril presentación comercial de 25mg.	5 μ g/ml.	Suero.
Martens et al., 2005	HPLC/UV	Thermo Hypercarb 150 mm x 4.6 mm (5 μ m tamaño de partícula).	1	Solvente A: H ₃ PO ₄ al 85% Solvente B: Acetonitrilo	6.8	205	S.D	1–75 μ g/m LD: 0.1 μ g/ml.	Plasma.
Contin et al., 2008	HPLC/UV	Synergi 4-m Hydro-RP, 150 mm x 4.6 mm.	1.5	Tampón de dihidrogenofosfato de potasio (50 mM, pH 4,5) y acetonitrilo (94: 6, v/v).	7.3	205	UCB 17025 (- 2,2-trimethyl-5-oxo-1 pyrrolidine acetamide).	4–80 μ g/ml LD: 1 μ g/ml LC: 2 μ g/ml	Plasma.
Juenke et al., 2006	HPLC/UV	50- x 2.0 mm (5 μ m.)	0.5	1 L agua desionizada y 100 ml de metanol.	3.5	220	UCB 17025.	5-150 pg/mL	Plasma.
Contin et al., 2010	HPLC/UV	Synergi 4 μ m Hydro-RP, 250 mm x 4.6 mm	0.8.	Dihidrogenofosfato de potasio tampón (50 mM, pH 4.5), acetonitrilo y metanol (65: 26.2: 8.8, v/v/v).	3.68	210	Citalopram.	5 μ L.	Plasma.
Giroux et al., 2009	HPLC/UV	Thermo Hypercab 150 mm 4.6 mm (5 μ m)	1	Solvente A: H ₃ PO ₄ al 85% Solvente B: Acetonitrilo	4.45+/- 0.10	205	UCB.	10 μ l.	Plasma.

Baldelli et al., 2015	HPLC/UV	C18 250 mm × 4.6 mm. (3.5 μm)	1	Acetonitrilo y 50 mM buffer de fosfatos a pH 4.5	6.5	210	S.D.	6 μg/mL	Plasma.
Freitas et al., 2015	HPLC/UV	Columna analítica C18 (250x4 mm i.d)	1	Metanol y buffer de acetato de sodio 0.125 M. pH de 4.4 (20:80, v/v)	6.5	235	Ucb 17025.	2.85-220.0 μg/mL	Plasma.
Engelbrecht et al., 2017	HPLC/UV	Venusil XBP C18, 250 × 4.6 mm, 5 μm	1	Tampón KH ₂ PO ₄ 50 mM con acetonitrilo (90:10, v/v)	8.58	205	Gabapentina	1–60 μg / ml	Plasma.
Ibrahim FA et al., 2016	HPLC/UV	C18 (5 μm), 250 × 4,6 mm	1.5	Metanol: acetonitrilo: agua (30:10:60, v/v).	3.4	230	Carbamazepina.	0.5–50 μg/ml	Plasma.
Guo et al., 2007	HPLC-MS	Supelco LC-18-DB 3.3 cm × 3.0 mm, (3 μm)	1.0	97% metanol en 15 mmol/l acetato de amonio (v/v), 0.1% ácido acético.	2.9		Ritonivir en acetonitrilo.	1–50 μg/ml	Suero Saliva Plasma.
Bianchi et al., 2014	Inmunoensayo/ con HPLC.	Fase reversa 150 x 4 mm DI	0.8			210		0.5–200 mcg/mL	Suero.
Gonçalves et al., 2018	HPLC/Diodos .	55 mm × 4 mm, (3 μm).	1.0	Agua y acetonitrilo	6.42	220		4 mg/min	Plasma.

Cambios fisiológicos durante el embarazo y sus consecuencias farmacocinéticas.

Los cambios fisiológicos múltiples que ocurren durante el embarazo pueden influir en la disponibilidad de los fármacos y afectar la fracción libre [Tabla 3], que determina la cantidad de fármaco en plasma disponible para ejercer su efecto terapéutico en el sitio de acción, distribución tisular, metabolismo y eliminación [Figura 4] (Pennell 2003; Bromley 2016; Patel *et al.* 2016).

Tabla 3. Cambios fisiológicos en el embarazo y sus consecuencias farmacocinéticas.

Parámetro	Consecuencia
Aumento total del agua corporal, líquido extracelular.	Se altera el volumen de distribución de los fármacos y por lo tanto su vida media de eliminación.
Aumento de la reserva lipídica.	Menor eliminación de fármacos liposolubles.
Aumento del gasto cardiaco.	Aumento en el flujo sanguíneo hepático que lleva a una mayor eliminación.
Aumento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtrado glomerular.	Aumento de la eliminación renal de fármacos libres.
La actividad de enzimas microsomales hepáticas (CYP450) puede ser inducida por el aumento de esteroides endógenos.	Alteración de absorción sistémica y/o eliminación hepática.
La albúmina disminuye de 35 g/L a 25-30 g/L durante la primera mitad del embarazo, la cual se une a fármacos ácidos.	La fracción libre de fármacos se incrementa considerablemente. La disponibilidad del fármaco aumenta por extracción hepática.
Disminución de la concentración de α -1 Glicoproteína ácida en el feto con relación a la madre.	Fracción libre alterada entre la madre y el feto.



Figura 4. Cambios farmacocinéticos en la disposición de fármaco durante el embarazo y relaciones farmacocinéticas básicas. CL, eliminación total; AUC, área bajo la curva del fármaco; F, biodisponibilidad; $t_{1/2}$, vida media; k, constante de eliminación Vd, volumen de distribución; C_{ss} , concentración sérica en estado estacionario, τ , frecuencia de dosis) (Daud 2014).

1.1.9. Absorción

El vaciamiento gástrico y la motilidad del intestino delgado se encuentran reducidos debido a la elevación de progesterona. Esto incrementa el tiempo para alcanzar el pico de concentración (T_{max}) y reduce el pico máximo de concentración (C_{max}), por tanto, la biodisponibilidad total puede ser menor. El incremento en el pH gástrico por la reducción en la secreción de H^+ y el aumento en la producción de moco puede incrementar la ionización de ácidos débiles, tendiendo a reducir su absorción más que las bases débiles. Estos efectos parecen no ser importantes en fármacos administrados en dosis repetidas (Dawes *et al.*, 2001; Tomson *et al.*, 2013).

1.1.10. Distribución

Durante el embarazo, como resultado de la expansión total del agua intravascular (volumen plasmático) y extravascular (líquido intersticial), el volumen sanguíneo incrementa progresivamente hasta aproximadamente 8 litros, condicionando que la concentración sérica total de un fármaco disminuya. Las reservas de tejido adiposo también aumentan lo cual en conjunto con al aumento de líquidos alteran la relación grasa/agua que puede provocar un aumento en el volumen de distribución (Vd). Como resultado de esta dilución, la C_{max} de muchos fármacos hidrófilos se reduce, pero su efecto clínico se compensa por los cambios en la unión a proteínas plasmáticas (Tomson *et al.*, 2007; Tomson, 2013).

1.1.11. Metabolismo

La eliminación total de los fármacos depende del metabolismo hepático. Las enzimas CYP de la fase I, así como las enzimas de la fase II (UGT) pueden ser inducidas durante el embarazo (Tomson *et al.*, 2013) por el aumento en las concentraciones de estrógenos (Pennell 2003).

1.1.12. Excreción

Los múltiples cambios fisiológicos durante el embarazo influyen en la eliminación del fármaco, incluido un mayor volumen de distribución, mayor eliminación renal, alteración de la actividad de las enzimas hepáticas y una disminución de las

concentraciones de proteínas plasmáticas. También existe un incremento considerable del flujo sanguíneo a nivel renal y por lo tanto el grado de filtración glomerular aumenta entre un 50%-80% (Pennell 2003; Tomson *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2016; Bromley 2016).

Este proceso inicia justo después de la concepción y continúa durante el segundo trimestre, disminuyendo en los últimos meses del embarazo. (Tomson *et al.*, 2013). El incremento en la eliminación renal puede afectar la concentración sérica de los fármacos que son excretados principalmente por el riñón, como gabapentina, levetiracetam, pregabalina y vigabatrin (Reimers *et al.*, 2012).

Cambios farmacocinéticos de LEV durante el embarazo

El LEV no se une a las proteínas plasmáticas y su eliminación es primordialmente renal, aunque el metabolismo no oxidativo por hidrólisis contribuye en la eliminación de aproximadamente el 30% del fármaco (Tomson *et al.*, 2013).

Se reportó que las concentraciones de LEV durante el tercer trimestre fueron 60% más bajas que las concentraciones previas al embarazo (124.7 ± 57.9 l / día a 427.3 ± 211.3); la eliminación de LEV aumenta un 243% en el tercer trimestre del embarazo (Battino *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2016).

Se ha observado la disminución de un 40% a 60% en la concentración plasmática de LEV al final del embarazo, en comparación con la concentración previa al embarazo. La concentración aumenta rápidamente después del alumbramiento, alcanzando los niveles previos al embarazo en una a dos semanas (Tomson *et al.*, 2013; Westin *et al.*, 2009).

Se considera que la disminución de los niveles de LEV es causada por una combinación tanto del aumento de la eliminación renal como de la actividad enzimática (Tomson *et al.*, 2013).

LEV probablemente penetra en la leche materna en cantidades potencialmente importantes desde el punto de vista clínico (Pennel, 2016).

Recientemente se ha encontrado que la administración de LEV durante el embarazo trae consigo cambios en la biosíntesis de los neurotransmisores y el metabolismo de los esteroides (Walker *et al.*, 2019).

Placenta

La placenta es el órgano vital y multifuncional responsable del intercambio fisiológico y suministro de nutrientes del feto hacia la circulación materna (Watson & Cross 2005). Tiene la función de muchos órganos en el mantenimiento de la gestación como: riñón, hígado, sistema respiratorio y endocrino (Cardenas & Ingrid 2011).

1.1.13. Fisiología placentaria

La placenta también actúa como una fuente importante de hormonas y factores de crecimiento asociados con el embarazo, y está involucrada en la protección inmunitaria del feto [Tabla 4]. Los estrógenos y la progesterona se encargan de la regulación del flujo sanguíneo de la placenta, modulando efectos de vasodilatación y vasoconstricción respectivamente (Rossant & Cross 2001; Acevedo *et al.*, 2008).

Tabla 4. Hormonas que intervienen en la función placentaria. Tomada de (Evain-Brion & Malassine 2003)

Hormona	Producida por:	Función
Gonadotropina Coriónica Humana (hCG)	Sincitiotrofoblasto veloso	Promover la angiogénesis, diferenciación trofoblástica, envío de señales para favorecer la implantación. Inducción de factores secundarios que permiten el estado gestacional.
Lactógeno placentario	Sincitiotrofoblasto veloso	Ayuda al crecimiento fetal al influir en el metabolismo materno.
Prolactina	Hipotálamo y endometrio	Diferenciación celular, regulación del crecimiento trofoblástico, angiogénesis y regulación inmune.
Relaxina	Sincitiotrofoblasto	Relajación del cuello gravídico para facilitar su dilatación y relajación uterina.
Activina e inhibina	Sincitiotrofoblasto	Regulación de la hormona folículo estimulante (FSH).
Hormona del crecimiento placentario	Sincitiotrofoblasto	Estimula el paso de nutrientes a través de la placenta.

1.1.14. Histología placentaria

La placenta, se forma durante las 3 primeras semanas de gestación, abarcando los procesos de preimplantación, decidualización e implantación (Rossant & Cross 2001).

La placenta tiene una forma discoidea de 20- 25 cm de diámetro, 2-3 centímetros de grosor al centro y un peso de 400-500 g. Funcionalmente se divide en 10-40 unidades llamadas cotiledones o lóbulos. Cada lóbulo tiene su aporte sanguíneo materno que no se mezcla entre lóbulos ni entre la circulación materna y fetal (Lewis *et al.*, 2012).

En el primer trimestre del embarazo, la barrera placentaria se compone por cinco capas: sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, lámina basal trofoblástica, tejido conectivo y endotelio fetal (Iqbal *et al.*, 2012).

La capa externa de las vellosidades fetales se forma por una continuidad del sincitiotrofoblasto que constituye la barrera primaria entre la circulación materna y fetal, se compone de una sola capa de células multinucleadas, conformando un borde apical en cepillo que está en contacto con la circulación materna, y una membrana basolateral que está en contacto con la circulación fetal. Así se constituye la membrana materna del sincitio (Prouillac & Lecoeur 2010; Iqbal *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2012).

Por debajo de la capa del sincitiotrofoblasto se encuentra la capa del citotrofoblasto la cual cubre el 44% de la superficie de la membrana basal al término. El estroma intersticial entre la membrana basal del sincitiotrofoblasto y el endotelio capilar fetal está compuesto por una mezcla de proteínas y células como macrófagos y fibroblastos. La capa final es el endotelio capilar fetal la cual está en contacto con la circulación fetal y carece de microvellosidades (Prouillac & Lecoeur 2010; Lewis *et al.*, 2012).

1.1.15. Circulación Placentaria

La circulación feto-materna humana es de tipo hemocorial, el sistema que resulta está cubierto por dos capas: una capa basal de cara al endometrio llamada placa trofoblástica y una superficial de cara a la cavidad del blastocisto, llamada placa coriónica. La placa coriónica comienza a formarse el día 12 cuando el citotrofoblasto invade las trabéculas sinciciales y, finalmente, se extiende a la placa trofoblástica, ver Figura 5 (Sherer & Abulafia, 2001).

Próximo al término del embarazo, la barrera placentaria sufre cambios drásticos: la capa del sincitiotrofoblasto reduce en gran medida su grosor, el citotrofoblasto se

vuelve discontinuo, las vellosidades también cambian su estructura; es decir que la distancia de difusión que a finales del segundo mes de gestación es de 50 mm se reduce a 5 mm en la semana 37; por lo que el intercambio entre la madre y el feto se intensifica (Iqbal *et al.*, 2012).

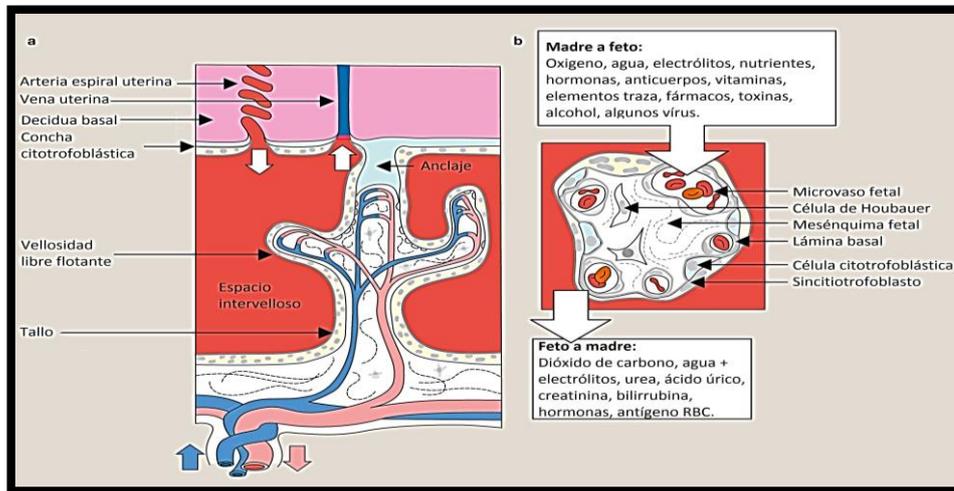


Figura 5. Esquema de la Circulación Feto-Materna Humana. Panel A) Corte transversal de placenta, Panel B) Corte transversal de una vellosidad. La sangre oxigenada es bombeada de la circulación materna dentro del espacio interveloso. Intercambia a través del árbol veloso, nutrientes, productos de desecho, gases y xenobióticos. (Lewis *et al.*, 2012).

Transporte Placentario

El intercambio transplacentario de sustratos endógenos y xenobióticos puede ocurrir por cuatro mecanismos distintos que se ilustran en la Figura 6 (Acevedo *et al.*, 2008; Iqba *et al.*, 2012).

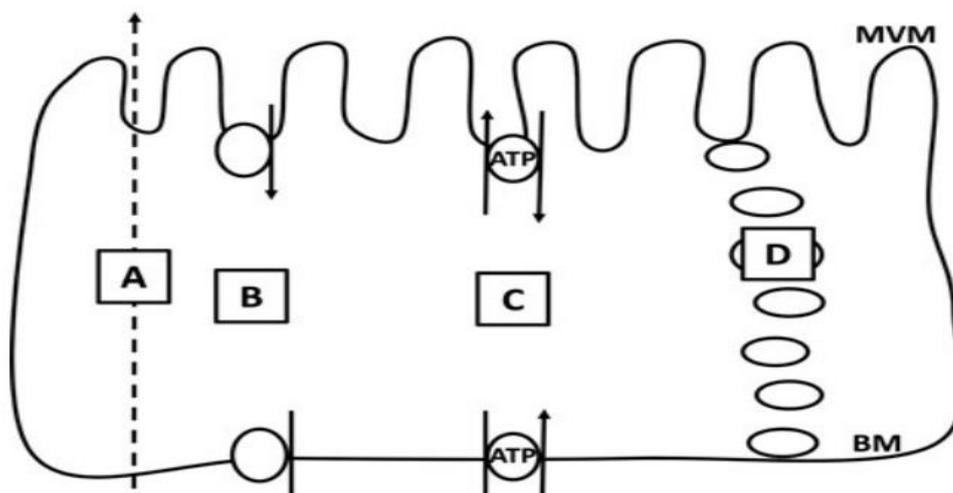


Figura 6. Mecanismos de transporte placentario Se muestran las diferentes vías de movilización como lo son: A) difusión simple; B) difusión facilitada utilizando un transportador; C) transporte activo que requiere la hidrólisis de ATP; D) pinocitosis; BM, membrana basolateral del sincitiotrofoblasto; MVM, membrana apical del sincitiotrofoblasto. (Griffiths, 2014)

1.1.16. Difusión simple

Trasporte sin empleo de energía, el cual es dependiente solo de los factores incluidos en la ley de Fick: grosor de la membrana, gradiente del fármaco a ambos lados de la barrera, y constante de difusión específica del compuesto. Las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, la concentración en circulación materna, las características estructurales, así como los parámetros fisiológicos de la placenta determinan la velocidad para que un fármaco sea transportado por difusión pasiva. Los fármacos que tienen un peso molecular <500 Da y son lipofílicos, se difunden fácilmente a través de la placenta (Anand *et al.*, 2017).

1.1.17. Difusión facilitada

No se requiere un aporte energético ya que la transferencia de fármaco ocurre en un gradiente de concentración. Los fármacos estructuralmente relacionados con los compuestos endógenos a menudo se transportan mediante difusión facilitada. Las moléculas hidrófilas tienen poca solubilidad en las bicapas lipídicas y, por lo tanto, no atraviesan fácilmente las membranas plasmáticas (Dobson & Kell, 2008). Moléculas como las cefalosporinas y los glucocorticoides difunden a la placenta mediante este mecanismo (Kudo *et al.*, 1989).

1.1.18. Transporte activo

Movimiento de la sustancia en contra de su gradiente químico o eléctrico con coste de energía. Es mediado por transportadores, existe gran competencia entre compuestos relacionados. El transporte activo de fármacos contra un gradiente de concentración a través de la placenta está mediado por las bombas de entrada o salida que son impulsadas por la energía de la hidrólisis de ATP o el gradiente electroquímico transmembrana proporcionado por Na^+ , Cl^- o H^+ . (Syme *et al.*, 2004) Los aminoácidos para la síntesis de proteínas fetales se transfieren de la madre al feto mediante transporte activo. Hay varias proteínas transportadoras específicas para aminoácidos aniónicos, catiónicos y neutros. Muchas de estas proteínas co-transportan los aminoácidos con el sodio: el transporte de sodio por su gradiente de concentración arrastra los aminoácidos a las células (Griffiths, 2014).

1.1.19. Pinocitosis

El compuesto es invaginado dentro de la membrana plasmática para ser transportado en vesículas (Iqbal *et al.*, 2012). Los procesos de fagocitosis y pinocitosis son procesos lentos que no tienen un efecto significativo en el grado de transferencia de la mayoría de los fármacos (Kudo *et al.*, 1989).

El transporte a través del trofoblasto implica fundamentalmente tres pasos (Acevedo *et al.*, 2008):

1. La captación de la circulación materna a través de las vellosidades.
2. El transporte por el citoplasma del trofoblasto.
3. El transporte fuera del trofoblasto, el cual cruza la membrana basal hacia la circulación umbilical.

Varios transportadores son expresados y localizados en la placenta sincitiotrofoblástica, por lo tanto, cualquier componente que logre alcanzar al feto ha de pasar a través del borde en cepillo y consecuentemente por la membrana basal, cada una de las cuales está dotada de transportadores, ver Figura 7 (Staud *et al.*, 2012).

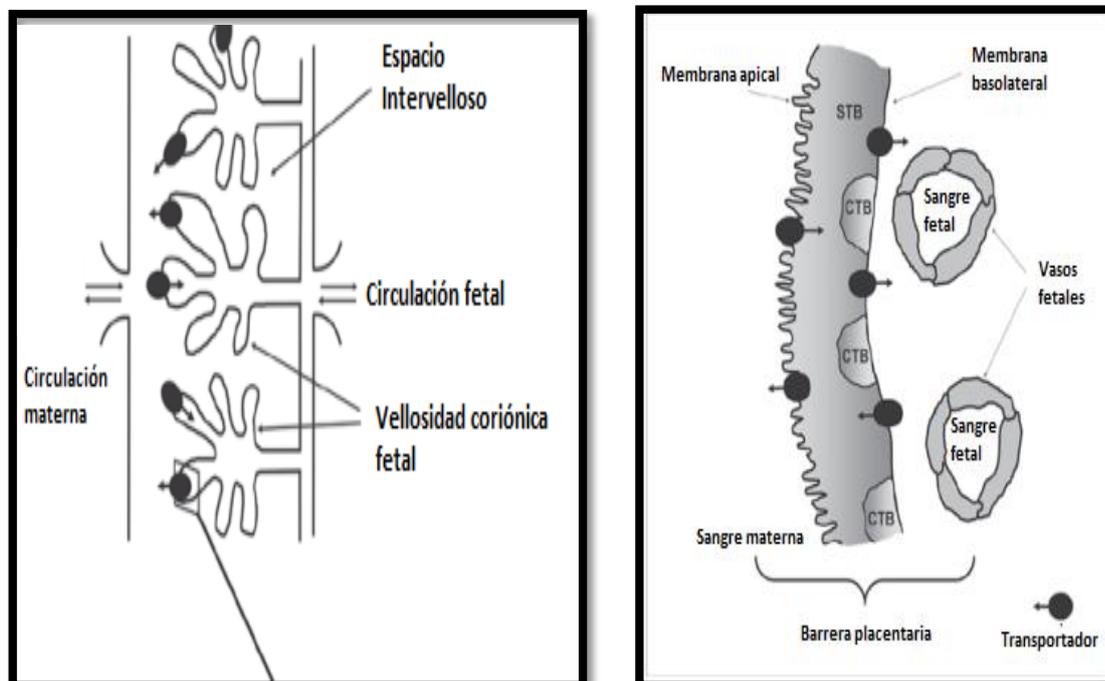


Figura 7. Visualización esquemática de la barrera placentaria. Se observa CTB, citotrofoblasto; STB, sincitiotrofoblasto (Staud *et al.*, 2012).

Proteínas transportadoras en placenta

Los transportadores son proteínas de membrana que se encuentran en todos los organismos, se expresan en diferentes tejidos incluida la placenta. Estas proteínas controlan la entrada de nutrientes e iones esenciales, así como la salida de desechos celulares, toxinas ambientales, fármacos y otros xenobióticos (Brunton *et al.*, 2006)

Estos transportadores se han identificado como barreras que protegen al feto de los efectos lesivos de los fármacos administrados a la madre. La exposición a fármacos teratogénicos a una dosis específica puede interferir con el desarrollo fetal o propiciar el desarrollo de anomalías estructurales. El feto es especialmente susceptible a la teratogénesis durante el estadio crucial de la organogénesis, el cual ocurre desde la implantación hasta los 54-60 días después de la concepción (Staud *et al.*, 2012).

El sincitiotrofoblasto expresa dos tipos principales de proteínas transportadoras: las proteínas ABC y SLC. Estas proteínas contribuyen además de la difusión a través de la membrana celular, a brindar un transporte activo de fármacos (ABC) o bien una difusión facilitada (SLC) (Brunton *et al.*, 2006; Staud *et al.*, 2012).

1.1.20. Proteínas transportadoras ABC

La superfamilia ABC constituye la mayor familia de transportadores de membrana, el término ABC deriva del inglés "ATP binding- cassette" el cual hace referencia a los dominios catalíticos altamente conservados de la proteína que une ATP durante el transporte. En el genoma humano existen 49 genes identificados que codifican para las proteínas de la familia ABC (Morales *et al.*, 2017)

Estos transportadores de eflujo incluyen transportadores ABC tales como la glicoproteína P (P-gp), proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR1), proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP) o proteína de resistencia a mitoxantrona o placentaria ABC [Tabla 5]. Estas son proteínas integrales de membrana que dependen de la energía derivada de ATP para impulsar el transporte de sustancias desde el interior de la célula o desde la membrana celular fuera de la célula (Mao, 2008) .

Tabla 5. Transportadores ABC en placenta. Tomada de (Staud *et al.*, 2012)

Nombre del transportador	Localización Placentaria	Función	Sustrato/Inhibidor clínicamente relevante
Glicoproteína P. (ABCB1/ MDR1)	Apical	Protección del feto por el flujo de sustratos de sincitiotrofoblasto a la madre.	Sustratos: Digoxina, dexametasona, ritonavir, delavirdina, atazanavir, lopinavir, indinavir, saquinavir, nelfinavir, fenitoína, fenobarbital, lamotrigina, levetiracetam, carbamazepina, ondansetron. Inhibidores: Amiodarona, azitromicina, captopril, claritromicina, ciclosporina, piperina, ritonavir y verapamilo.
BCRP (ABCG2)	Apical	Protección del feto por eflujo de sustratos del sincitiotrofoblasto a la madre; factor de supervivencia en la formación del sincitio placentario; protege el trofoblasto contra la apoptosis inducida por citosinas.	Sustratos: Gliburida, nitrofurantoína, dipiridamol, cimetidina, clorotiazida y sulfasalazina, leflunomida. Inhibidores: Lopinavir, ritonavir, nelfinavir, saquinavir, atazanavir.
MRP1 (ABCC1)	Basolateral	Transporte de sustratos endógenos (leucotrienos, glutatión reducido) al feto; Transporte vectorial de compuestos conjugados de la madre al feto (junto con OATP4A1).	Emtricitabina, abacavir, tenofovir, lamivudina, delavirdina, efavirenz, nevirapina, indinavir, ritonavir, lopinavir, atazanavir, metotrexato y análogos de folato, glutatión, glucuronido y conjugados de sulfato.
MRP2 (ABCC2)	Apical	Protección del feto por el flujo de sustratos de sincitiotrofoblasto a la madre.	Emtricitabina, abacavir, tenofovir, lamivudina, delavirdina, efavirenz, nevirapina, saquinavir, ritonavir, indinavir, atazanavir, fenitoína, carbamazepina, ácido valproico, probenecid y ciclosporina.

En la placenta, los transportadores ABC bombean activamente sus sustratos fuera de las células trofoblásticas hacia la circulación materna (P-glicoproteína, BCRP, MRP2) o fetal (MRP1) [Figura 8]. Hasta la fecha, los transportadores ABC de eflujo de fármacos localizados en la membrana apical del trofoblasto se consideran los principales componentes activos de la barrera placentaria (Staud *et al.*, 2012)

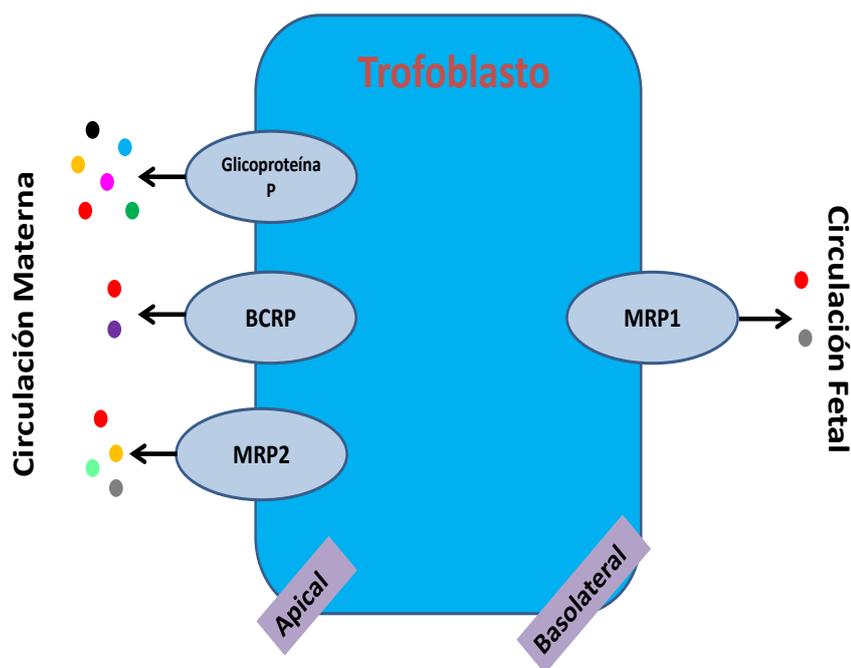


Figura 8. Transportadores ABC. Representación esquemática de los principales transportadores ABC de eflujo de fármacos expresados en la barrera placentaria y su localización en la membrana plasmática. BCRP, proteína de resistencia al cáncer de mama; MRP, proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos. Modificado de (Staud *et al.*, 2012).

1.1.21. Proteínas transportadoras SLC

La superfamilia SLC comprende genes que codifican proteínas de transporte facilitado y transportadores activos secundarios acoplados con iones. Esto significa que acoplan el transporte de un ion a favor de su gradiente electroquímico con el movimiento de otra u otras sustancias que van en contra de su propio gradiente (Canal, 2017).

Se han identificado 48 familias SLC con aproximadamente 315 transportadores en el genoma humano. Muchos transportadores SLC sirven de blanco farmacológico o participan en la absorción y disposición de los fármacos (Brunton *et al.*, 2006).

En la placenta se han identificado transportadores de cationes orgánicos (OCT), transportadores de aniones orgánicos (OAT), transportadores de carnitina (OCTN), transportadores de nucleósidos (CNT y ENT), polipéptidos de transporte de aniones orgánicos (OATPs) y las recientemente descritas Proteínas de extrusión multidroga y toxina (MATE) (Staud *et al.*, 2012).

En la Tabla 6 se describe la localización placentaria, función, sustrato o inhibidor de relevancia clínica de los transportadores SLC.

Tabla 6. Transportadores SLC en placenta. Tomada de (Staud *et al.*, 2012)

Nombre del transportador	Localización Placentaria	Función	Sustrato/Inhibidor clínicamente relevante
OCT1 (SLC22A1)	Basolateral	Captación de cationes orgánicas en sincitiotrofoblasto; liberación de acetilcolina	Quinidina, procainamida, flecainida, amiodarona, verapamilo, diltiazem, citalopram.
OCT3 (SLC22A3)	Basolateral	Captación de cationes orgánicas en sincitiotrofoblasto; liberación de acetilcolina; Aclaramiento de catecolaminas de la circulación fetal.	Amitriptilina, desipramina, imipramina, cisplatino, oxaliplatino, cimetidina, ranitidina, abacavir, emtricitabina, metformina, cocaína, antirretrovirales.
OCTN1 (SLC22A4)	Apical	Transferencia de carnitina.	Quinina, quinidina, verapamilo.
OAT4 (SLC22A11)	Basolateral	Transporte de estrógenos sulfoconjugados. Captación de precursores para la síntesis placentaria de novo de estrógenos.	Zidovudina, ácido valproico, tetraciclina
OATP2B1/ OATP-B (SLCO2B1)	Basolateral	Transporte vectorial de conjugados de sulfato de feto a madre (junto con BCRP)	Gliburida, repaglinida, fexofenadina, pravastatina, lopinavir, saquinavir, nelfinavir
OATP4A1/ OATP-E (SLCO4A1)	Apical	Transporte de sustratos endógenos al feto (hormonas tiroideas, prostaglandinas). Transporte de madre a feto vectorial de sustratos conjugados.	Bencilpenicilina
MATE1 (SLC47A1)	Apical	Eflujo de cationes orgánicas del sincitiotrofoblasto a la circulación materna; Transporte vectorial con OCT3.	Quinidina, diltiazem, Procainamida, verapamilo, amiodarona, metformina, cimetidina, ranitidina, desipramina, Imipramina.
CNT1 (SLC28A1)	Apical y basolateral	Suministro de nucleósido pirimidínico a la placenta.	Drogas derivadas de nucleósidos (antiviral - zidovudina, ribavirina), nicotina, cafeína
ENT1 (SLC29A1)	Apical y basolateral		
ENT2 (SLC29A2)	Apical		

En la placenta, en general, la mayoría de los transportadores SLC facilitan la captación sin gasto directo de energía de las moléculas hidrófilas o cargadas por las células trofoblásticas. Una vez en el trofoblasto, estos sustratos se pueden utilizar para satisfacer las necesidades de la placenta [Figura 9 y 10].

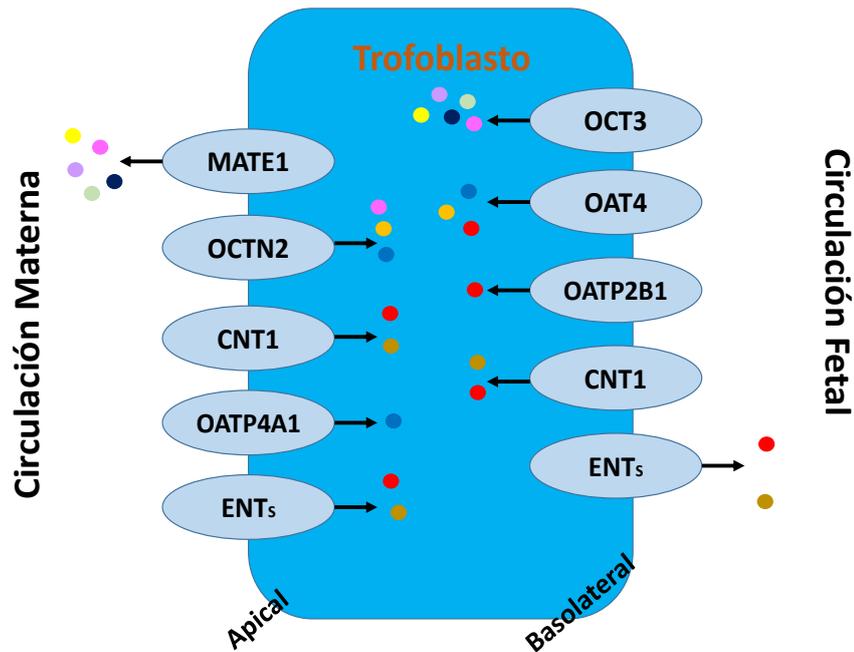


Figura 9. Transportadores SLC. Representación esquemática de los principales transportadores de fármacos SLC expresados en la barrera placentaria y su localización en la membrana plasmática del trofoblasto. CNT1, transportador de nucleósido concentrativo 1; ENTs, transportadores equilibrados de nucleósidos; MATE1, proteína 1 de extrusión de múltiples fármacos y toxinas; OAT4, transportador de aniones orgánico 4; OATP2B1, polipéptido transportador de aniones orgánico 2B1; OATP4A1, polipéptido 4A1 transportador de aniones orgánico; OCT3, transportador de cationes orgánicos 3; OCTN2, transportador de carnitina 2. Modificado de (Staud *et al.*, 2012)

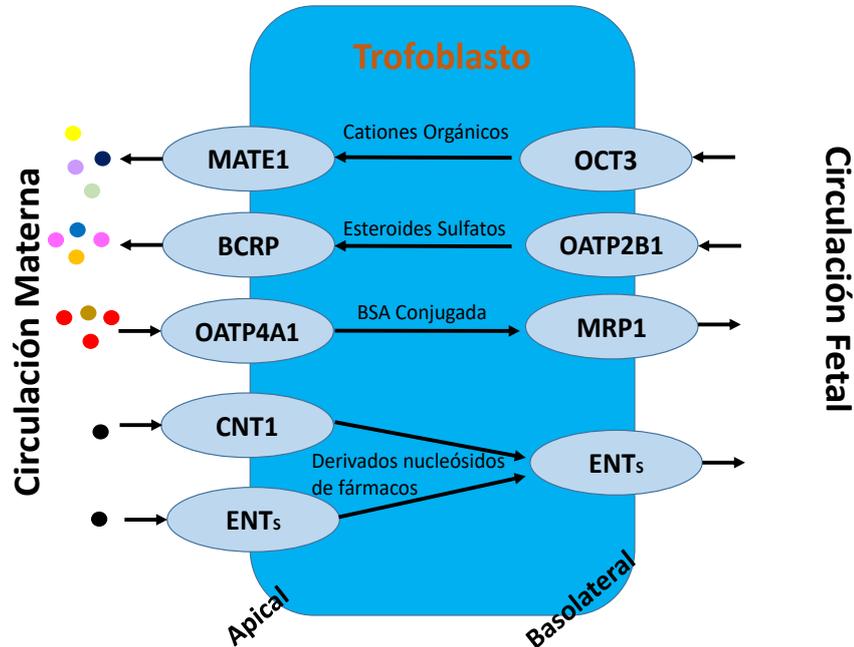


Figura 10. Transporte vectorial a través de la placenta.

BCRP, proteína de resistencia al cáncer de mama; BSA, - bisfenol A; CNT1, transportador de nucleósido concentrativo 1; ENTs, transportadores equilibrados de nucleósidos; MATE1, proteína 1 de extrusión de múltiples fármacos y toxinas; MRP1, proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos 1; OATP2B1, polipéptido transportador de aniones orgánico 2B1; OATP4A1, polipéptido transportador de aniones orgánicos 4A1; OCT3, transportador de cationes orgánicos 3. Modificado de (Staud *et al.*, 2012)

Familia de transportadores Slc38 y placenta

La familia de transportadores 38 comprende 11 miembros en el genoma humano, se encargan de mediar la captación neta dependiente de Na^+ y el eflujo de pequeños aminoácidos neutros, por lo cual se expresan particularmente en células que crecen activamente, o en células que llevan a cabo un metabolismo significativo de aminoácidos. (Bröer & Palacin, 2011; Bröer, 2014). El transporte de la familia SLC puede ser mediante el sistema A o N.

El sistema A se refiere a una actividad dependiente del transporte de Na^+ que prefiere los aminoácidos neutros pequeños, bipolares con cadenas laterales cortas y no ramificadas, ejemplificados por la alanina, cuyo transporte es inhibido por el análogo del ácido N-metil-aminoisobutírico (MeAIB) y está regulado por la suplementación o el agotamiento de aminoácidos, el sistema A es sensible al pH y muestra una regulación hormonal adaptativa. La caracterización molecular del sistema A ha revelado que hay tres subtipos de proteínas altamente homólogas de este transportador conocidos como SNAT1, SNAT2 y SNAT4 (Mackenzie & Erickson, 2004; Bröer, 2014).

El sistema N se refiere a una actividad de transporte específica para la glutamina, la asparagina y la histidina, cada uno con baja afinidad, siendo la característica común de estos aminoácidos un nitrógeno adicional en la cadena lateral. El sistema N también es dependiente de Na^+ y es inhibido a un pH extracelular bajo y sujeto a regulación adaptativa. Se han identificado dos subtipos conocidos como SNAT3 y SNAT5. (Mackenzie & Erickson, 2004; Bröer, 2014).

Un sello distintivo de los transportadores en la familia SLC38 es una fuerte activación del transporte al aumentar el pH en el rango fisiológico de pH de 6 a 8 (Mackenzie & Erickson, 2004).

Tabla 7. Familia de Transportadores SLC38. Tomado de (Bröer, 2014)

Nombre del gen	Alias	Mecanismo	Especificidad del sustrato	Función	Perfil de Expresión	Longitud
SLC38A1 (SNAT1)	GlnT, SAT1, ATA1, SA2, NAT2	S:1Na ⁺	(G),A,S,C,N,Q,H,(M)	A	Ubicuo	486
SLC38A2 (SNAT2)	SAT2, ATA2, SA1	S:1Na ⁺	G,P,A,S,C,N,Q,H,M	A	Ubicuo	505
SLC38A3 (SNAT3)	SN1, NAT	S: 1Na ⁺ /A: 1H ⁺	Q, N, H	N	Ojo, hígado, cerebro, páncreas	503
SLC38A4 (SNAT4)	ATA3, NAT3, SAT3, PAAT	S: 1Na ⁺	G, (P), A, S, C, N, (M), R, K	A	Hígado, vejiga	546
SLC38A5 (SNAT5)	SN2	S: 1Na ⁺ /A: 1H ⁺	Q, N, H, A, S	N	Boca, cuello uterino, vejiga, hueso, intestino, riñón, esófago, pulmón, ojo	471
SLC38A6 (SNAT6)					Esófago, cuello uterino, boca, pulmón, riñón, músculo	520
SLC38A7 (SNAT7)		Na ⁺ dependiente	Q, N, A, H, S	N	Ubicuo	461
SLC38A8 (SNAT8)			Desconocido		Testis	434
SLC38A9 (SNAT9)					Paratiroides, testículo, glándula suprarrenal, tiroides	560
SLC38A10 (SNAT10)					Ubicuo	1118
SLC38A11 (SNAT11)					Bazo, ojo, médula ósea, faringe	405

A: Antiporte, S: Simporte.

En la placenta esta familia, desempeñan un papel importante en la transferencia de aminoácidos al feto. Los miembros de la familia SLC38 están altamente regulados en respuesta al agotamiento de los aminoácidos, la hipertonicidad y los estímulos hormonales. Los transportadores SLC38 desempeñan un papel importante en la

señalización de aminoácidos y se ha propuesto que actúan como transeptores independientemente de su función de transporte. La estructura de los transportadores SLC38 se caracteriza por el pliegue repetido invertido 5 + 5, que se observa en una amplia variedad de proteínas de transporte (Bröer, 2014).

En la membrana microvilosa (MMV), se encuentran altos niveles de transportadores dependientes de Na⁺ (actividad del sistema A), lo que resulta en una mayor concentración de aminoácidos en la sangre que ingresa en la circulación fetal que en la sangre materna. La captación neta de aminoácidos neutros grandes está mediada por intercambiadores de aminoácidos en la membrana microvilosa (Cleal & Lewis, 2008).

Existen reportes que indican que las tres isoformas del sistema A (SNAT1, 2 y 4) se expresan en la membrana apical (Desforges *et al.*, 2009).

Las evidencias sugieren que la tasa de transporte de aminoácidos es una limitante para el crecimiento fetal y que la reducción de la transferencia de aminoácidos a través de la placenta produce una restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) (Desforges & Sibley, 2010). En la vida adulta, los individuos que tuvieron menor crecimiento fetal tienen un mayor riesgo de enfermedades crónicas como la hipertensión y los accidentes cerebrovasculares (Barkel, 1998).

Debido al crecimiento del feto, la transferencia total de aminoácidos a través de la placenta aumenta durante el embarazo, lo que se logra mediante el crecimiento de la placenta, el aumento de la superficie del epitelio y el aumento de la expresión de los transportadores tanto en la membrana apical como en la basolateral (Desforges *et al.*, 2009).

Muchos transportadores de aminoácidos son antiportadores (por ejemplo, la familia SLC7), por lo que la familia de transportadores SLC38 juega un papel importante en la placenta ya que permite el flujo neto de aminoácidos neutros al feto en crecimiento (Bröer, 2014)

1.1.22. Transportador Slc38A4

El miembro 4 de la familia del portador de solutos 38 (Slc38A4), está ubicado en el cromosoma 12q13.11. La proteína codificada se conoce como el transportador de aminoácidos neutro acoplado al sodio 4 (SNAT4), un subtipo del sistema de transporte de aminoácidos conocido como sistema A, que incluye SNAT1, SNAT2 y SNAT4 (Mackenzie & Erickson, 2004).

Tiene una amplia especificidad, con preferencia por Ala, seguida de His, Cys, Asn, Ser, Gly, Val, Thr, Gln y Met. Puede mediar el transporte independiente de sodio de aminoácidos catiónicos, como Arg y Lys. La captación de aminoácidos depende del pH, con actividades de transporte bajas a pH 6.5, intermedias a pH 7.0 y más altas entre pH 7.5 y 8 (Hatanaka *et al.*, 2001).

Originalmente se pensaba que Slc38a4/SNAT4 era una isoforma específica del hígado. Sin embargo, se ha demostrado que SNAT4 es un transportador de aminoácidos neutros en la placenta que desempeña un papel crucial en el crecimiento y desarrollo fetal (Desforgues *et al.*, 2006). Esta localizado en las membranas plasmáticas microvilosa y basal del sincitiotrofoblasto, lo que sugiere un papel de esta isoforma del sistema A en el transporte de aminoácidos a través de la placenta humana (Desforgues *et al.*, 2006).

Los resultados mediante la técnica de Western Blot revelan que la expresión de la proteína SNAT4 es más alta en el primer trimestre en vesículas de membrana plasmática microvilosa en comparación al término, aproximadamente 70 y 33% respectivamente (Desforgues *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012).

También se ha demostrado la expresión placentaria de SNAT4 en rata (Novak *et al.*, 2006) y ratón (Mizuno *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2003).

Como un subtipo importante del sistema A, la regulación ascendente de SNAT4 conduce a una actividad mejorada del sistema A. En estudios con animales, se demostró que la inhibición de la actividad del sistema A disminuye el peso corporal del feto de rata (Cramer *et al.*, 2002; Jansson *et al.*, 2006).

En el año 2009, Desforgues y colaboradores reportaron que la expresión de Slc38a4 disminuye durante el embarazo, sugiriendo que SNAT1 y 2 son responsables del

crecimiento adaptativo (Desforges *et al.*, 2009). Li y colaboradores (2011) reportaron la asociación entre la sobreexpresión de Slc38a4 en placenta y la macrosomía fetal (Li *et al.*, 2011). Actualmente, se demostró que la hipertensión arterial en el embarazo ocasiona una disminución en el crecimiento fetal por lo que el organismo lo compensa con la sobreexpresión de los transportadores del sistema A sugiriéndose que SNAT4 y el sistema A están estrechamente relacionados con el desarrollo fetal (Gibbins *et al.*, 2018). De igual manera, se informó que la pérdida de Slc38a4/SNAT4 en placenta afecta significativamente la concentración de aminoácidos en circulación sanguínea fetal, causando restricción en el crecimiento del feto (Matoba *et al.*, 2019).

En la Figura 11 se presenta un resumen de los sistemas de transporte de la familia SLC38.

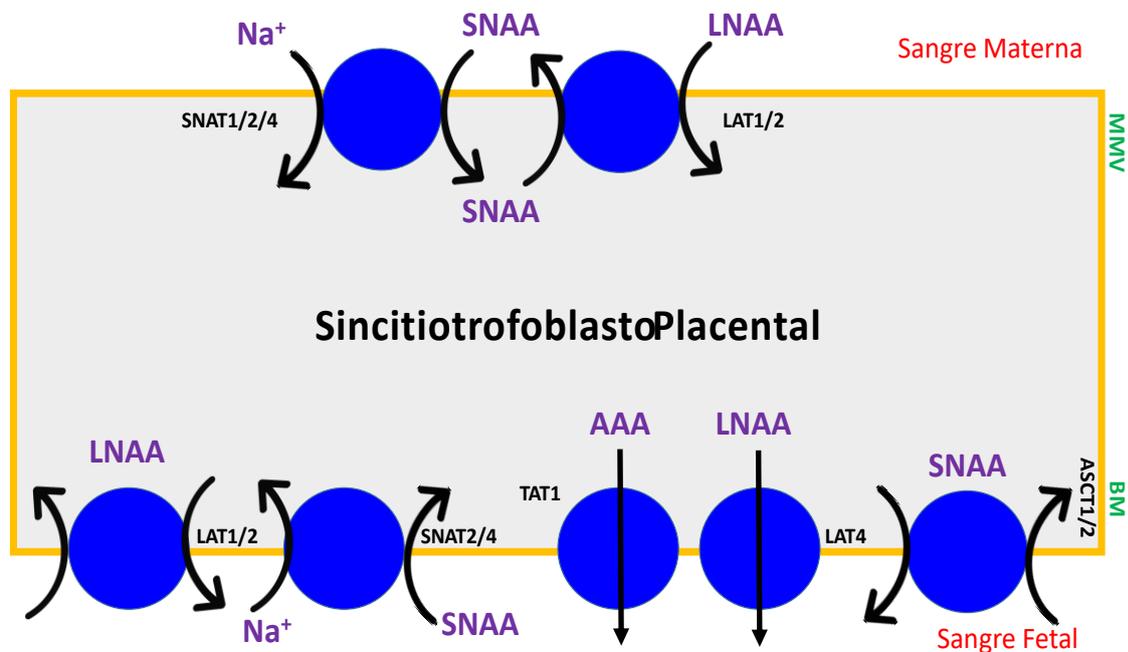


Figura 11. Representación de los transportadores SLC38 en placenta. La membrana microvídica (MMV) contiene grandes cantidades de transportadores del sistema A, que trabajan en conjunto con los intercambiadores de aminoácidos para captar los aminoácidos neutros pequeños (SNAA) y grandes (LNAA). No se han identificado uniportadores para aminoácidos neutros en el MVM. La membrana basal contiene una gran variedad de transportadores. En particular, la actividad del sistema A es mucho menor que en la MMV y se encuentran los uniportadores para los grandes aminoácidos neutros (LNAA) y los aminoácidos aromáticos (AAA). (Bröer, 2014)

2. Justificación

La placenta es el primer órgano que se forma durante la embriogénesis de los mamíferos, estableciendo una barrera entre la circulación materna y fetal, regulando la transferencia de oxígeno, dióxido de carbono, nutrientes, productos de desecho y

fármacos. Cuando una sustancia exógena se encuentra presente en la circulación materna, ya sea por contacto ambiental, ocupacional o por medicación, el grado en el cual el feto será expuesto a estos compuestos está determinado por el transporte y la biotransformación a nivel placentario de dichas sustancias. El LEV es un fármaco antiepiléptico de segunda generación relativamente nuevo, hidrofílico, el cual requiere transportadores para atravesar placenta. Uno de los transportadores que se expresa en la placenta mayoritariamente durante el primer trimestre de embarazo es el gen *Slc38a4*, el cual tiene como sustrato endógeno a los aminoácidos neutros pequeños alanina, histidina y cisteína, todos estructuralmente parecidos al LEV y a su principal metabolito (UCBL057), lo que podría sugerir que el gen *SLC38A4* podría también estar implicado en el transporte de LEV. En base en lo anterior, el propósito de este trabajo es determinar la implicación del gen *Slc38A4* sobre el transporte placentario de LEV y si existe una asociación entre la expresión del gen y la concentración sérica de LEV, y así aportar mayor información sobre el transporte placentario de LEV, lo cual repercutirá en el bienestar del neonato y su desarrollo.

3. Hipótesis

La expresión génica placentaria del transportador Slc38A4 se correlaciona de forma positiva con los niveles séricos del levetiracetam en ratones BALB-c.

4. Objetivos

Objetivo general

Determinar la expresión génica placentaria a los 13 y 18 días de gestación del gen Slc38A4 en ratones BALB/c y su correlación con las concentraciones sérica de levetiracetam.

Objetivos específicos

- Validar el método analítico por HPLC/UV para la cuantificación sérica de levetiracetam, bajo la NOM-177-SSA1-2013.
- Cuantificar por HPLC/UV la concentración de LEV en el suero de ratones BALB/c a los 13 y 18 días de gestación.
- Evaluar la expresión génica placentaria de Slc38A4 mediante PCR en tiempo real, en ratones control y tratados con levetiracetam a los días 13 y 18 de gestación.
- Asociar la expresión génica placentaria de Slc38A4 con la concentración sérica de levetiracetam.
- Determinar el efecto de levetiracetam sobre la peroxidación hepática, renal y fetal en modelo murino.

5. Material y métodos.

Fase I: Validación HPLC/UV para la determinación de Levetiracetam

La validación para la determinación de LEV por HPLC se realizó en el laboratorio de Productos Naturales del campus UAZ Siglo XXI.

Condiciones Cromatográficas y equipo de trabajo

Para encontrar las condiciones cromatográficas adecuadas se inició con lo reportado en la literatura por Sarmiento y Martens. Sin embargo, se hicieron modificaciones como la longitud de onda seleccionada después de obtener el espectro de una solución de LEV a una concentración de 1 mg/ml en un espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis Spectrophotometer.

i. Reactivos y equipos

Se utilizó estándar secundario de Levetiracetam pureza de 85%; Captopril (pureza de 98%, grado HPLC, Sigma Aldrich) como estándar interno; acetonitrilo y agua (al 99,9% grado HPLC, J.T. Baker); ácido fosfórico H_3PO_4 al 84% y Diclorometano (grado HPLC, J.T. Baker). Los equipos utilizados fueron: centrífuga Mikro 200, agitador Vortex Genie- 2 de Scientific industries, balanza analítica Sartorius, sonicador/Baño ultrasonido BRANSON 2510 de Lab-Tech y congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ thermo scientific.

ii. Sistema cromatográfico

El equipo de cromatografía utilizado fue HPLC Agilent Technologies 1200 series dotado de: Desgasificador G1322A, Bomba cuaternaria G1311A, Inyector G1329A, Horno G1316A y Detector UV G1314B, Columna Restek C18 250 x 4,6 y 5 μ . La separación cromatográfica se realizó a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura. La fase móvil fue isocrática con flujo constante de 1,5 ml por minuto y consistió en ácido fosfórico al 0.43% y acetonitrilo en una proporción 90:10 v/v. El tiempo de elución total fue de 6 minutos por muestra.

iii. Soluciones de trabajo

La solución madre Levetiracetam y Captopril de 1mg/ml fue preparada en agua al 99,9% grado HPLC y almacenada inmediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

iv. Sueros control

Se tomó una muestra de sangre intracardiaca en tubos eppendorf a 10 ratones de la cepa Balb-c, las muestras fueron centrifugadas a 1000rpm durante 10 minutos, los sueros fueron extraídos y almacenados a -20°C hasta su uso. Se realizó un concentrado de sueros a partir del cual se prepararon sueros control con concentraciones de Levetiracetam de 1, 5, 25, 45, 65, 85 y 105 µg/ml utilizando la solución madre de LEV a 1 mg/ml.

Extracción de levetiracetam

Se mezclaron 190 µL de suero y 10 µL del estándar interno (captopril 1 mg/mL). Posteriormente se realiza la desproteínización y extracción del analito con diferentes solventes (Metanol, Acetonitrilo, Diclorometano y Cloroformo/Isopropanol) se agita en vórtex y se mezcla por 2 h, posteriormente se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se pasa a otro vial para su análisis por HPLC/UV.

Validación del método analítico por HPLC/UV

La validación del método se realizó de acuerdo con los parámetros establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, en la sección 9 donde se establecen los criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia, específicamente en la sección 9.1 que establece la Validación de métodos analíticos (características de desempeño). En la Tabla 8 se muestra la comparativa de los parámetros establecidos en la NOM177-SSA1-1998 y 2013, así como los de la FDA con la finalidad de comprobar que en la Norma Mexicana cumple con los requisitos internacionales establecidos por la FDA.

Tabla 8. Comparativa de los parámetros de validación establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, 2013 y FDA.

NOM-177-SSA1-1998.	NOM-177-SSA1-2013.	FDA.
Rango.	-----	-----
Recuperación absoluta.	-----	-----
Linealidad.	Curva de Calibración.	Linealidad y rango.
Precisión. (A)Repetibilidad (B)Reproducibilidad Intralaboratorio	Precisión 1. Repetibilidad 2. Reproducibilidad	Precisión (A) Precisión del método (repetibilidad) (B) Precisión intermedia
Exactitud.	Exactitud.	Exactitud.
Estabilidad		
Selectividad.	Selectividad.	Especificidad.
Límite de Cuantificación.	Límite Inferior de Cuantificación.	Límite de Cuantificación.

Límite de detección.		Límite de detección.
Estabilidad.	Estabilidad de la muestra.	Estabilidad en Solución.
Condiciones de almacenamiento.	Estabilidad a corto plazo.	-----
-----	Estabilidad a largo plazo.	-----
-----	Estabilidad de muestra procesada.	-----
Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación.	Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación.	-----
Tolerancia.	-----	-----

A continuación, se describen los procedimientos realizados para validar cada uno de los parámetros, así como los criterios establecidos de aceptación o rechazo.

v. **Rango:** El rango se estableció en función de las concentraciones reportadas por Tomson y colaboradores (2007), las cuales van de 5 µg/ml – 105 µg/ml.

vi. **Linealidad:** El estudio de linealidad se estableció dentro de un rango de concentración definido en función de la capacidad de obtener resultados directamente proporcionales a las concentraciones del analito en suero. La relación matemática entre concentración y respuesta es continua y reproducible a lo largo del rango. La curva de calibración se realizó procesando suero control con concentraciones de Levetiracetam en un rango entre 5 a 105 µg/ml. (5, 25, 45, 65, 85 y 105 µg/ml) por triplicado.

vii. **Precisión:**

1. **Repetitividad:** Para determinar la repetitividad del método se analizó en un mismo día (intra-análisis) por quintuplicado, tres concentraciones conocidas (5, 65 y 105 µg/ml) en suero de ratón y se determinó el coeficiente de variación mediante la siguiente ecuación 1:

$$\%CV = \frac{DS}{[Promedio]} / 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de desviación.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15 % en métodos cromatográficos para que exista repetitividad.

2. **Reproducibilidad:** La reproducibilidad del método se determinó al analizar por duplicado durante tres días (inter-análisis), tres concentraciones conocidas (5, 65 y 105 µg/ml) en suero.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15 % como lo marca la norma para poder afirmar la existencia de reproducibilidad.

- viii. **Exactitud:** La exactitud del método se estableció mediante el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetitividad y reproducibilidad, los cuales deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%. Para lo cual se determinó la desviación estándar de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}}$$

Ecuación 2. Porcentaje de desviación.

- ix. **Recuperación absoluta (recobro):** Se analizaron por triplicado cuatro concentraciones conocidas: 5 µg/ml (baja), 25 y 65 µg/ml (media) y 105 µg/ml (alta) de Levetiracetam, tanto en suero como en solución.

La respuesta de las muestras de suero de levetiracetam procesadas como lo indica el método se comparó con las respuestas de soluciones de levetiracetam en las mismas concentraciones después de aplicar el método. El porcentaje de recobro se determinó al dividir la respuesta obtenida de las concentraciones en suero entre la respuesta de las concentraciones en solución y multiplicado por 100.

Criterio de aceptación: El porcentaje de recobro no deberá ser necesariamente 100 %, pero deberá ser consistente, preciso y reproducible en todo el intervalo de la curva de calibración.

- x. **Estabilidad de la muestra:** Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que LEV permanece estable en suero, durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico. Para lo cual, se evaluó por triplicado la respuesta de LEV a las concentraciones de las MCB y MCA, las cuales fueron analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo evaluadas.

Criterio de aceptación: La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

1. **Estabilidad a corto plazo:** Se evaluó la estabilidad de LEV en suero a temperatura ambiente y después de una hora 1 h se repitió.
2. **Estabilidad a largo plazo:** Se evaluó la estabilidad de LEV en suero, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantienen las muestras (-20°C), por un periodo de tiempo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis (1 mes).
3. **Estabilidad de la muestra procesada:** Se evaluó la estabilidad de LEV en muestras procesada a temperatura ambiente a las 24 y 72 horas.
4. **Estabilidad ciclos de congelación-descongelación:** Se evaluó la estabilidad de LEV en suero, almacenadas a la temperatura de congelación (-20°C) por al menos 12 h, descongelarlas completamente a temperatura ambiente y volver a congelar por al menos 12 h bajo las mismas

condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación fue de 3 ciclos.

xi. Sensibilidad:

1. *Límite de cuantificación*: Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo (5 µg/ml).

Criterio de aceptación: Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación si su valor promedio cae dentro del 20% del valor nominal y el coeficiente de variación no es mayor al 20%.

2. *Límite de detección*: Se determinó la concentración a la cual la señal del LEV en suero puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés. Se debe sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo.

- xii. *Selectividad*: Se demostró la selectividad mediante la no interferencia de compuestos endógenos en suero, al analizar el suero proveniente de seis posibles interferencias. Analizar suero normal, lipémico, hemolizado, normal con atrovastatina y lipémico con mucilago.

Se analizaron 6 muestras de suero provenientes de diferentes ratones de la cepa Balb-c para verificar la ausencia de picos en el cromatograma interferentes con el analito en cuestión. Posteriormente los cromatogramas fueron comparados con los de suero control con concentraciones de Levetiracetam de 25 y 85 µg/ml adicionados de Captopril como estándar interno. De igual forma se realizó la extracción del analito con diclorometano grado HPLC. La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el estándar Interno.

Determinación de la concentración de LEV en suero de ratones Balb-c.

Después de validar el método analítico se procesaron 58 muestras de suero de ratón Balb-c hembras preñas para determinar la concentración presente en cada muestra.

Población de estudio

Se manipularon 58 ratones hembra recién destetados de la cepa Balb-c, en condiciones estándar de bioterio, con una alimentación a base de dieta balanceada con nutricubo para roedores (Harlan Teklad Global Diets) y agua potable *ad libitum*, bajo temperatura ambiente controlada, con ciclos luz/oscuridad de 12/12 h de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

De las 58 ratonas, a 28 ratonas se les administro agua, 0.1 mL por cada 1g de peso, vía oral con cánula esofágica y a 30 ratonas se les administro una dosis de 100 mg/kg/día de levetiracetam, cuando las ratonas alcanzaron una edad adulta joven con un peso de 20 a 22 g, se inició con el apareamiento, para lo cual las ratonas se pusieron durante 3 días en contacto con el macho como se observa en el diagrama. Se tomó como día cero de gestación cuando se observó la presencia del tapón vaginal. Los animales se dividieron en grupos (n=10) de acuerdo con el tiempo de gestación (13 y 18 días) y se adicionaron dos grupos que no estaban en periodo de gestación [Figura 12].

Al cumplir el tiempo de gestación los animales se sacrificaron en cámara de éter y mediante punción cardiaca para obtuvo sangre total de acuerdo con la NOM-033-SAG/ZOO-2014. Posteriormente se realizó la disección del útero gestante por vía abdominal.

La disposición final de los residuos biológicos se manejó de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

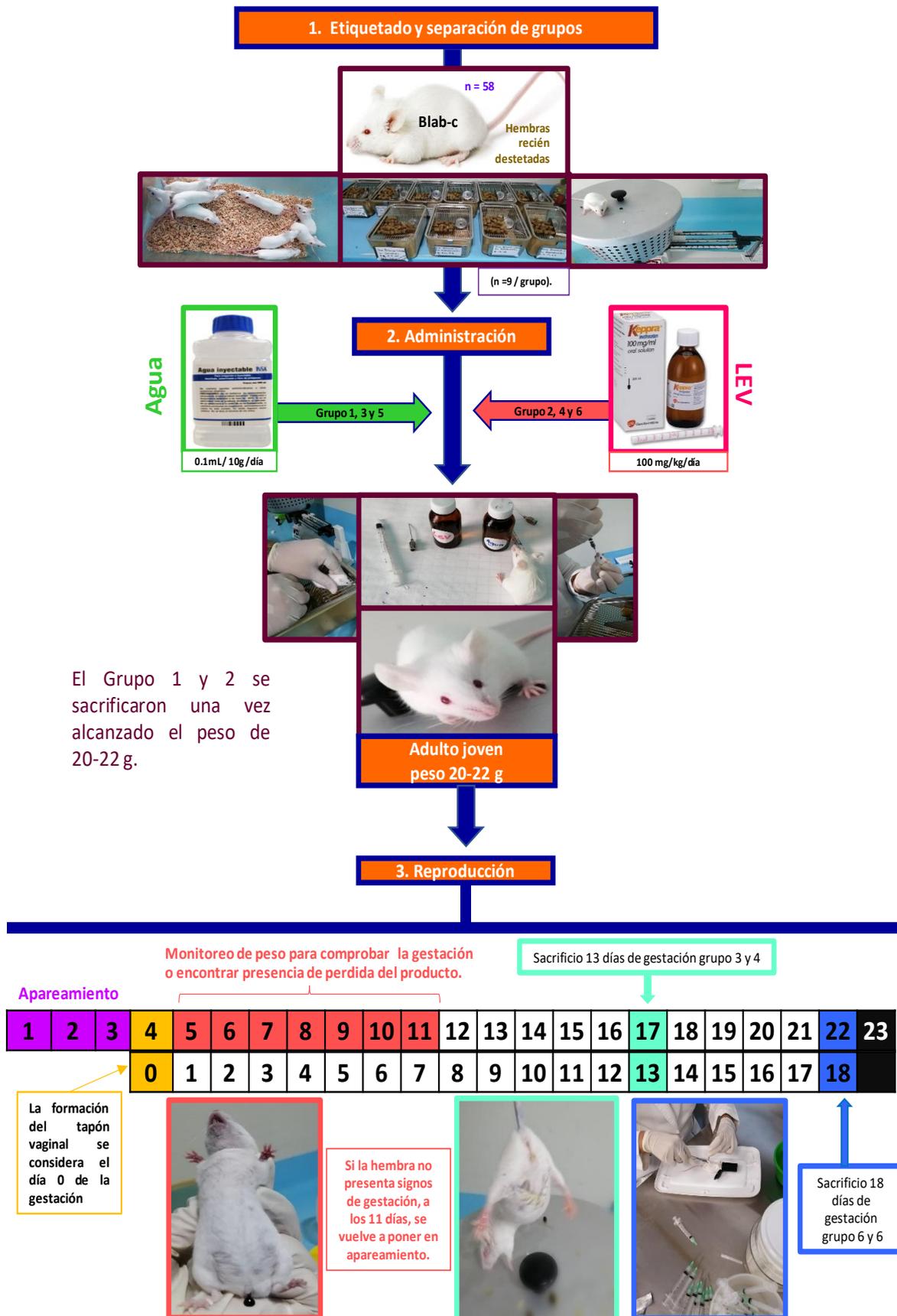


Figura 12. Diagrama de flujo del modelo animal y sus tratamientos. Se utilizaron 58 ratonas Balb-C, las cuales fueron divididas en dos grupo, a) expuestas a LEV (n=30) y b) expuestas a agua (n= 28).

Fase II. Expresión Placentaria de SLC38A4

Análisis de expresión genética en placenta

Se empleó una tercera parte de las placentas obtenidas de cada ratón para extraer ARN y se realizó posteriormente el análisis de expresión del gen *SLC38A4* placentario.

xiii. Obtención de muestra de tejido placentario

Las placentas se colocaron en cajas de petri y se lavaron cinco veces con buffer PBS 1X frío. Posteriormente las muestras de tejido se transfirieron a tubos cónicos de 1.5 ml conteniendo 700µl de RNA later (Ambion®). Los tejidos fueron almacenados a -4°C hasta su procesamiento.

xiv. Extracción de ARN de tejido placentario

El ARN total se extrajo mediante el protocolo TRIZOL RNA Isolation (Chomczynski & Mackey K, 1995).

Se realizó la extracción del ARN de las placentas utilizando 1 ml de Trizol. Las placentas fueron homogenizadas con el equipo LabGen 7 de Cole Parmer® de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Una vez obtenido el ARN se trató con el kit de DNA-free de Ambion® para descartar la contaminación por ADN genómico a través de DNAsa y su posterior inactivación. Posteriormente el ARN fue conservado a -80°C hasta su uso.

xv. Evaluación de la integridad del ARN

La integridad del ARN fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Para determinar si una muestra es íntegra se observan las especies de 28S, 18S y óptimamente 5.8S.

De igual forma se determinó la pureza y concentración a través de espectrometría en un Nanodrop™.

xvi. Síntesis de ADNc

A partir del ARN obtenido se sintetizó ADNc utilizando el Kit cDNA synthesis de Lifetechnologies™ mediante la técnica de random primer. La mezcla de reacción fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de ADNc se realizó en un termociclador de punto final marca labnet™ de acuerdo con las condiciones

mostradas en la Tabla 9. Una vez sintetizado el ADNc, se determinó su pureza y concentración a través de espectrofotometría en un Nanodrop™.

xvii. RTq-PCR de SCL38A4 placentario

La expresión del gen fue analizada mediante un ensayo de PCR semi-cuantitativo en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR de Applied Biosystems, utilizando una sonda marcada con FAM™ TaqMan® MGB probes (IDT).

La concentración óptima de trabajo y la eficiencia de amplificación (90-110%) para el gen problema y el gen constitutivo, se determinó a través de una curva estándar usando por duplicado 5 diluciones seriales 1:2 partiendo de 500 ng de muestra de ADNc.

La expresión relativa (RQ) y la cuantificación de la expresión ($2^{-\Delta Ct}$) del gen *SCL38A4* (referencia IDT, Mm.PT.58.33361620), fue normalizada utilizando como control constitutivo y endógeno el gen *beta-2-microglobulina de ratón (B2M)* con la sonda Mm.PT.39a.22214835 (IDT™). La especificidad de la reacción se verificó al finalizar la qPCR mediante una curva de disociación (Ct). Se analizó una cuantificación relativa, la cual fue utilizada para obtener la magnitud de la diferencia en los niveles de expresión genética en comparación con el gen de referencia y el gen problema en una muestra control de tejido placentario.

El método 2 delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control [Ecuación 2].

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CP} = 2^{-\Delta CP \text{ muestra} - \Delta CP \text{ control}}$$

Ecuación 3. Expresión Relativa.

xviii. Mezcla de reacción para la RTq-PCR para el gen SLC38A4

Se preparó la mezcla de reacción con un volumen final de 20 µl la cual está compuesta por: 10 µl de TaqMan® Gen Expression Master Mix, 1 µl de la sonda TaqMan® MGB-NFQ Probes, 2 µl de ADN (xxx ng/µl) y 7 µl de Agua libre de RNasas y DNAsas. El ensayo se realizó por duplicado y las mismas condiciones de reacción se utilizaron en este ensayo para el gen de *B2M*.

xix. Condiciones de la RTq-PCR para el gen SLC38A4

Las condiciones de reacción para *SLC38A4* fueron las siguientes: 10 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturalización y 1 minuto a 60°C para alineamiento y extensión final. Se obtuvieron los valores del umbral de los ciclos por duplicado y cada muestra será normalizada con *B2M* como control endógeno para calcular valores de RQ ó $2^{-\Delta Ct}$.

Tabla 9. Condiciones de la RT-PCR para la síntesis de ADNc.

Paso	1	2	3	4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo (minuto)	10	120	5	∞

Fase III. Correlación entre la concentración de LEV en suero y la expresión de *Slc38a4* en placenta de ratones Balb-c.

Se utilizó el programa Statgraphics Centurion para realizar una correlación de Pearson, entre las concentraciones de LEV en suero y la expresión de *SLC38A4*. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0.

Fase IV. Estrés Oxidativo

a) Medidas antropométricas

Se realizó la cuantificación de sacos gestantes, número de productos no natos y se determinó el peso, tamaño (ancho y talla) mediante un vernier y aspecto.

b) Peroxidación hepática, renal y peroxidación fetal.

La determinación de estrés oxidativo se evaluó mediante la reacción del malondealdehído con el ácido tiobarbitúrico (TBA), por medio del método modificado de Uchiyama y Mihara en 1978, para lo cual se preparó un homogenizado de riñón, hígado y tejido fetal al 10% con KCl 1.15% (por cada 0.5g de tejido se agregaron 5ml de solución). Se tomaron 0.5 ml del homogenizado y se le añadieron 3ml de H_3PO_4 1% y 0.3ml de ácido TBA 0.6%, la mezcla se puso a baño maría en ebullición durante 45 minutos, posteriormente se dejó enfriar y se les agregaron 3ml de 1-butanol, se centrifugó a 2500rpm durante 5 minutos, se separaron las fases. La fase orgánica se leyó a 535nm en un espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis.

Para la cuantificación de la concentración se realizó una curva de calibración con MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (Uchiyama et al., 1978).

Análisis Estadístico.

El método de validación se satisface mediante el cálculo del coeficiente de correlación (r) del producto momentáneo de Pearson (medida de la intensidad de asociación lineal entre dos variables), el coeficiente de variación inter e intra-ensayo el cual mide la dispersión relativa de los datos y desviación estándar porcentual (DEP%) respecto al teórico.

Para los datos de número, tamaño, peso y lipoperoxidación de producto de productos no nato se realizó el análisis intergrupar mediante un ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. Al igual que para peroxidación hepática y renal.

Para la comparación de expresión génica placentaria de Slc38A4 se realizó un análisis intergrupar mediante la comparación de medias con la prueba t de Student para muestras independientes en un intervalo de confianza del 95%.

Se realizó una correlación de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables, con un nivel de confianza del 95.

El análisis se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics 20, para los gráficos fue utilizado el software Grad Pad Prism 7 y para las correlaciones estadísticas se utilizó el programa Statgraphics Centurion.

6. Resultados.

Fase I: Validación HPLC/UV para la determinación de Levetiracetam.

La validación del método cromatográfico para la cuantificación de LEV se realizó en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Como primer paso se estandarizó el método en base a las condiciones cromatográficas óptimas y el método de extracción de LEV en suero. La validación del método incluyó el rango de concentración, linealidad, precisión, exactitud, recobro absoluto, estabilidad de la muestra y selectividad. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Condiciones cromatográficas

Se estandarizaron las condiciones del análisis cromatográfico del LEV y como estándar interno se seleccionó captopril en base a lo reportado previamente, utilizando como fase estacionaria una columna de fase reversa C18 5 μm , 150 x 4,6 mm.

De acuerdo con la literatura, las longitudes de onda reportadas para la detección de LEV mediante espectrofotométrica en la región UV son de 205, 210, 220 y 230 nm, siendo la más referenciada la longitud de onda de 205nm.

En base a lo anterior se realizó un barrido en el rango de 190-250 nm, del estándar de LEV a una concentración de 1mg/mL observándose una serie de bandas de baja absorbanza y el pico del estándar de LEV se presentó a la longitud de 231nm [Figura 13], por lo cual se trabajó con esa longitud de onda para su determinación y cuantificación.

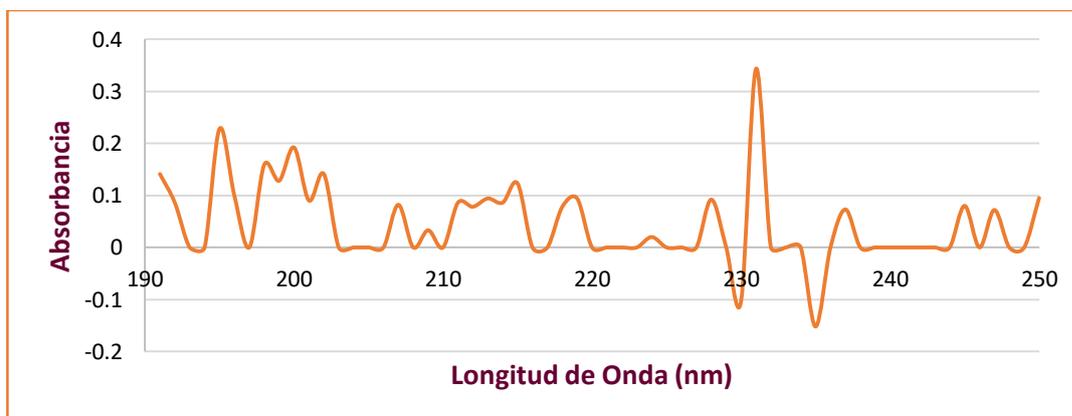


Figura 13. Espectro correspondiente al estándar de levetiracetam a una concentración de 1 mg/ml, solvente: ácido fosfórico al 0.43% y acetonitrilo (90:10) y pH de 6.8.

Para establecer la fase móvil en la cual se obtuviera una mejor elución y definición del analito LEV, se evaluaron diferentes mezclas de los solventes previamente reportados para su elución (acetonitrilo, metanol y ácido fosfórico), a diferentes proporciones, pH, y flujo, obteniendo la mejor elución y resolución con la fase móvil compuesta por la mezcla de ácido fosfórico al 0.43% y acetonitrilo, en una proporción de 90:10 a un pH de 6.8.

En la figura 14 se muestran los cromatogramas obtenidos de la fase móvil, el estándar interno (captopril) y el analito LEV, eluidos con la fase móvil compuesta por la mezcla de ácido fosfórico al 0.43% y acetonitrilo (90:10, pH 6.8) a un flujo de 1.5 mL/min y una longitud de onda de 231 nm.

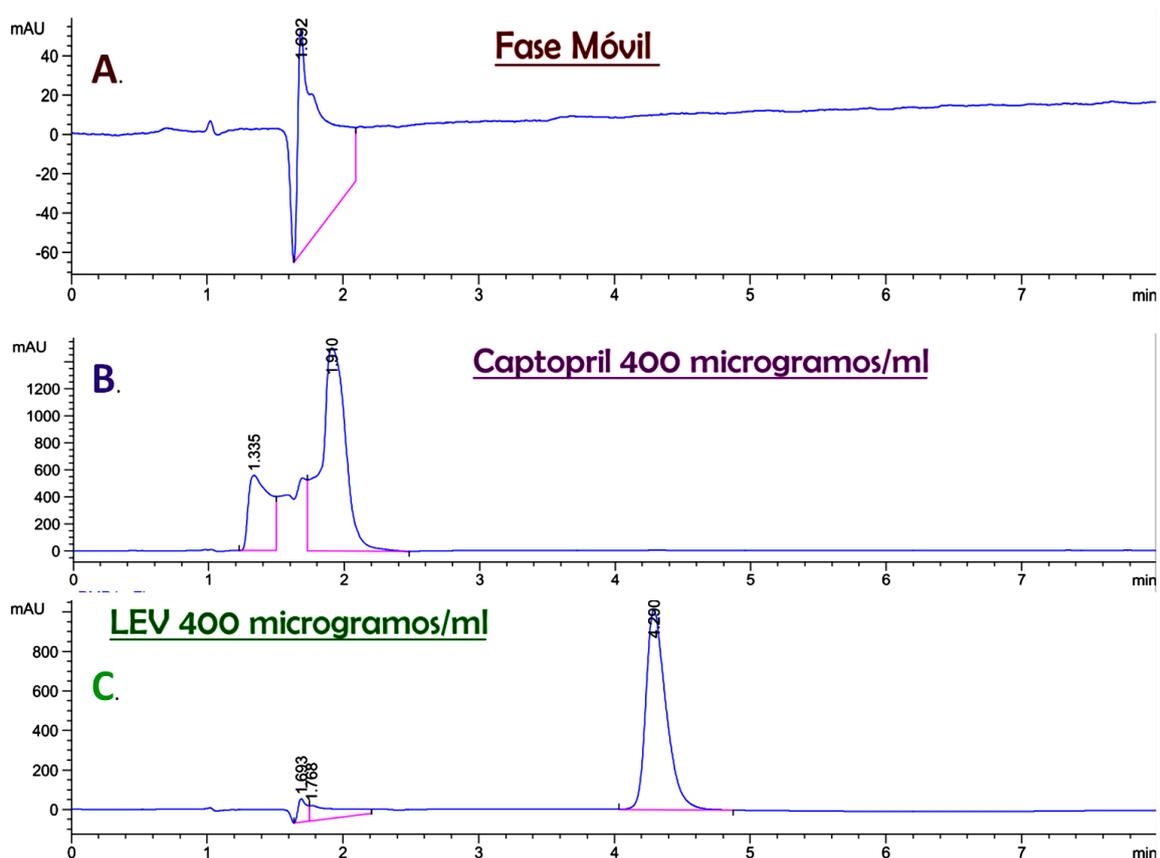


Figura 14. Cromatogramas en solución de los analitos evaluados a las condiciones cromatográficas establecidas. Panel A: fase móvil; Panel B: captopril (400µg/mL); panel C: levetiracetam (400µg/mL).

En el panel A se muestra el cromatograma obtenido después de inyectar al cromatógrafo la fase móvil, observándose el pico del frente de solvente. En el panel B se muestra el cromatograma de estándar interno (captopril) en el cual se observa el pico solapado, siendo incompleta la separación a pesar de las variaciones hechas a la fase

móvil y condiciones cromatográficas con un tiempo de retención de 1.91 min, por tal motivo su cuantificación se realizó mediante la relación pico/valle (p/v). Para lo cual, el integrador calcula la relación entre la altura corregida por la línea base del menor de los picos y la altura corregida por la línea base del valle [Ecuación 4].

$$\frac{p}{v} = \frac{Hp}{Hv}$$

Ecuación 4: Determinación de la relación pico-valle.

Hp: altura del pico menor por encima de la línea base extrapolada, Hv: altura en el punto más bajo de la curva que separa los picos menor y mayor por encima de la línea base extrapolada.

En el panel C de la figura 15, se muestra el cromatograma del analito LEV en solución, observándose una buena elución y definición del analito, con un tiempo de retención de 4.2 min.

Posteriormente se inyectó la mezcla de estándar interno de captopril (400 µg/mL) y analito LEV (400 µg/ml). La figura 15 corresponde al cromatograma obtenido después de la inyección de la mezcla en solución, observándose que el captopril a esa concentración no logra una buena definición puesto que no es su longitud de onda óptima por lo cual se incrementó la concentración a 1 mg/mL para adicionar a las muestras. El analito LEV se observa bien separado y definido de los demás picos, también se observó un pequeño incremento en los tiempos de retención de los analitos al inyectarlos juntos [Figura 15]

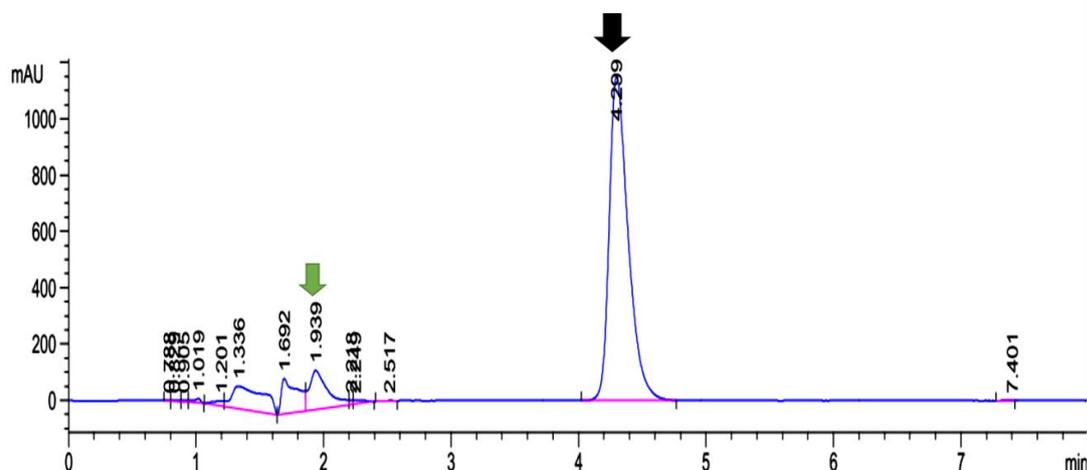


Figura 15. Cromatograma correspondiente a la mezcla en solución de levetiracetam y captopril. En flecha verde se muestra el pico de captopril (EI) a una concentración de 400µg/mL con un tiempo de retención de 1.939 min y con flecha negra se muestra el pico de levetiracetam a una concentración de 400 µg/ml y un tiempo de retención de 4.299 min. El tiempo de corrida fue de 8 min.

En la tabla 10 se muestra el resumen de las condiciones cromatográficas obtenidas donde el analito LEV mostro la mejor separación y resolución en solución.

Tabla 10. Condiciones Cromatográficas.

Parámetros Instrumentales	Condiciones
Fase móvil	Ácido fosfórico 0.43%: acetonitrilo (90:10)
pH de la fase Móvil	6.8 ± 1
Modo de elución	Isocrático
Tipo de detección	Ultravioleta
Longitud de onda	231 nm
Columna	Fase reversa C18 5 µm, 150 x 4,6 mm
Temperatura columna	35.0°C
Flujo de fase móvil	1.5 ml/min
Volumen de inyección	15 µl
Modo de cuantificación	Estándar interno y curva de calibración
Modo de cualificación	Tiempo de Retención
Unidades de concentración	µg/ml
Tiempo de retención Levetiracetam	4.2 ± 0.125 min
Tiempo de retención Captopril	1.91 ± 0.07 min
Tiempo de corrida	8 min

La linealidad de analito LEV en solución se evaluó mediante curva de calibración dentro del rango de concentración definido (5-105 µg/ml). Las concentraciones evaluadas fueron 5, 25, 45, 65, 85 y 105 µg/ml de LEV por quintuplicado, utilizando la concentración de 400 µg/mL del estándar interno, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Áreas obtenidas de las concentraciones evaluadas de la curva de calibración en solución de levetiracetam.

Concentración	Área (mAU)					Media	DS
	1	2	3	4	5		
5 µg/ml	584	678	617.4	621.6	576.7	613.5	35.9
25 µg/ml	2793.4	2971.9	3016.4	2989.3	2775.3	2905.5	103.1
45 µg/ml	4978.2	5284	5324.4	5248.8	4659.5	5086.1	251.1
65 µg/ml	7250.5	7724	7692.8	7522.5	6774.8	7375.5	351.7
85 µg/ml	9336.1	10053	10022.3	9347.3	8406.8	9393.3	600.2
105 µg/ml	10993	11983	11845	10542.4	9831	10978.9	806.1

mAU: mili unidades de absorbancia; DS: desviación estándar

Con los promedios y DS obtenidos se realizó la curva de calibración [Figura 16], obteniéndose la ecuación lineal de la recta $y = 108.76 x$, con un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.995$

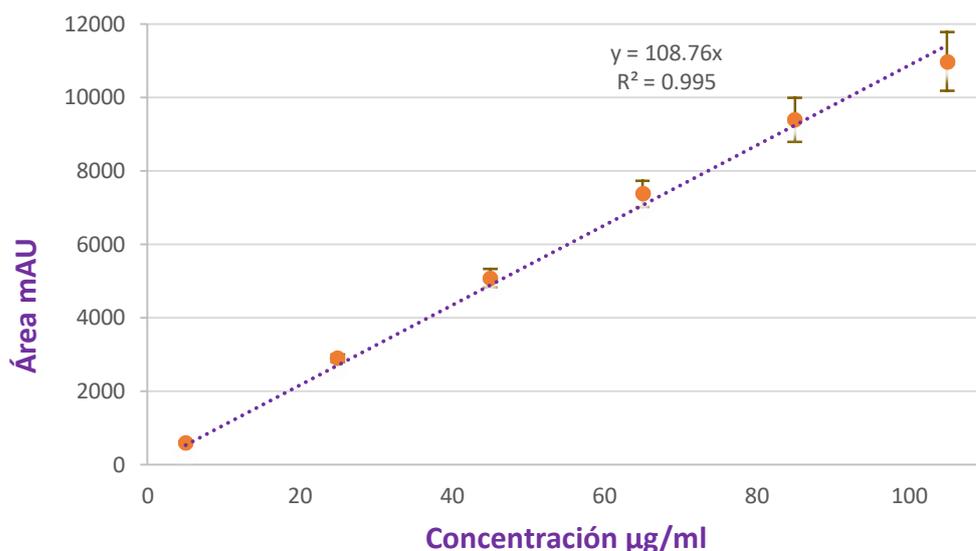


Figura 16. Curva de calibración de Levetiracetam en solución. Se evaluaron 6 concentraciones conocidas, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.995. mAU: mili unidades de absorbancia.

Métodos de Extracción de Levetiracetam

Se estandarizó el método de extracción de LEV en suero, en base en el recobro y linealidad de la extracción, basándose en las metodologías previamente descritas por otros autores los cuales utilizaron como solventes de extracción metanol, acetonitrilo, cloroformo/isopropanol y diclorometano [Tabla 13].

Para estandarizar la extracción se preparó un concentrado de suero, con el cual se prepararon seis concentraciones conocidas de LEV (5, 25, 45, 65, 85 y 105 µg/ml), las cuales formaron los puntos de la curva y se adicionó una concentración constante de EI (1 mg/mL). El volumen de suero y solvente utilizados para la extracción fue de acuerdo con lo descrito en la tabla 12.

Tabla 12. Solventes utilizados para la extracción de levetiracetam.

<i>Volumen suero (LEV + EI)</i>	<i>Volumen Solvente</i>	<i>Solvente</i>	<i>Referencia</i>
200 µl	1 ml	Metanol	<i>Naidu et al., 2010</i>
150 µl	1ml	Acetonitrilo	<i>Antonilli et al., 2011</i>
500 µl	5 ml	Cloroformo/ Isopropanol (90:10)	<i>Juenke et al., 2006</i>
50 µl	1 ml	Diclorometano	<i>Freitas et al., 2015</i>
200 µl	1 ml	Diclorometano	<i>Freitas et al., 2015</i>

La extracción se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: En un tubo de ensayo se depositó el volumen de suero y solvente correspondiente y se mezcló mediante vortex durante 30 s, posteriormente el tubo fue puesto durante 2 h en balanceo para una mejor extracción. Transcurrido el tiempo, se centrifugo a 1000 rpm durante 10 min, para separar las dos fases. La fase orgánica fue transferida a un tubo cónico y se llevó a sequedad con aire. La muestra se reconstituyo con 60 μ L de fase móvil (H_3PO_4 0.43% pH 6.8), el volumen inyectado al sistema cromatográfico fue de 15 μ L.

Cada punto de la curva con los diferentes métodos de extracción utilizados se realizó por triplicado. Las curvas de calibración obtenidas de los diferentes métodos evaluados de extracción se muestran en la figura 17.

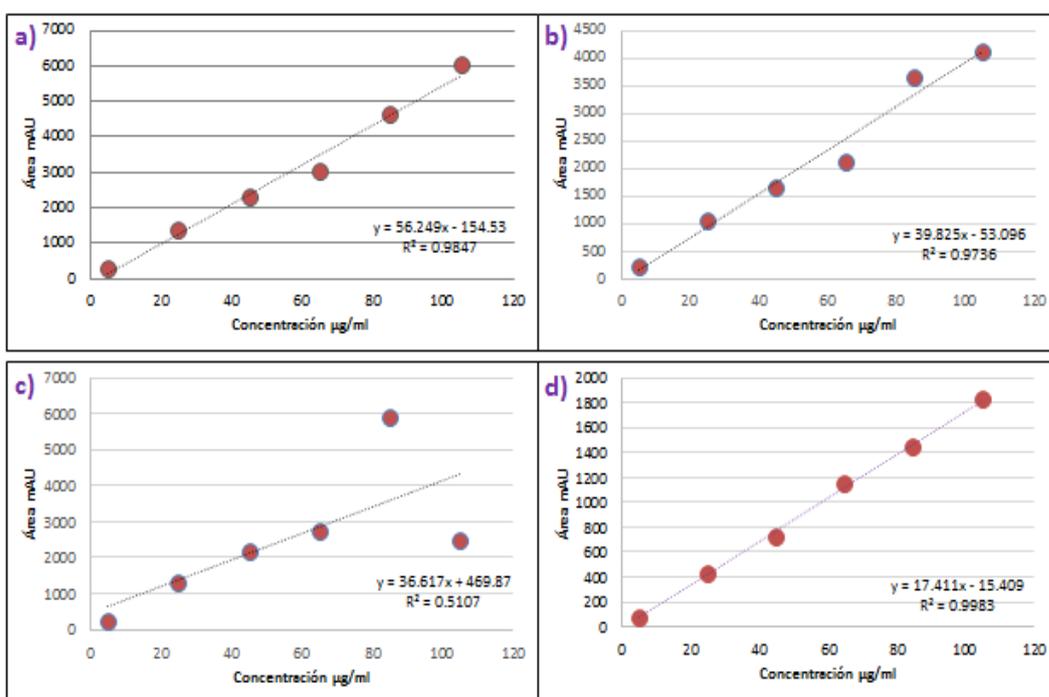


Figura 17. Curvas de calibración de LEV en suero con diferentes solventes. a) solvente de extracción metanol, b) solvente de extracción acetonitrilo, c) solvente de extracción cloroformo/isopropanol, d) solvente de extracción diclorometano. Cada concentración se evaluó por triplicado. mAU: mili unidades de absorbancia

Como se puede observar en la figura 17, con el solvente de extracción metanol, se obtuvo mayor área bajo la curva a las diferentes concentraciones en contraste las áreas más bajas se presentan con el solvente de extracción diclorometano. Las mayores correlaciones lineales entre el área y la concentración se presentaron con los solventes de extracción diclorometano y metanol. En la curva de calibración de solvente de

extracción cloroformo/ isopropanol se observa una pérdida de la linealidad en las concentraciones más altas evaluadas.

En relación con el recobro el cual se obtuvo al dividir la respuesta obtenida de las concentraciones evaluadas en suero entre la respuesta de las concentraciones evaluadas en solución, multiplicado por 100. Los resultados obtenidos muestran que la extracción metanólica es la que presenta el menor recobro manteniéndose constante en las tres concentraciones analizadas 46.5-54.06%. En relación a la extracción con acetonitrilo en recobro fue en un intervalo de 106.42-116.25% y con cloroformo/isopropanol del 75.92-186%. La extracción con diclorometano presenta un intervalo de recobro de 81.92-123%.

Tabla 13. Resultados obtenidos de la linealidad y recobro de LEV en suero de acuerdo con los diferentes solventes utilizados de extracción.

<i>Solvente</i>	<i>Linealidad suero</i>				<i>Recobro (µg/ml)</i>			<i>Recobro promedio (%)</i>
	<i>r²</i>	<i>R</i>	<i>M</i>	<i>B</i>	<i>5</i>	<i>65</i>	<i>105</i>	
Metanol	0.984	0.991	56.249	-154.54	46.4	55	54.06	51.82
Acetonitrilo	0.973	0.9867	39.82	-53.09	116.25	111.26	106.42	111.31
Cloroformo/ Isopropanol	0.510	0.7146	36.61	469.87	101.14	186	75.92	121.02
Diclorometano	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Diclorometano	0.998	0.999	17.411	-15.409	81.92	85	123	97.64

r²: r: m: pendiente; b: ordenada al origen; µg/mL: microgramos por mililitro; %: porcentaje.

La norma marca que no es necesario el 100% de recobro, pero que este debe ser consistente, preciso y reproducible en todo el intervalo de la curva de calibración. En base a los resultados obtenidos de la linealidad, y del recobro absoluto, se decidió emplear el método en el cual se utiliza un volumen de 200 mL de suero y diclorometano como solvente de extracción

Validación del Método Analítico

El método analítico se validó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. La validación del método incluyó los parámetros que se describen a continuación:

i. Rango de concentración.

El rango de la concentración de LEV a nivel plasmático se estableció de 5 a 105 µg/ml de acuerdo a las concentraciones séricas reportadas por Tomson y colaboradores (2007). El estándar interno, captopril, se utilizó a una concentración constante de 1 mg/ml.

ii. Linealidad.

La linealidad del método cromatográfico para LEV en suero se estableció mediante la relación concentración/respuesta, para lo cual se evaluó 6 concentraciones conocidas de LEV (5, 25, 45, 65, 85 y 105 µg/ml) por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18. La correlación obtenida fue mayor a 0.99 y el coeficiente de variación entre las áreas obtenidas por concentración fue <10%, indicando una baja dispersión entre las mediciones de una misma concentración.

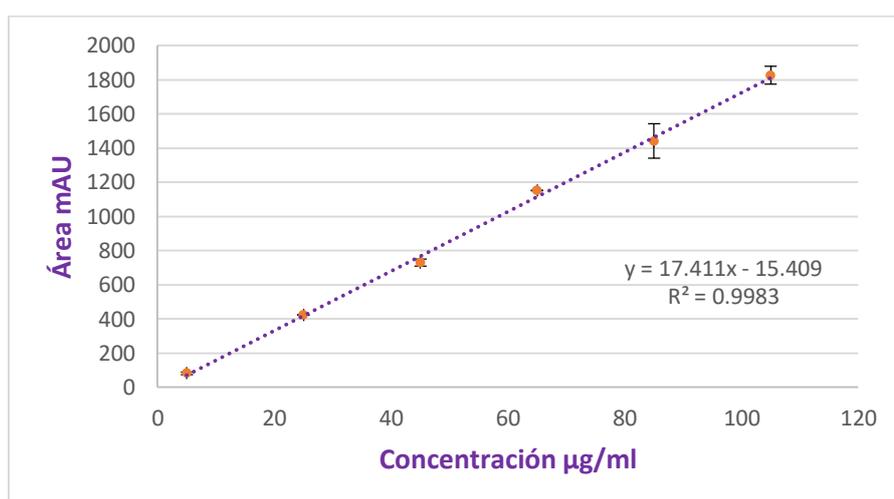


Figura 18. Curvas de calibración del analito LEV en suero. Cada concentración se evaluó por triplicado, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.9983. mAU: mili unidades de absorbancia.

La NOM-177-SSA1-2013 establece que la correlación debe ser mayor o igual de 0.9 y el coeficiente de variación debe ser ≤15% [Tabla 14], por lo cual se cumplen los criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013

Tabla 14. Resultados de la correlación entre la concentración del analito y respuesta.

Criterios NOM-177-SSA1-2013	Valor experimental	Cumple Criterio
$r \geq 0.99$	0.9991	Si
$r^2 \geq 0.98$	0.9983	Si
b----	-15.409	-----
m----	17.411	-----
$CV \leq 15\%$	0.5884	Si

CV: coeficiente de variación, r: coeficiente de correlación; r^2 : coeficiente de determinación

iii. Precisión.

La precisión se determinó de acuerdo a la repetitividad y reproducibilidad.

1. Repetibilidad.

Para determinar la repetibilidad del método se analizaron en un mismo día (intra-análisis) por quintuplicado, las concentraciones correspondientes a los puntos control (PC) que se manejaron durante el proceso de validación, PC1 (5 µg/mL), PC2 (65 µg/mL) y PC3 (105 µg/mL) de Levetiracetam en suero. El coeficiente de variación para el analito de interés fue ≤ 7.67 [Tabla 15].

Tabla 15. Resultados obtenidos del intra-análisis de LEV.

REPETIBILIDAD					
PC (µg/ml)	\bar{X} Área (mAU)	DS (mAU)	CV (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable
5	80.67	6.19	7.67	$\leq 20 \%$	Si
65	1156.1	19.23	1.66	$\leq 15 \%$	Si
105	1703.45	66.50	3.9	$\leq 15 \%$	Si

PC: puntos de control; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; mAU: mili unidades de absorbancia; µg/mL: microgramos por mililitro.

2. Reproducibilidad.

La reproducibilidad del método se determinó al analizar por duplicado durante tres días (inter-análisis), las concentraciones correspondientes a los PC1, PC2 y PC3 del analito LEV en suero. El coeficiente de variación para LEV fue ≤ 11.97 [Tabla 16].

Tabla 16. Resultados obtenidos del inter-análisis de LEV.

REPRODUCIBILIDAD					
PC (µg/ml)	\bar{X} Área (mAU)	DS (mAU)	CV (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable
5	77.13	9.19	11.91	$\leq 20 \%$	Si
65	1186.49	55.09	4.64	$\leq 15 \%$	Si
105	1869.81	223.84	11.97	$\leq 15 \%$	Si

PC: puntos de control; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; mAU: mili unidades de absorbancia; µg/mL: microgramos por mililitro.

iv. Exactitud.

La exactitud del método se estableció mediante el valor promedio de las determinaciones en los niveles de concentración de los puntos control (PC1, PC2 y PC3)

de los datos de repetibilidad y reproducibilidad del analito LEV [Tabla 17]. Se determinó la desviación estándar de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación 2.

$$\%desviación = 100x \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida.}}{\text{Concentración adicionada.}}$$

Tabla 17. Resultados obtenidos de la repetibilidad y reproducibilidad de LEV para la obtención de la exactitud del método analítico.

EXACTITUD								
LEV (µg/ml)	\bar{X} (mAU)	DS	CV (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable	DS (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable
5	78.9	1.77	2.24	≤ 20 %	Si	8.4	20%	Si
65	1171.29	15.195	1.29	≤ 15 %	Si	4.86	15%	Si
105	1786.63	83.18	4.65	≤ 15 %	Si	3.33	15%	Si
REPETIBILIDAD								
LEV (µg/ml)	\bar{X} (mAU)	DS	CV (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable	DS (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable
5	80.67	6.19	7.67	≤ 20 %	Si	10.2	20%	Si
65	1156.1	19.23	1.66	≤ 15 %	Si	3.50	15%	Si
105	1703.45	66.50	3.9	≤ 15 %	Si	5.98	15%	Si
REPRODUCIBILIDAD								
LEV (µg/ml)	\bar{X} (mAU)	DS	CV (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable	DS (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable
5	77.13	9.19	11.91	≤ 20 %	Si	6.2	20%	Si
65	1186.49	55.09	4.64	≤ 15 %	Si	6.2	15%	Si
105	1869.81	223.84	11.97	≤ 15 %	Si	3.11	15%	Si

LEV: levetiracetam; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; NOM: Norma Oficial Mexicana; mAU: mili unidades de absorbancia; %: porcentaje; µg/mL: microgramos por mililitro.

v. Recobro Absoluto.

El recobro absoluto se obtuvo mediante la comparación del área bajo la curva en suero y solución de 4 puntos de la curva de linealidad de LEV por triplicado (5, 25, 65, 105 µg/mL). El porcentaje de recobro obtenido de los cuatro puntos de la curva estuvo en el rango de 87.6 a 92.66% [Tabla 18]

Tabla 18. Capacidad de recuperación de Levetiracetam.

LEV [$\mu\text{g/ml}$]	$\bar{X} \pm \text{DS}$ (mAU)		CV (%)		Recobro %	Criterio NOM-177- SSA1-2013	Aceptable
	Suero	Sln.	Suero	Sln.			
5	82.705 \pm 7.85	94.38 \pm 1.34	9.49	1.41	87.6	80-120	Si
25	423.81 \pm 2.63	457.4 \pm 27.03	0.62	5.9	92.66	85-115	Si
65	1151.2 \pm 1.51	1290.10 \pm 46.32	0.131	3.59	89.23	85-115	Si
105	1825.9 \pm 51.08	2042.70 \pm 100.7	2.79	4.93	89.39	85-115	Si

DS: Desviación estándar, CV: Coeficiente de Variación, Sln: solución; mAU: mili unidades de absorbancia; %: porcentaje; $\mu\text{g/ml}$: microgramos por mililitro.

vi. Estabilidad de la Muestra.

Se determinó la estabilidad de analito LEV de acuerdo con lo estipulado por la NOM-177-SSA1-2013, la cual establece que debe evaluarse la respuesta del analito a la concentración más baja y alta de la curva de calibración por triplicado inmediatamente después de su preparación. Las concentraciones de LEV evaluadas fueron 5 y 105 $\mu\text{g/ml}$, con un coeficiente de variación de 11.62 y 2.60 respectivamente, cumpliendo así con el criterio de la NOM-177-SSA1-2013.

1. Estabilidad de las muestras a corto plazo.

Se evaluó la estabilidad del LEV recién preparadas y una hora después de su preparación a las condiciones cromatográficas establecidas. Las concentraciones evaluadas fueron 45, 65 y 85 $\mu\text{g/ml}$ de LEV en suero.

LEV mostró ser estable durante la primera hora después de ser sometidas a las condiciones del ensayo evaluadas [Tabla 19].

Tabla 19. Resultados obtenidos de la estabilidad a corto plazo de LEV

LEV [$\mu\text{g/ml}$]	\bar{X} (mAU)	DS	CV (%)	Criterio NOM	Aceptable	[LEV] Obtenida [$\mu\text{g/ml}$]
Estabilidad de LEV al tiempo cero.						
45	740.9	17.7	2.38	≤ 15	Si	43.43
65	1237.0	51.0	4.1	≤ 15	Si	71.93
85	1376.11	10.1	0.73	≤ 15	Si	79.82
Estabilidad de LEV a 1 hora.						
45	720.6	15.4	2.13	≤ 15	Si	42.27
65	1245.4	23.5	1.88	≤ 15	Si	72.41
85	1367.5	17.4	1.27	≤ 15	Si	79.42

LEV: levetiracetam; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; NOM: Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-2013; mAU: mili unidades de absorbancia; %: porcentaje; $\mu\text{g/ml}$: microgramos por mililitro.

2. Estabilidad de la muestra procesada

La estabilidad de la muestra procesada se evaluó cada 24h, durante 3días. Los viales con las muestras de LEV a evaluar (45, 65 y 85 µg/ml) se mantuvieron en el auto muestreador en condiciones ambientes.

LEV mostró ser estable durante 48h, de acuerdo a los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013 [Tabla 20], a partir de las 72h se observa la degradación del analito, decrementándose el recobro en las concentraciones baja y alta evaluadas, quedando fuera del rango establecido por la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 20. Estabilidad de las muestras procesada de LEV.

LEV [µg/ml]	\bar{X} (mAU)	DS	CV (%)	Criterio NOM	Aceptable	[LEV] Obtenida [µg/ml]
Estabilidad de LEV después de 24 horas.						
45	742.9	48.8	6.56	≤ 15	Si	43.55
65	1208.05	8.05	0.66	≤ 15	Si	70.29
85	1203.05	3.25	7.43	≤ 15	Si	75.73
Estabilidad de LEV después de 72 horas.						
45	640	10	15.6	≤ 15	No	37.64
65	1075	25	2.32	≤ 15	Si	62.62
85	1217	17	18.9	≤ 15	No	70.78

LEV: levetiracetam; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; NOM: Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-2013; mAU: mili unidades de absorbancia; %: porcentaje; µg/mL: microgramos por mililitro.

3. Estabilidad a largo plazo

Se evaluó la estabilidad de LEV en las condiciones de almacenamiento de la muestra (-20°C). LEV mostro ser estable durante los 30 días después de su preparación, cumpliendo con lo estipulado en la NOM-177-SSA1-2013 para la determinación de la estabilidad de la muestra bajo condiciones de almacenamiento [Tabla 21].

Tabla 21. Estabilidad a largo plazo de Levetiracetam.

LEV [µg/ml]	Área \bar{X} (mAU)	DS	CV (%)	Criterio NOM	Aceptable	[LEV] Obtenida [µg/ml]
25	857.32	132.25	3.76	≤ 15	Si	23.3
65	2620.04	28.78	6.25	≤ 15	Si	74.46
105	3682.93	116.04	3.15	≤ 15	Si	105.31

LEV: levetiracetam; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; NOM: Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-2013; mAU: mili unidades de absorbancia; %: porcentaje; µg/mL: microgramos por mililitro; [LEV]: concentración de levetiracetam.

4. Estabilidad ciclos de Congelación-Descongelación

Se evaluó la estabilidad de LEV en suero, almacenado a -20°C , que es la temperatura de congelación en la cual se mantendrán las muestras. Se realizaron 3 ciclos de congelación descongelación de las muestras, cada ciclo fue de 12h congelación/descongelación. Las concentraciones evaluadas de LEV fueron 45, 85 y 105 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 22.

Tabla 22. Estabilidad de LEV en ciclos de Congelación-Descongelación.

LEV [$\mu\text{g/ml}$]	Área \bar{X} (mAU)	DS	CV (%)	Criterio NOM %	Aceptable	[LEV] Obtenida [$\mu\text{g/ml}$]
45	521.634	70.41	13.49	≤ 15	Si	30.7
85	1219.01	43.32	3.55	≤ 15	Si	70.89
105	2175.96	82.09	3.77	≤ 15	Si	125.85

LEV: levetiracetam; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; NOM: Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-2013; mAU: mili unidades de absorbancia; %: porcentaje; $\mu\text{g/mL}$: microgramos por mililitro; [LEV]: concentración de leveteracetam

Las tres dosis evaluadas mostraron un coeficiente de variación menor al 15%, cumpliendo con lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013, sin embargo, se observa se observa degradación en los cromatogramas.

En la figura 19 se muestran los cromatogramas obtenidos de las tres concentraciones evaluadas de LEV después de ser sometidos a los ciclos de cogeneración -descongelación, como puede observarse el pico pierde su definición observándose la degradación del metabolito.

Estabilidad ciclos de Congelación-Descongelación

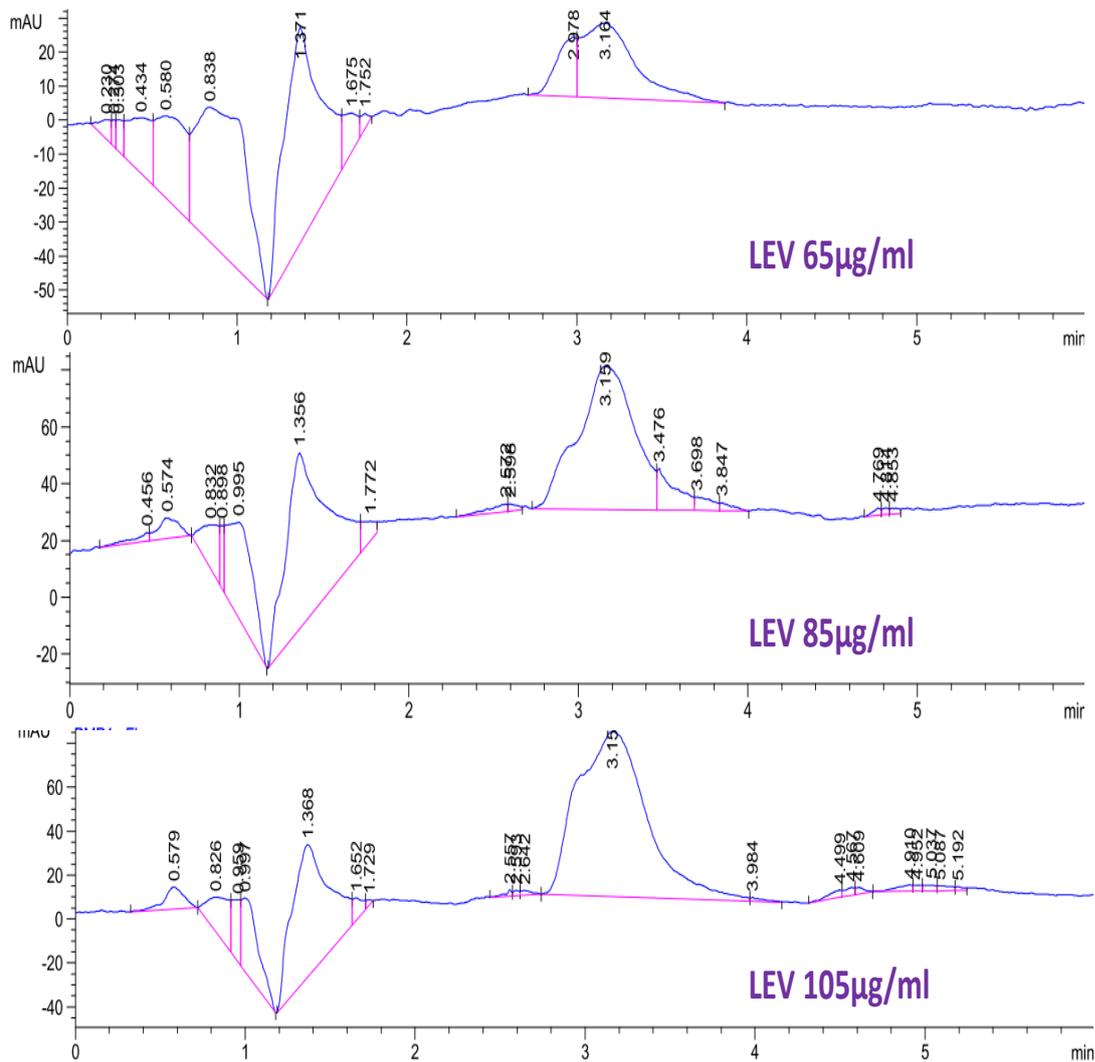


Figura 19. Cromatograma obtenido después de someter a 3 ciclos de Congelación y descongelación las muestras de LEV.

vii. Sensibilidad.

La sensibilidad del método se determinó mediante el límite de cuantificación y el límite de detección.

Para establecer el límite de detección, se determinó la menor concentración del analito en la matriz de la muestra, para lo cual se evaluaron las concentraciones de 0.5, 0.75 y 1 µg/mL de LEV en suero, observándose señal a partir de 1 µg/mL de LEV. De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 no existe un límite de detección mínimo.

El límite de cuantificación se determinó en base a la concentración menor del analito LEV en suero que presentara exactitud y precisión. El límite de cuantificación fue de 5

$\mu\text{g/mL}$ para el analito, con un coeficiente de variación de 11.88 % [Tabla 23]. Los cromatogramas obtenidos me muestran en la figura 20.

Tabla 23. Límite de cuantificación y detección.

	LEV [$\mu\text{g/ml}$]	Área $\bar{X} \pm \text{DS}$ (mAU)	CV (%)	Criterio NOM-177-SSA1-2013	Aceptable
Límite de Detección	1 ($\mu\text{g/ml}$)	5.0 ± 7.07	-----	No existe limite	Si
Límite de Cuantificación	5 ($\mu\text{g/ml}$)	85.40 ± 10.15	11.88	$\leq 20\%$	Si

LEV: levetiracetam; \bar{X} : media aritmética; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación; mAU: mili unidades de absorbancia; %: porcentaje; $\mu\text{g/mL}$: microgramos por mililitro.

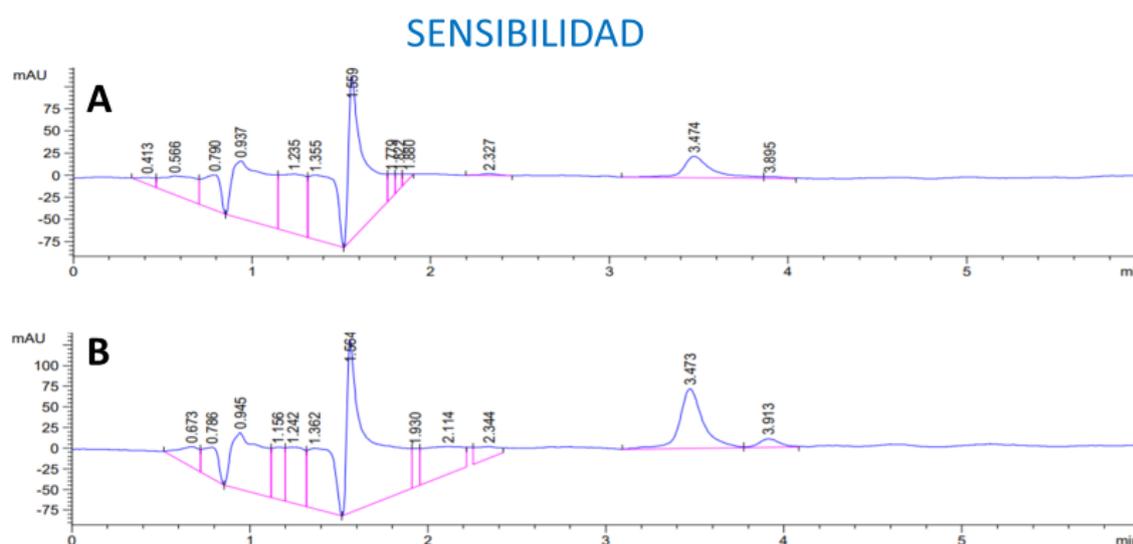


Figura 20. Cromatogramas correspondientes al analito de LEV y su estándar interno captopril. A. Límite de detección y B. Límite de cuantificación.

viii. Selectividad.

La selectividad del método se estableció al analizar seis diferentes muestras de suero de ratón sin analito. Se buscó posibles interferencias como son compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante. También se probaron distintas condiciones del suero como fueron el suero lipémico, hemolizado y con atrovastatina. En la figura 21 se muestran los cromatogramas obtenidos de los diferentes sueros evaluados. De acuerdo a los cromatogramas obtenidos con los diferentes sueros, no existe interferencia de sustancia endógenas o exógenas en el tiempo de retención del analito a evaluar (LEV, tiempo de retención 3.902 min) [Figura 19].

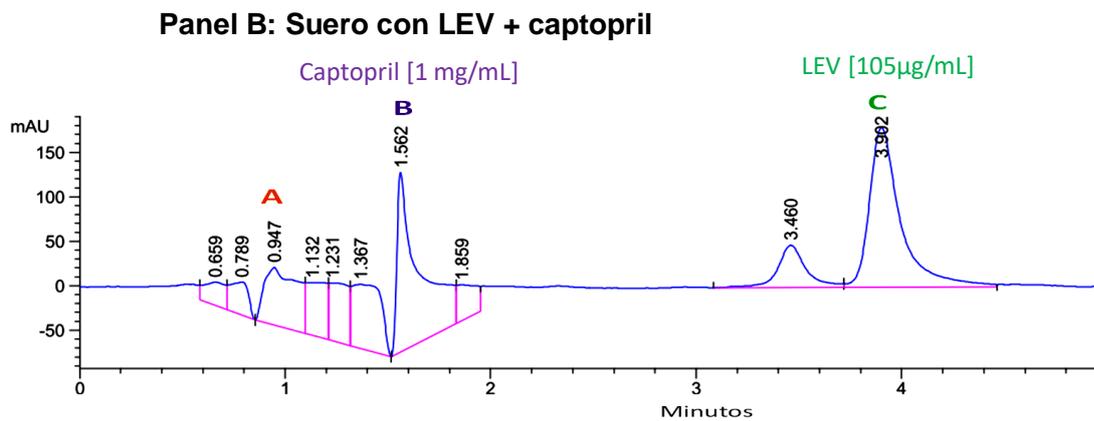
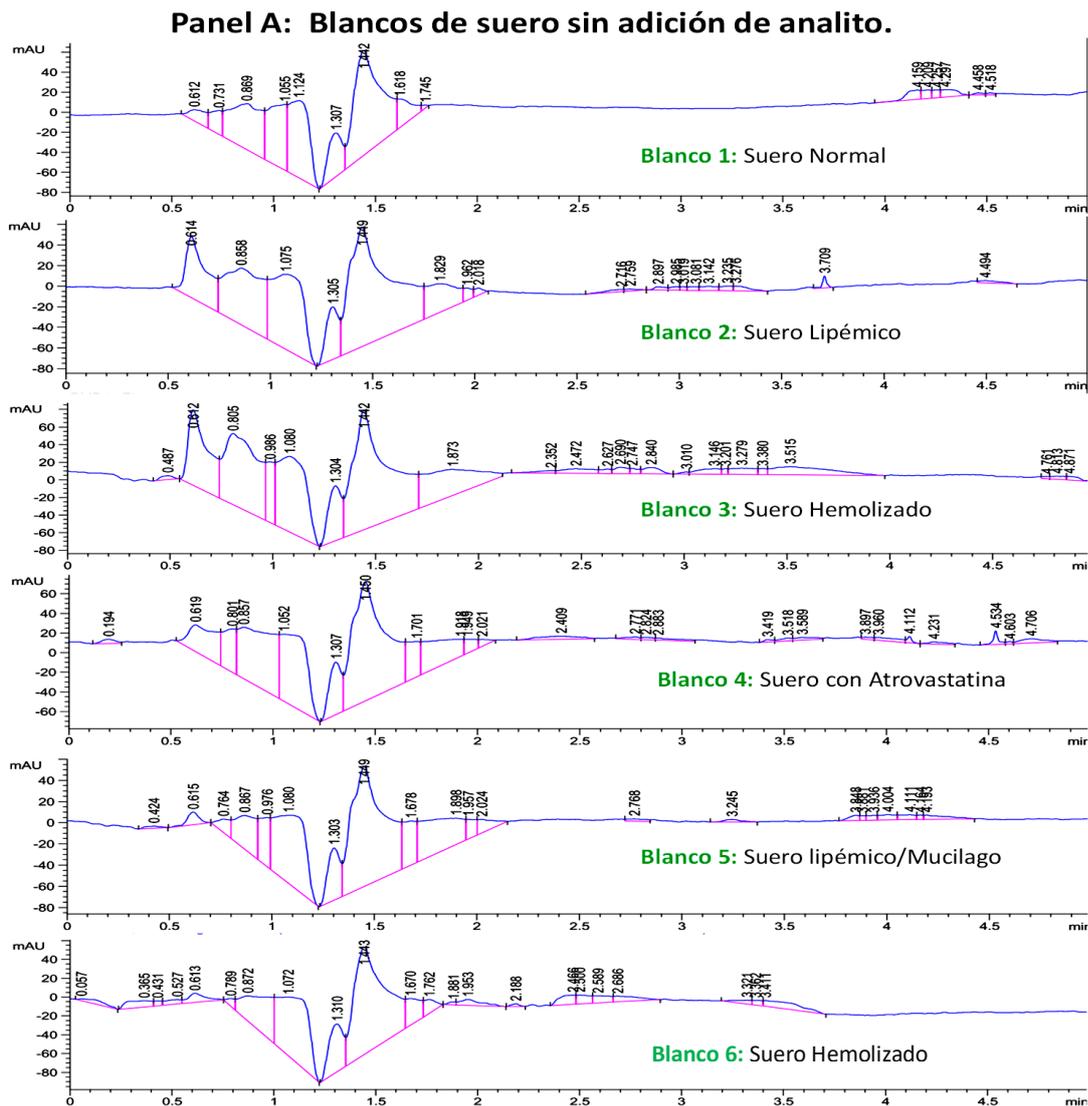


Figura 21. Cromatogramas obtenidos de la selectividad del método. Panel A: sueros sin analitos; Panel B: suero con el analito LEV a una concentración de 105 µg/ml más captopril como estándar interno a una concentración de 1 mg/ml. A. Frente de solvente con un tiempo de retención de 0.947 min. B. Captopril con un tiempo de retención de 1.562 min. C. Levetiracetam con un tiempo de retención de 3.902 min.

Determinación de la concentración de LEV en suero de ratones Balb-c.

Se analizaron 60 sueros de ratones hembra Balb-c mediante HPLC-UV bajo las condiciones cromatográficas establecidas previamente para determinar la concentración de LEV en los grupos expuestos al fármaco y en los grupos no expuestos para descartar la posibilidad de interferencias causadas por el embarazo.

Tabla 24. Concentraciones de LEV en los grupos de estudio expuestos al fármaco.

Grupo de estudio	Concentración de LEV
LEV/No gestante	16.86 ± 7.5
Lev/13 días	12.63 ± 6.98
LEV/18 días	6.87 ± 5.13

En la tabla 24 se observa que la concentración de LEV es mayor en el grupo no gestante en comparación con los grupos en período gestacional. Se observa un incremento de la concentración del grupo no gestante administrado con LEV con un incremento del 35% y 59% en comparación a los grupos que fueron administrados con LEV a los 13 y 18 de gestación respectivamente. Observando la mayor disminución de la concentración de LEV a los 18 días de gestación, como se observa en la figura 22.

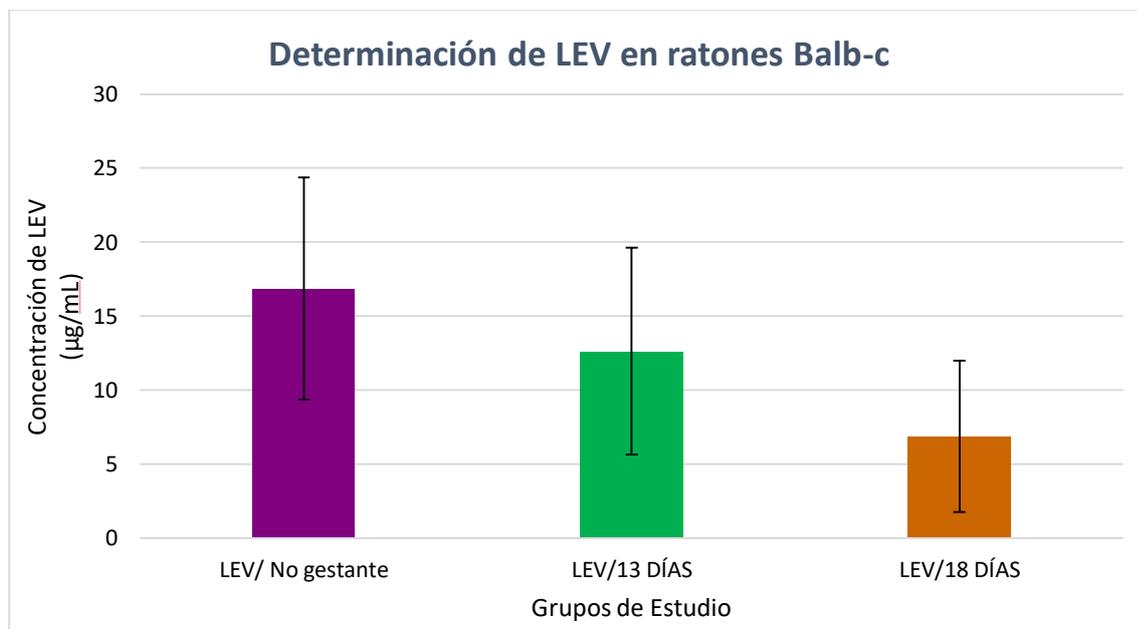


Figura 22. Concentración de Lev en ratones Balb-c. Se presentan las concentraciones correspondientes a los grupos de estudio.

Después de analizar los cromatogramas de los grupos de estudio no expuestos a LEV observamos que no se presentan interferencias en el suero de ninguno los grupos en el tiempo de retención de LEV [Figura 22]. Sólo se observa el estándar interno (captopril) en tiempo de retención de 1.56 ± 0.04 .

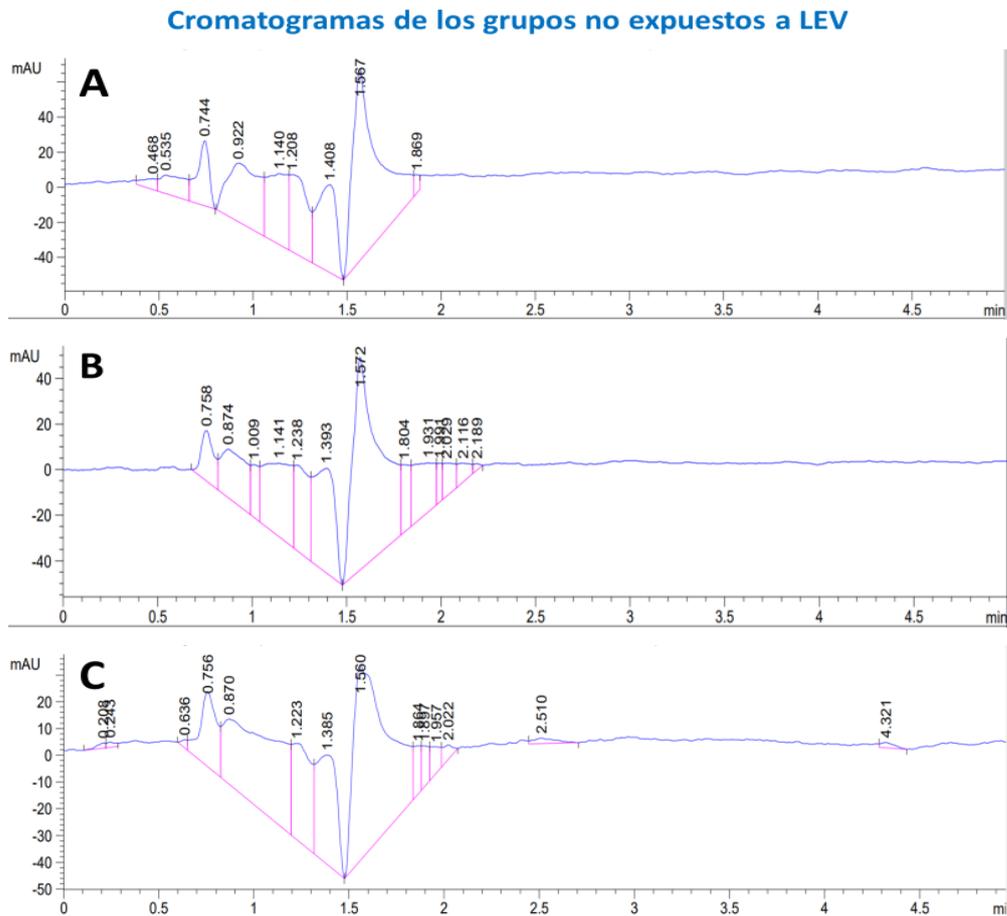


Figura 23. Cromatogramas de los grupos de estudio que no fueron expuestos a LEV. A) Grupo de estudio sin gestación, **B)** Grupo de estudio a los 13 días de gestación, **C)** Grupo de estudio a los 18 días de gestación

Fase II. Expresión Placentaria de SLC38A4

a. Evaluación de la integridad del RNA

La integridad del RNA obtenido de las placentas de las ratonas se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio. En la figura 29, se muestra la electroforesis de uno de los geles realizados para determinar la integridad del RNA. Como se observa en la figura, el RNA se encuentra integro mostrar

las subunidades ribosomales 28s (banda superior), 18s (banda intermedia) y 5.8s (banda inferior).

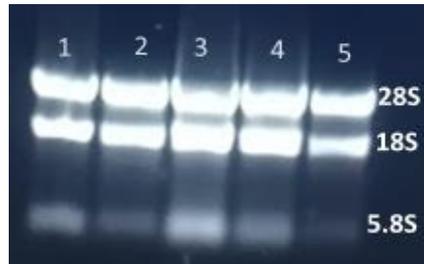


Figura 249. Electroforesis de RNA en gel de agarosa.

b. Evaluación de la expresión génica de SLC38A4

A partir del RNA obtenido se sintetizó el c-DNA y se determinó la expresión del gen *Slc38a4* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30.

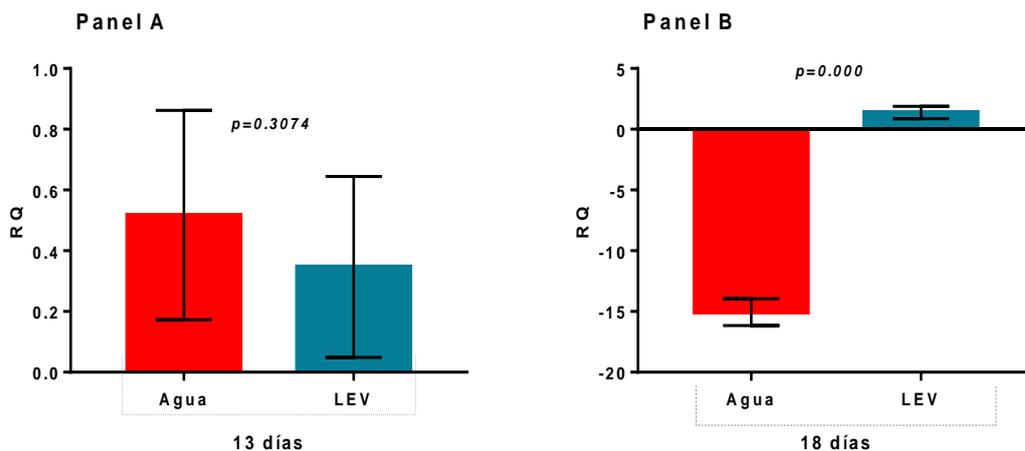


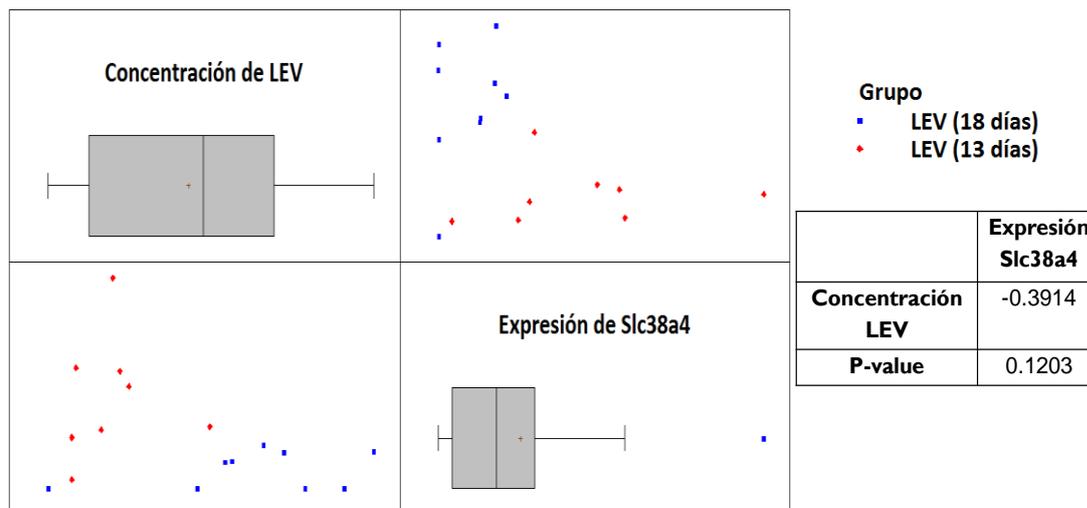
Figura 25. Expresión placentaria de *Slc38a4* en los grupos de estudio. Panel A: 13 días de gestación; Panel B: 18 días de gestación. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante la comparación de medias con la prueba t de Student para muestras independientes. RQ: cuantificación relativa; LEV: levetiracetam.

Como se muestra en la Figura 30 panel A, la expresión placentaria del gen *Slc38a4* a los 13 días de gestación en el grupo expuesto a LEV fue menor al grupo control (agua), no alcanzando a ser esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.3074$). En contraste, la expresión placentaria del gen *Slc38a4* a los 18 días de la gestación es mayor en el grupo expuesto a LEV que en el grupo no expuesto (agua), siendo esta diferencia estadísticamente significativa, debido a que el grupo control muestra una disminución

drástica en los niveles de expresión del gen *Slc38a4* en relación con el grupo expuesto a LEV.

Fase III. Correlación entre la concentración de LEV en suero y la expresión de *Slc38a4* en placenta de ratones Balb-c.

Se realizó una correlación de Pearson entre las concentraciones de LEV en suero y la expresión de *SLC38A4* donde se encontró una correlación de -0.3914, la cual no fue estadísticamente significativa ($p= 0.1203$).



Fase IV. Medidas antropométricas y estrés oxidativo

a. Medidas antropométricas de los productos no natos

Los valores antropométricos (número, peso, ancho y talla) obtenidos de los productos no natos de los grupos evaluados después de la exposición materna a LEV y agua a los 13 y 18 días de gestación se muestran en la Tabla 24.

Tabla 25. Valores antropométricos de los productos no natos en los grupos de estudio.

Grupos Gestantes	Productos no natos			
	Número	Peso (g)	Ancho (mm)	Talla (mm) Distancia Céfalo-Caudal
	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$
Agua/13 días	8.00±1.94	0.27±0.06	7.75±0.5791	11.54±1.11

LEV/ 13 días	4.20±1.31	0.12±0.07	5.70±1.1684	8.33±3.02
Agua/18 días	6.60±1.42	0.76±0.23	10.32±0.8353	17.56±2.60
LEV/ 18 días	6.20±2.25	0.49±0.15	9.38±0.79	14.78±2.26
Valor de p	0.000 ^a 0.028 ^d	0.000 ^{b,d,e} 0.013 ^c 0.001 ^f	0.000 ^{a,b,d,e} 0.001 ^c	0.026 ^a 0.000 ^{b,d,e} 0.024 ^c

Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples, las comparaciones fueron: ^aAgua/13 días vs LEV/ 13 días; ^bAgua/13 días vs Agua/18 días; ^cAgua/13 días vs LEV/18 días; ^dLEV/ 13 días vs Agua/18 días; ^eLEV 13 días vs LEV/18 días y ^fAgua/18 días vs LEV/18 días. LEV: levetiracetam; \bar{X} : promedio; \pm : más/ menos; DE: desviación estándar; g: gramos; mm: milímetros

En número de productos no natos obtenidos de las ratonas expuestas a LEV y agua a los 13 y 18 días se muestra en la figura 22.

Como se puede observar en la figura, el número de productos no natos en el grupo expuesto a LEV disminuyó estadísticamente en relación a los grupos control (agua) de 13 y 18 días, sin embargo, al comparar el grupo LEV de 18 días vs el grupo agua de 18 días, no hay diferencia estadística entre los grupos.

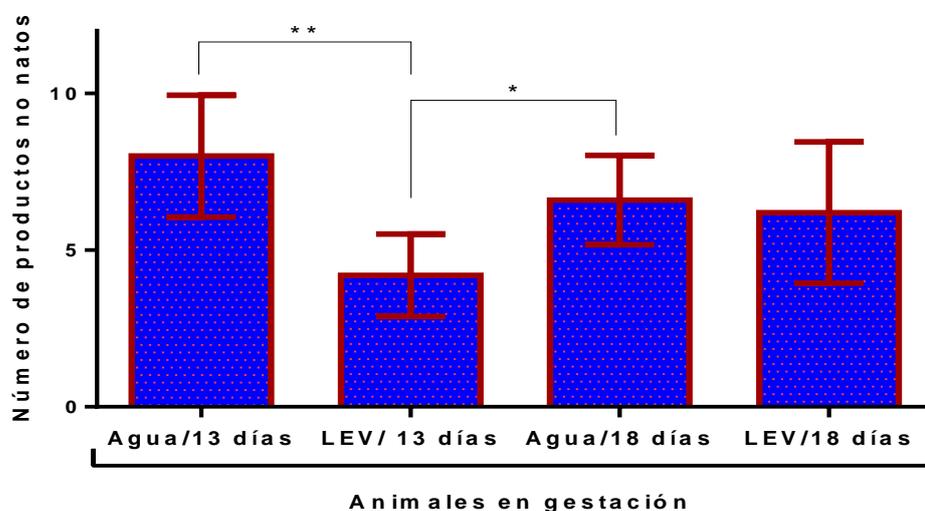


Figura 26. Número de productos no natos en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$.

La relación del peso de los productos no natos en los grupos de estudio se muestra en la figura 23. Como se puede observar en la figura el peso obtenido en los grupos expuestos a LEV es menor en relación al control (agua), siendo esta diferencia estadísticamente significativa a los 18 días de gestación ($p=0.001$). De igual manera, se

observa que el peso de los productos a los 13 en relación a los 18 días de gestación es menor, siendo esta diferencia estadísticamente significativa [Figura 23].

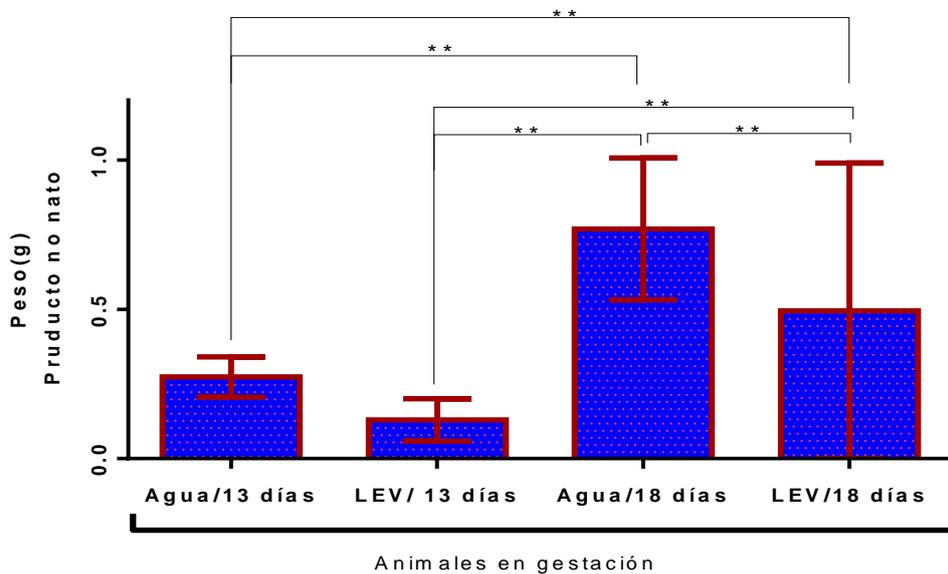


Figura 27. Peso de los productos no natos en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$.

También, dentro de los parámetros antropométricos se determinó el ancho y la talla (distancia Céfal-caudal) de los productos no natos por grupo.

En la figura 24 se muestra la talla y en la figura 25 el ancho de los productos no natos en los grupos de estudio. Como se puede observar los productos obtenidos de los grupos expuestos a LEV muestran una menor talla y ancho en relación a los grupos no expuestos control), siendo esta diferencia estadísticamente significativa a los 13 días de gestación tanto para el ancho como la talla. De igual manera, se observa una menor talla y anchura de los productos a los 13 días en relación a los 18 días de gestación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa [Figura 24 y 25].

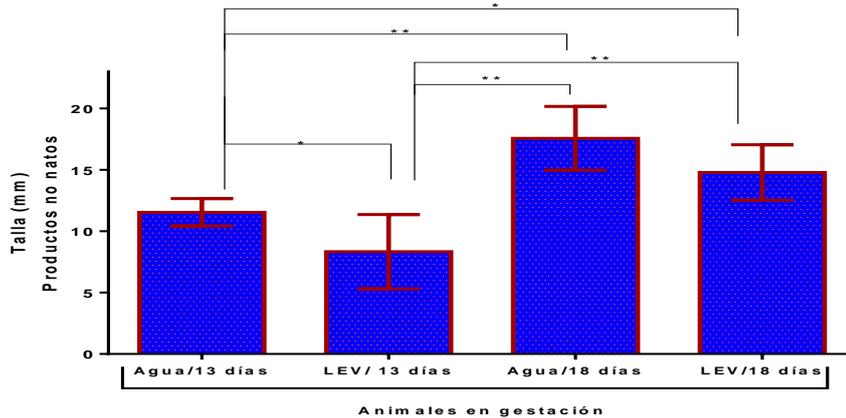


Figura 28. Talla (Distancia Céfalocaudal) productos no natos en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$.

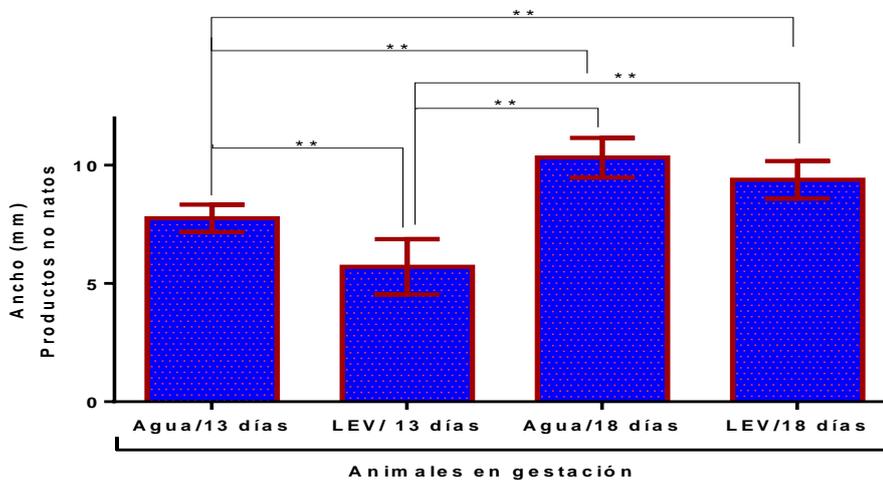


Figura 29. Ancho (mm) de productos no natos en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$.

b) Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se determinó mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA) en hígado, riñón y feto en los grupos de estudio. En la tabla 25 se muestran los resultados de la concentración de MDA en los grupos de estudio.

Grupos de estudio	Estrés Oxidativo					
	Peroxidación hepática (nMol/g)		Peroxidación renal (nMol/g)		Peroxidación fetal (nMol/g)	
	$\bar{X} \pm DE$ (nMol/g)	Valor p	$\bar{X} \pm DE$ (nMol/g)	Valor p	$\bar{X} \pm DE$ (nMol/g)	Valor p

Sin gestación Agua	54.22±16.44	0.033 ⁱ 0.000 ^{b, c, j,} k, n, o 0.005 ^m 0.018 ^a 0.008 ^d	110.70±30.8	0.05 ^m 0.001 ^e	-----	-----
Sin Gestación LEV	48.53±12.73		119.45±58.9		-----	-----
Agua/13 días	54.09±21.44		76.47± 33.45		17.84±17.5	0.000 ^{b, c,} d, e
LEV/ 13 días	102.26±29.1		65.59±25.59		17.57±4.8	
Agua/18 días	132.52±40.6		97.91±22.8		55.17±17.27	
LEV/ 18 días	154.07±48.8		121.59±33.4		68.19±18.42	

Tabla 26. Peroxidación hepática, renal y fetal en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio ± desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples, las comparaciones fueron: ^aAgua/13 días vs LEV/ 13 días; ^bAgua/13 días vs Agua/18 días; ^cAgua/13 días vs LEV/18 días; ^dLEV/ 13 días vs Agua/18 días; ^eLEV 13 días vs LEV/18 días, ^fAgua/18 días vs LEV/18 días, ^gSG agua vs SG LEV, ^hSG agua vs Agua /13 días, ⁱSG agua vs LEV/ 13 días, ^jSG agua vs Agua/18 días, ^kSG agua vs LEV/18 días, ^lSG LEV vs Agua/13 días, ^mSG LEV vs Lev/13 días, ⁿSG LEV vs Agua/18 días y ^oSG LEV vs LEV/18 días . LEV: levetiracetam; \bar{X} : promedio; ±: más/ menos; DE: desviación estándar; g: gramos; nMol: nanomol; SG: Sin gestación.

En relación a la peroxidación hepática (Fig. 26), se puede observar que en los animales en gestación los valores de MDA son mayores que en los animales sin gestación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los grupos de LEV 13 y 18 días y agua 18 días.

En relación a los animales en gestación, se observa que los expuestos a LEV presentan valores mayores de MDA en relación a los no expuestos (agua), siendo esta diferencia estadísticamente significativa solamente a los 13 días. De igual manera, se puede observar que la concentración de MDA incrementa de forma significativa conforme avanza el periodo gestacional.

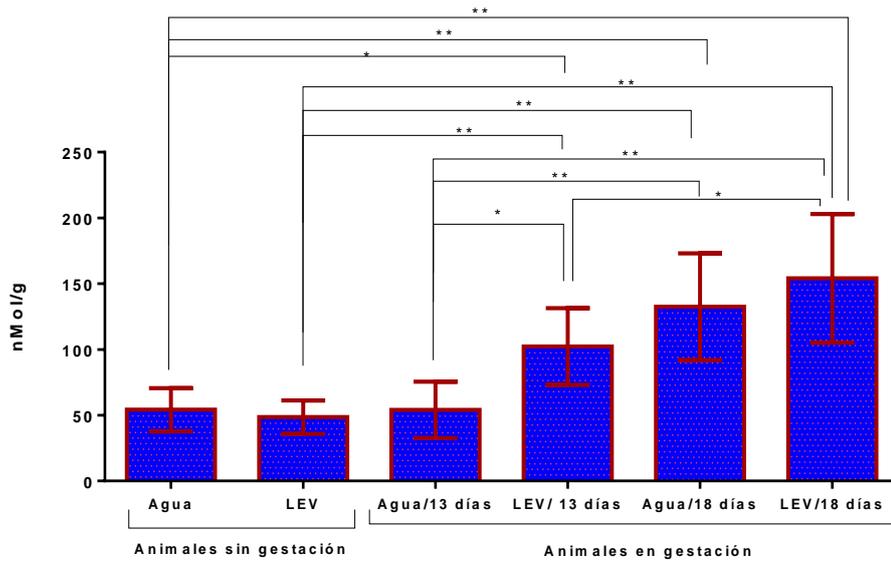


Figura 306. Peroxidación Hepática en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$.

En la figura 27 se muestra el grafico obtenido de la concentración de MDA en riñón en los diferentes grupos de estudio. Como se puede observar en la figura, la gestación no se asocia a un incremento del estrés oxidativo a nivel renal.

En los animales en gestación el grupo que mostro los niveles más bajos de MDA fue el expuesto a LEV durante 13 días, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con relación a los grupos expuestos a LEV sin gestación y 18 días de gestación.

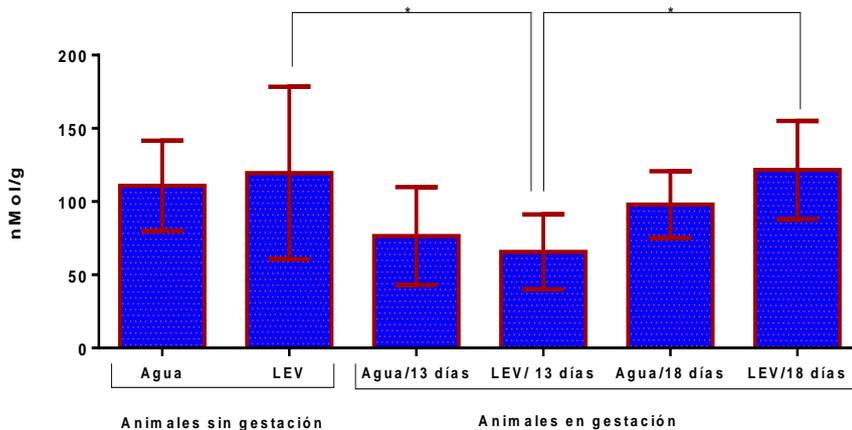


Figura 317. Peroxidación Renal en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$.

Los resultados obtenidos de la peroxidación fetal se muestran en la figura 28. Como puede observarse conforme aumenta el tiempo de gestación incrementan de forma significativa los valores de MDA. También se observa un incremento no significativo en los valores de MDA a los 18 días en el grupo expuesto a LEV en relación al no expuesto.

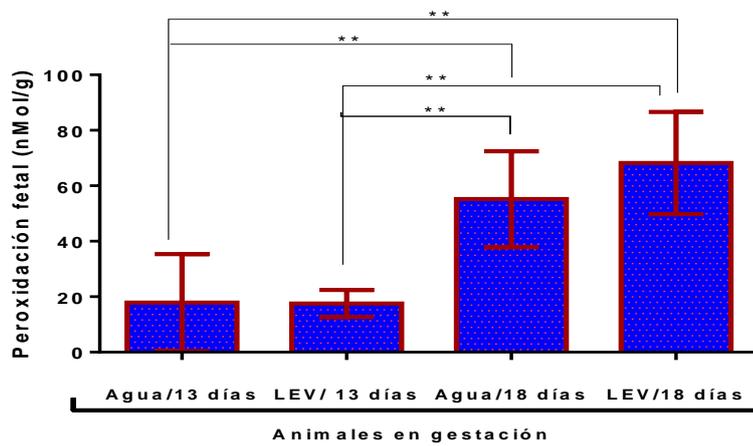


Figura 28. Peroxidación fetal en los grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. El análisis intergrupar se realizó mediante ANOVA de una vía con un post hoc de Bonferroni. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.001$.

7. Discusión

Fase I: Validación HPLC/UV para la determinación de Levetiracetam.

La epilepsia es una afección común en la mujer embarazada, se estima que aproximadamente 1 de cada 200 embarazos se encuentra expuesto a fármacos antiepilépticos (FAEs). Dentro de los FAEs se encuentra levetiracetam, fármaco antiepiléptico de segunda generación aprobado por la FDA en noviembre de 1999 (Guray Koc et al., 2018).

El propósito de esta investigación fue determinar la concentración sérica de levetiracetam y la expresión génica del transportador Slc38A4 en placenta a los días 13 y 18 días de gestación en ratones hembra de la cepa Balb-C expuestos a una dosis de 100mg/kg/día de levetiracetam desde su destete.

Para poder determinar la concentración sérica de levetiracetam, como primera etapa se validó el método analítico por HPLC/UV para la cuantificación plasmática de levetiracetam, bajo la NOM-177-SSA1-2013. El desarrollo de métodos analíticos es de gran importancia para el monitoreo constante de fármacos antiepilépticos como el caso de levetiracetam en muestras biológicas ya que este fármaco es de considerado de nueva generación y su mecanismo de acción difiere de los demás antiepilépticos (Sarmiento 2014).

La matriz biológica utilizada fue suero ya que de acuerdo a lo reportado por Engelbrecht y colaboradores (2017), la estabilidad del analito LEV se altera cuando se trabaja con plasma debido a los componentes de los tubos de extracción de sangre (gel separador y aditivos) y específicamente cuando se utilizan tubos de extracción con heparina y citrato de sodio (Bowen & Remaley 2014).

Para seleccionar el estándar interno, se hizo una búsqueda bibliográfica de todos los estándares previamente reportados utilizados para la validación de los métodos analíticos para la cuantificación del LEV por HPLC/UV. Los estándares internos utilizados fueron UCB, citalopram, gabapentina, carbamazepina, ritonavir, y captopril, siendo el más económico captopril, por lo cual fue el que nosotros seleccionamos.

Se utilizó una columna de fase reversa C18, con una longitud de 150 mm para tratar de evitar interferencias endógenas de la matriz biológica y así obtener tiempos de retención cortos y picos afilados y simétricos así como una buena selectividad. La mayoría de los autores también reportan haber utilizado una columna C18, de 5 μm de 4.6 mm, lo que difiere entre los autores es la longitud de la columna, ya que algunos autores la utilizan como nosotros de 150 mm y otros de 250 mm (Sarmiento, 2014; Martens et al., 2005; Contin et al., 2008). El tamaño de la columna depende del analito a evaluar, si la molécula es muy grande como proteínas es preferible utilizar una columna de mayor longitud.

Se realizó el espectro de absorción de nuestro analito (LEV) y se determinó que la mayor absorción fue a una longitud de onda máxima de 231 nm, siendo esta longitud de onda muy semejante a la previamente reportada de 230 nm por Ibrahan y col., (2016) (Ibrahan et al., 2016). Freitas y col (2015) también reportó la detección de LEV en una longitud de onda muy semejante 235 nm. Sin embargo, otros autores reportan que a una longitud de onda de 205 nm se obtiene la mayor absorción del analito LEV por HPLC/UV (Sarmiento 2014, Martens *et al.*, 2005, Contin *et al.*, 2008 y Engelbrecht *et al.*, 2017).

De acuerdo a lo reportado por Jimenez Moreno y colaboradores (2014), los dos parámetros más importantes para haya una mejor elución de los picos es la composición y pH de la fase móvil, por tal motivo, se probaron diferentes composiciones de fases móviles, siendo la fase que contenía H_3PO_4 /acetonitrilo, la que presentaba mejor elución y resolución del analito LEV, por lo que se utilizó el método fue isocrática con ácido fosfórico al 0.43% y acetonitrilo 90:10 v/v., siendo muy similar a lo reportaron por Sarmiento (2014), Martens y col., (2005) y Bianchi y col. (2014).

El tiempo de retención de analito LEV fue a los 3.9 min, siendo mayor al reportado por Juenke y col (2006) e Ibrahim y col (2016), 3.5 y 3.4 min respectivamente y menor a lo reportado por otros autores 5.2-8.58 min (Martens-Lobenhoffery et al., 2005; Contin et al., 2008; Baldelli et al., 2015; Freitas et al., 2015; Engelbrecht et al., 2017; Sarmiento, 2018). Esta diferencia se debe a las condiciones cromatográficas utilizadas por los diferentes autores.

Sarmiento utilizó captoril como estándar interno con un tiempo de retención de 14.25min de acuerdo a sus condiciones cromatograficas. De acuerdo a nuestras condiciones cromatografías el tiempo de retención del captopril fue menor al reportado por Sarmiento (1.56min), permitiéndonos tener un tiempo de corrida menor (Sarmiento, 2014).

De acuerdo Freitas y col (2015) el mejor método de extracción de LEV es la extracción liquido –liquido, obteniéndose un recobro del 90.2% (Freitas et al., 2015). En base a lo anterior se evaluaron diferentes metodologías de extracción liquido-liquido de LEV previamente reportadas, obteniendo la mejor linealidad y recobro utilizando el solvente diclorometano (1mL/ 200 microlitros de suero). Esto se debió a que el diclorometano presenta una polaridad del 3.4 mientras que otros solventes evaluados como fue el caso del metanol presentan una polaridad mayor (6.6), disminuyendo la afinidad con el analito (Zufia *et al.*, 2010; Vermeij E *et al.*, 1994). Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Freitas y colaboradores (2015), los autores también reportan el uso de diclorometano (2mL/100 microlitros de plasma) para la extracción de LEV (Freitas *et al.*, 2015)

La validación de método analítico se realizó de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 la cual conciden con lo establecido por la agencia de medicamentos y alimentos (Food and Drug Administration FDA) en 2013.

Se estableció el rango de trabajo, en base al rango terapéutico de LEV, las concentraciones séricas subterapéuticas y tóxicas, así como las concentraciones por debajo del rango terapéutico (Engelbrecht *et al.*, 2017). De acuerdo a Krasowski , el rango terapéutico de LEV es de 12-46 µg/ml (Krasowski 2010). Y dado que se trabajaría con ratones hembra en estado gestante el rango establecido fue de 5-105 µg/ml (Tomson, 2013).

El método fue lineal de acuerdo a lo establecido NOM-177-SSA1-2013 con una $r > 0.99$. Nuestro coeficiente de correlación es muy similar a lo reportado por la mayoría de los autores ($r \geq 0.99$) (Sarmiento, 2014, Martens et al., 2005; Contin et al., 2008; Freitas et al., 2015; Ibrahim et al., 2016; Engelbrecht et al., 2017),

solamente Baldelli y Junke reportan correlaciones ≤ 0.98 (Junke et al., 2006; Baldelli et al., 2015).

La precisión del método se determinó de acuerdo a la repetibilidad y reproducibilidad. La NOM-177-SSA1-2013 establece que el CV no debe ser mayor al 15 % en métodos cromatográficos para que exista repetitividad y reproducibilidad. De acuerdo a nuestros resultados el método es preciso ya que el CV intra e interensayo fue ≤ 10 %. Nuestra precisión fue menor a la reportada por otros autores, los cuales reportan un CV $< 5\%$ (Engelbrecht et al., 2017), del 3.42 % (Ibrahim AF et al., 2016) e incluso de 1 % (Sarmiento 2014).

La exactitud del método se determinó mediante el porcentaje de desviación estándar (%DS) del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetitividad y reproducibilidad. La NOM-177-SSA1-2013 establece que el porcentaje de desviación debe estar dentro del ± 15 % del valor nominal de concentración. Nuestro porcentaje de desviación estándar fue del 5.53 %, estando dentro de lo que marca la norma por lo que nuestro método es exacto, nuestros resultados son muy similares a los reportados por otros autores, % DS = de 5-5.4 % (Martens et al., 2005; Sarmiento, 2014; Engelbrecht et al., 2017). Nuestro método presenta una mayor exactitud a los métodos previamente reportados por Contin y col (2008), Ibrahim y col (2016) y Freitas y col (2015) ya que su % DS fue mayor, encontrando en un intervalo del 6.1 al 15 % (Contin et al., 2008; Ibrahim et al., 2016; Freitas et al., 2015). En contraste Junke y col (2006), reportaron una mayor exactitud con un % DS = 1.59. La exactitud del método se puede ver afectado por los errores de pipeteo principalmente durante la repetitividad y reproducibilidad.

De acuerdo a lo estipulado por la NOM-177-SSA1-2013, el porcentaje de recobro no deberá ser necesariamente 100 %, pero deberá ser consistente, preciso y reproducible en todo el intervalo de la curva de calibración. El recobro obtenido en el intervalo de la curva de calibración fue del 87.6 a 92.66%, utilizando como solvente de extracción diclorometano. (Freitas et al., 2015). Nuestro porcentaje de recobro se encuentra dentro de estipulado por la NOM-177-SSA1-2013, sin embargo, nuestro recobro es menor a lo reportado por Sarmiento (2014), el cual

reporta un recobro del 96-99.11%, esto se puede deber a que el autor solo precipitó las proteínas de la muestra, pero no realizó ninguna **extracción del analítico** como tal, ya que después de adicionar el ácido perclórico al 35% para desnaturalizar las proteínas, solo centrifugan e inyectan 30 μ L el sobrenadante al sistema cromatografico, disminuyendo así la pérdida del analito a evaluar, sin embargo, al inyectar la muestra en esas condiciones la vida útil de la columna se ve afectada, ya que las muestras se consideran sucias produciendo una acumulación del material particulado disminuyendo el tiempo de vida media de la columna (Sarmiento, 2014).

Se evaluó la estabilidad de la muestra a corto y largo plazo, así como de la muestra procesada y expuesta a ciclos de congelación descongelación.

LEV fue estable durante 24 h expuesto a temperatura ambiente en el automuestrador, concordando con lo reportado por Ibrahim y col. (Ibrahim et al., 2016). Sarmiento (2014) reporta que LEV es estable durante 20 h en el automuestrador, con una decremento de la concentración del 5% (Sarmiento 2014) y Baldelli y col, reportaron que a temperatura ambiente LEV fue estable durante 10 días, mostrando un decremento de la concentración del 8.5% (Baldelli et al., 2015). Engelbrech y col reportaron que a temperatura ambiente la estabilidad de LEV fue de siete días (Engelbrecht et al., 2017)

Las muestras de LEV fueron estables después de un mes a -20°C , que es el tiempo que transcurra desde que se obtenga la muestra hasta que se procese. Engelbrecht y col (2017), reportaron que LEV es estable en congelación durante 6 meses (Engelbrecht et al., 2017)

Se evaluó la estabilidad de LEV en suero expuestas a tres ciclos de congelación: descongelación (12h:12h), Las muestras no fueron estables ya que en el cromatograma se observó la degradación del analito y el porcentaje de recobro se encontró fuera del que marcaba la NOM-177-SSA1-2013. Nuestros resultados no concuerdan con los reportados por otros autores, ya que ellos reportan que si es estable a los ciclos de congelación descongelación (Sarmiento 2014; Engelbrecht et al., 2017 y Ibrahim AF et al., 2016).

Se demostró la selectividad del método mediante la no interferencia de compuestos endógenos en suero en los tiempos de retención de los analitos a determinar, al analizar el suero proveniente de seis posibles interferencias las cuales incluyeron suero lipémico, hemolizado, también, mostro ser específico ya que al evaluarlo con suero el cual contenía otro fármaco administrado de manera concomitante, no mostro tampoco interferencia en el tiempo de retención. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por otros autores, los cuales reportaron la no presencia de picos de interferencia relacionados con compuestos endógenos de la matriz biológica en el tiempo de retención del LEV (Sarmiento 2014; Juenke *et al.*, 2006; Baldelli *et al.*, 2015; Engelbrecht *et al.*, 2017; Ibrahim AF *et al.*, 2016 y Freitas *et al.*, 2015), en cuanto a la especificidad, nuestro método fue específico al no mostrar interferencia cuando se evaluó con suero que contenía atrovastatina y mucilago de nopal. Baldelli y col (2015) también reportó que su método era específico bajo la presencia de carbamazepina (Baldelli *et al.*, 2015), sin embargo, Juenke y col (2006), reporto que la presencia de Clonazepam si interferia en el tiempo de retención de LEV en sus condiciones cromatograficas (Juenke *et al.*, 2006).

El límite de detección se determinó en función de la concentración del LEV más baja en suero en la cual la señal se distinguió de los niveles de ruido y el límite de cuantificación en base a la concentración más baja en suero de LEV la cual al evaluarse por quintuplicado, su valor promedio se encontró dentro del 20% del valor nominal y su CV fue $\leq 20\%$.

El límite de detección y cuantificación del método fue de 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. El límite de detección establecido fue menor al reportado por Sarmiento (2014) de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, la sensibilidad del método fue menor a la reportada por otros autores. Ibrahim y col., reportaron un LD de 0.27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y LC de 0.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el analito LEV (Ibrahim AF *et al.*, 2016), de igual manera Contin y col., reportaron el LD de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y LC de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Contin *et al.*, 2008). Engelbrecht y col., reportan un LD de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y un LC de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Engelbrecht *et al.*, 2017). Martens y col., reporto un LD y LC de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para LEV (Martens *et al.*, 2005).

Fase II. Medidas antropométricas y Estrés oxidativo

a. Medidas antropométricas

Se determinaron las medidas antropométricas (número, peso, ancho y talla) de los productos no natos de los grupos evaluados después de la exposición materna a LEV y agua a los 13 y 18 días de gestación para conocer su situación nutricional.

En relación con la talla, los grupos expuestos a LEV (100 mg/kg/días) mostraron un retraso en el crecimiento fetal, concordando con lo reportado por Ozer y colaboradores (2012) estudio que realizaron con embriones de pollo donde encontraron un retraso en el crecimiento fetal tras inyectar 4.5 µl de LEV (Ozer et al., 2012).

En relación con el peso corporal de los productos no natos, los animales expuestos a LEV mostraron menor peso que los no expuestos, tanto a los 13 como 18 días de gestación, con una disminución del 55.5 y 35.5% respectivamente. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Isoherranen y colaboradores (2003), los cuales administraron vía intraperitoneal las dosis de 600 y 1,200 mg/kg de LEV, a partir del día 8 al día 12 de gestación, observando un decremento del peso fetal del 7 y 10% respectivamente (Isoherranen et al., 2003). Además, se ha reportado una asociación entre la reducción del peso corporal de los productos no natos (15%) con la delección del gen *Slc38a4*. (Matoba et al., 2019).

El número de productos no natos fue menor en el grupo expuesto a la dosis de 100 mg/kg/día de LEV durante 13 días en relación con el grupo no expuesto. Nuestros resultados son muy semejantes a la descrito por Özyürek y colaboradores (2010), los cuales evaluaron diferentes dosis de LEV (25, 50 y 100 mg/kg/día) en rata, encontrando que los animales expuestos a la dosis de 100 mg/Kg presentaban un decremento en el número de productos (9.2 ± 1.4) en relación con los controles de (10.3 ± 1.4), siendo este decremento no significativo (Özyürek et al., 2010). Isoherranen y colaboradores (2003), reportaron que la dosis de 2000 mg/kg de LEV vía intraperitoneal durante 12 días en ratón, generaba una mayor reabsorción de los productos en comparación al grupo control (Isoherranen et al., 2003).

b. Estrés Oxidativo

Se evaluó el estrés oxidativo mediante la concentración de MDA en hígado y riñón materno, así como en los productos no natos.

Con relación a la peroxidación hepática nuestros resultados mostraron mayor concentración de MDA en las ratas gestantes en relación con las no gestantes, siendo mayores estos valores a los 18 días en relación con los 13 días de gestación. Concordando con lo descrito por Sharma y colaboradores (2012), los cuales reportaron que las concentraciones de MDA a nivel hepático son mayores en ratonas preñadas que en no preñadas (Sharma *et al.*, 2012).

Además, nuestros resultados mostraron un incremento de la concentración de MDA a nivel hepático en las ratonas preñadas expuestas a LEV. Dichos resultados fueron confirmados por Sabbah y colaboradores (2019) cuyos autores reportaron cambios en la arquitectura del hígado y un incremento significativo en los niveles de las enzimas hepáticas ALT y AST a la dosis de 2000 mg/kg/día de LEV (Sabbah *et al.*, 2019).

Por otra parte, EL-Shorbagy y colaboradores (2016) evaluaron el efecto genotóxico en hígado de ratas expuestas a LEV (300 y 600 mg/kg/día) reportando un incremento significativo en el daño del ADN evaluado mediante el ensayo Cometa (EL-Shorbagy *et al.*, 2016).

En cuanto a las concentraciones de MDA en riñón, los grupos no gestantes mostraron mayores concentraciones de MDA con relación a los grupos gestantes, además, en los grupos gestantes, la menor concentración de MDA la presenta el grupo expuesto a LEV durante 13 días. Nuestros resultados difieren a lo reportado por Sharma y colaboradores (2012) los cuales describen un incremento en las concentraciones de MDA en riñón en el grupo control gestante en relación con el no gestante (Sharma *et al.*, 2012).

Además, nuestros resultados muestran un incremento en las concentraciones de MDA en riñón de ratones preñadas que se expusieron a LEV durante 18 días en comparación con los grupos gestantes no expuestos. Dichos resultados se confirman con lo reportado por Sabbah y colaboradores (2019) quienes publicaron un aumento en los

niveles de urea y creatinina en ratas preñadas expuestas durante 18 días a una dosis de 2000 mg/kg/día de LEV.

Con relación a los valores de MDA obtenidos de la peroxidación fetal, los productos no natos de 18 días mostraron un incremento en los valores de MDA en relación con los de 13 días. No se encontraron reportes en los cuales evalúen la peroxidación fetal de productos no natos expuestos a LEV, sin embargo, se ha descrito, que la exposición a dosis de 1000 y 3000 mg/kg/días de LEV en ratón no produce embriotoxicidad o teratogenicidad (Genton y Van Vleyden, 2002). También, se ha descrito que la exposición prenatal a LEV a dosis de 25 y 50 mg/kg/día, no produce efectos apoptóticos significativos en el hígado y riñón de las crías de Rata expuestas (Tekcan et al., 2017).

Fase III. Evaluación de la expresión génica placentaria de Slc38a4

Nuestros resultados mostraron que el gen Slc38a4 si se expresa en la placenta de las ratonas tanto expuestas como no expuestas a LEV, siendo esta expresión mayor en el día 13 de gestación en relación al día 18 en las ratonas no expuestas a LEV. Nuestros resultados concuerdan con lo previamente publicado por Matoba y colaboradores (2019), los cuales publicaron que este gen tiene una alta expresión en placenta, la cual se reduce considerablemente (> 80%) del día 13 al día 19 de gestación, identificando a este gen como el más crítico para el desarrollo fetal (Matoba *et al.*, 2019).

Fase IV. Correlación entre la concentración de LEV en suero y la expresión de Slc38a4 en placenta de ratones Balb-c.

8. Conclusiones

El método analítico validado para la cuantificación de LEV por HPLC-UV de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, es preciso, exacto, lineal y reproducible, por lo que puede ser empleado en estudios de farmacocinética y bioequivalencia.

El número de productos no natos decrecientan cuando la ratona en gestación se expone LEV durante el período gestacional, así como el peso y tamaño del neonato en relación al grupo no expuesto.

A lo largo de la gestación, las ratonas muestran un incremento de la peroxidación hepática.

La expresión génica placentaria de Slc38A4 se ve incrementada a los 13 días de gestación y a los 18 días de gestación la expresión decremента en relación al grupo no expuesto

9. Perspectivas

Se espera posteriormente realizar Western Blot para establecer si la proteína SNAT4 presenta una alteración por exposición a LEV. Así como evaluar otros genes candidatos implicado en el transporte de LEV y determinar las concentraciones de LEV en los neonatos durante la lactancia.

10. Referencias Bibliográficas

- Acevedo Gallegos cols, Sandra, Sandra Acevedo Gallegos, Salvador Y. Espino Sosa, Juan Manuel Gallardo Gaona, Berenice Velásquez Torres, and Dra Sandra Acevedo Gallegos. 2008. "La Placenta Humana: Revisión." *Perinatol Reprod Hum* 22(22):230–45.
- Alrabiah H. 2019 "Levetiracetam." *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2(44):167-199.
- Alsemeh AE, Moawad RS, Abdelfattah ER. Histological and biochemical changes induced by gibberellic acid in the livers of pregnant albino rats and their offspring: ameliorative effect of *Nigella sativa*. *Anat Sci Int*. 2019;94(4):307-323. doi:10.1007/s12565-019-00488-0
- Anand, Joshi A., Soniya S. Vaidya, Marie V St-pierre, Andrei M. Mikheev, E. Kelly, Abner N. Nyandegge, Kenneth L. Audus, Jashvant D. Unadkat, and M. Phillip. 2017. "HHS Public Access." 33(12):2847–78.
- Anello J, Feinberg B, Lindsey R, Wojdylo C, Wong O, Korngold Y y Heinegg J. *MedsCape*, 2018. Disponible En: [<https://www.medscape.com/>]
- Anon. 2006. "Cátedra de Farmacología Aplicada Facultad de Ciencias Médicas. UNLP." 2005.
- Attilakos, Achilleas, Argirios Dinopoulos, Maria Paschalidou, Maria Tsirouda, Alexia Prasouli, Nikos Siafakas, and Anastasia Garoufi. 2018. "Effect of Levetiracetam Monotherapy on Enzymes and Creatine Kinase Concentrations in Children with Epilepsy: A Prospective Study." *Journal of Clinical Neurology (Korea)* 14(4):594–95.
- Baldelli, Sara, Dario Cattaneo, Luciana Giodini, Lorena Baietto, Giovanni Di Perri, Antonio D'Avolio, and Emilio Clementi. 2015. "Development and Validation of a HPLC-UV Method for the Quantification of Antiepileptic Drugs in Dried Plasma Spots." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 53(3):435–44.
- Bianchi, Vincenza, Carlo Arfini, and Matteo Vidali. 2014. "Therapeutic Drug Monitoring of Levetiracetam: Comparison of a Novel Immunoassay with an HPLC Method." *Therapeutic Drug Monitoring* 36(5):681–85.
- Bournissen G, Feig D, Koren G. Maternalefetal transport of hypoglycemic drugs. *Clin Pharmacokinet* 2003;42(4):303e13.
- Broer S, Palacin M (2011) The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *Biochem J* 436(2):193–211. doi:10. 1042/BJ20101912.
- Canal, José. 2017. "Polimorfismos Genéticos En El Transporte De Fármacos Como Causa De Fracaso En La Respuesta Terapéutica."
- Cardenas, Gil Mor and Ingrid. 2011. "NIH Public Access." 63(6):425–33.
- Cramer S, Beveridge M, Kilberg M and Novak D: Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: 153-160, 2002.

- Contin, Manuela, Susan Mohamed, Fiorenzo Albani, Roberto Riva, and Agostino Baruzzi. 2008. "Simple and Validated HPLC-UV Analysis of Levetiracetam in Deproteinized Plasma of Patients with Epilepsy." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 873(1):129–32.
- Contin, Manuela, Susan Mohamed, Carmina Candela, Fiorenzo Albani, Roberto Riva, and Agostino Baruzzi. 2010. "Simultaneous HPLC-UV Analysis of Rufinamide, Zonisamide, Lamotrigine, Oxcarbazepine Monohydroxy Derivative and Felbamate in Deproteinized Plasma of Patients with Epilepsy." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878(3–4):461–65.
- Desforges M, Lacey HA, Glazier JD, et al. SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290:305–312.
- Desforges M, Sibley CP (2010) Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol* 54(2–3):377–390. doi:10.1387/ijdb. 082765md.
- Evain-Brion, Danièle and André Malassine. 2003. "Human Placenta as an Endocrine Organ." *Growth Hormone and IGF Research* 13(SUPPL. A):34–37.
- Engelbrecht, Lynette, C. J. Grobler, and Malie Rheeders. 2017. "A Simple and Cost-Effective HPLC-UV Method for the Detection of Levetiracetam in Plasma/Serum of Patients with Epilepsy." *Biomedical Chromatography* 31(10).
- Erdemli ME, Altinoz E, Aksungur Z, Turkoz Y, Dogan Z, Gozukara Bag H. Biochemical investigation of the toxic effects of acrylamide administration during pregnancy on the liver of mother and fetus and the protective role of vitamin E. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30(7):844-848. doi:10.1080/14767058.2016.1188381
- Freitas P, Santi F, Bertucci C, Alexandre V, Carvalho S, Leira L, Ceiki A and Costa R. 2015. Stir-bar-sorptive extraction, solid phase extraction and liquid-liquid extraction for levetiracetam determination in human plasma: comparing recovery rates. *Pharmaceutical sciences.* 51 (2), 392-402.
- Genton P, Van Vleymen B. Piracetam and levetiracetam: close structural similarities but different pharmacological and clinical profiles. *Epileptic Disord.* 2000;2(2):99-105.
- Gibbins, K. J., Gibson-Corley, K. N., Brown, A. S., Wieben, M., Law, R. C., and Fung, C. M. (2018). Effects of excess thromboxane A2 on placental development and nutrient transporters in a *Mus musculus* model of fetal growth restriction. *Biology of reproduction*, 98(5), 695–704. doi:10.1093/biolre/iy006
- Giroux PC, Salas-Prato M , Theoret Y and Carmant L. 2009. Levetiracetam in children with refractory epilepsy: lack of correlation between plasma concentration and efficacy. *Seizure* 8(8):559-63.
- Guo, Tiedong, Lisa M. Oswald, Damodara Rao Mendu, and Steven J. Soldin. 2007. "Determination of Levetiracetam in Human Plasma/Serum/Saliva by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry." *Clinica Chimica Acta* 375(1–2):115–18.

- Howard P, Remi J, Remi C, Charlesworth S, Whalley H, Bhatia R, Hitchens M, Mihalyo M and Wilcock A. 2018. Levetiracetam. *J Pain Symptom Manage*, 56 (4): 645-649.
- Ibrahim F, Yazbi A, Barary M and Wagil M. 2016. Sensitive inexpensive HPLC determination of four antiepileptic drugs in human plasma: application to PK studies. *Bioanalysis*, 8 (21): 2219-2234.
- Iqbal, M., M. C. Audette, S. Petropoulos, W. Gibb, and S. G. Matthews. 2012. "Placental Drug Transporters and Their Role in Fetal Protection." *Placenta* 33(3):137–42.
- Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, et al: Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol* 576: 935-946, 2006
- Juenke, Jo Etta M., Paul I. Brown, Francis M. Urry, and Gwendolyn A. McMillin. 2006. "Drug Monitoring and Toxicology: A Procedure for the Monitoring of Oxcarbazepine Metabolite by HPLC-UV." *Journal of Chromatographic Science* 44(1):45–48.
- Koc G, Keskin Guler S, Karadas O, Yoldas T and Gokcil Z. 2018. Fetal safety of levetiracetam use during pregnancy. *Acta Neurol Belg* 118, 503–508.
- Krasowski MD. 2010. Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Anti-Epilepsy Medications. *Pharmaceuticals (Basel)* 3(6):1909-1935.
- Kudo, Yoshiki, Takeshi Urabe, Atsushi Fujiwara, Kazuo Yamada, and Takashi Kawasaki. 1989. "Carrier-Mediated Transport System for Cephalexin in Human Placental Brush-Border Membrane Vesicles." *BBA - Biomembranes* 978(2):313–18.
- Lewis, R. M., J. K. Cleal, and M. A. Hanson. 2012. "Review: Placenta, Evolution and Lifelong Health." *Placenta* 33(SUPPL.):S28–32.
- Li Z, Lai G, Deng L, Han Y, Zheng D, Song W. Association of SLC38A4 and system A with abnormal fetal birth weight. *Exp Ther Med*. 2012 Feb;3(2):309-313.
- Liu N, Dai Z, Zhang Y, et al. Maternal L-proline supplementation enhances fetal survival, placental development, and nutrient transport in mice†. *Biol Reprod*. 2019;100(4):1073-1081. doi:10.1093/biolre/iory240
- Mackenzie B and Erickson JD: Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):784-95.
- Mao, Qingcheng. 2008. "BCRP/ABCG2 in the Placenta: Expression, Function and Regulation." *Pharmaceutical Research* 25(6):1244–55.
- Martens-Lobenhoffer, Jens and Stefanie M. Bode-Böger. 2005. "Determination of Levetiracetam in Human Plasma with Minimal Sample Pretreatment." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 819(1):197–200.
- Matoba, S., Nakamuta, S., Miura, K., Hirose, M., Shiura, H., Kohda, T., ... Ogura, A. (2019). Paternal knockout of Slc38a4/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201907884. doi:10.1073/pnas.1907884116

- McEvoy, G.K. 2007 AHFS 2007 Drug Information Essentials. American Society of Health-System Pharmacists, Inc., Bethesda, 1139-1141.
- Morales-Pérez, Mayasil and Ana Julia García-Milian. 2017. "Papel de La Superfamilia ABC En La Resistencia Farmacológica Role of the Superfamily of ABC Transports in Pharmacological Resistance Papel Da Superfamlia ABC Na Resistência a Drogas Rôle de La Superfamille ABC Dans La Résistance Pharmacologique." 16(2):2017.
- Naidu YK, Raghunadha R, Koteswara R, Kalyan R, Chandiran S & Jayaveera KN. 2010. "Quantification of Levetiracetam in Human Plasma with Precipitation Extraction by Using Fully Validated LC-MS/MS and Its Application to a Bioequivalence Study". Research J. Pharm. and Tech. 3 (3): 847-853.
- Ozer FD, Demirel A, Yilmaz Dilsiz O, et al. Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo. Childs Nerv Syst. 2012;28(7):969-976. doi:10.1007/s00381-012-1758-0
- Palacios, Eduardo and Cárdenas Karen. 2015. "Full-Text." *Guías de Práctica Neurológica En El Embarazo* 24(4):8.
- Pennell, Page B. 2016. "Use of Antiepileptic Drugs During Pregnancy: Evolving Concepts." *Neurotherapeutics* 13(4):811–20.
- Prouillac, Caroline and Sylvaine Lecoecur. 2010. "The Role of the Placenta in Fetal Exposure to Xenobiotics: Importance of Membrane Transporters and Human Models for Transfer Studies." *Drug Metabolism and Disposition* 38(10):1623–3
- Rossant, Janet and James C. Cross. 2001. "Placental Development: Lessons from Mouse Mutants." *Nature Reviews Genetics* 2(7):538–48.
- Sarmiento, Luz Adriana. 2014. "Levetiracetam Determination in Serum by HPLC-UV." *Revista Med* 22(1):12–19.
- Santos Zambrano J, Benítez Díaz A, Castro Martínez E. 2011. Levetiracetam endovenoso en el tratamiento de la epilepsia en la Sala de Urgencias. Archivos de Medicina de Urgencia de México 3(1): 34-40.
- Sharma L, Kaur J, Rishi P, Shukla G. Plasmodium berghei: influence of infection on the oxidant and antioxidants levels in pregnant BALB/c mice. Exp Parasitol. 2012;131(2):215-222. doi:10.1016/j.exppara.2012.04.005
- Sherer, D. M. and O. Abulafia. 2001. "Angiogenesis during Implantation, and Placental and Early Embryonic Development." *Placenta* 22(1):1–13.
- Staud, Frantisek, Lukas Cerveny, and Martina Ceckova. 2012. "Harmacotherapy in Pregnancy ; Effect of ABC and SLC Transporters on Drug Transport across the Placenta and Fetal Drug Exposure." (June 2014).
- Strolin Benedetti, M., R. Coupez, R. Whomsley, J. M. Nicolas, P. Collart, and E. Baltes. 2004. "Comparative Pharmacokinetics and Metabolism of Levetiracetam, a New Anti-Epileptic Agent, in Mouse, Rat, Rabbit and Dog." *Xenobiotica* 34(3):281–300.
- Syme, Michael R., James W. Paxton, and Jeffrey a Keelan. 2004. "Human Placenta." *Clinical Pharmacokinetics* 43(8):487–514.

- Tomson, Torbjörn, Cecilie Johannessen Landmark, and Dina Battino. 2013. "Antiepileptic Drug Treatment in Pregnancy: Changes in Drug Disposition and Their Clinical Implications." *Epilepsia* 54(3):405–14.
- Uchiyama, M., & Mihara, M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 86(1), 271-278.
- Watson, Erica D. and James C. Cross. 2005. "Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta." *Physiology* 20(3):180–93.
- Wright, Chanin, Amanda Williams, Diana Mungall, Ekokobe Fonkem, Jose Aceves, Jana Downing, Batool Kirmani, Darin Garrett, and Owais Khan. 2013. "Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Levetiracetam." *Frontiers in Neurology* 4(December):1–6.

11. Anexos

a. Anexo A: Comité de Bioética.



Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"
Área de Ciencias de la Salud

Odontología - Enfermería - Químico Farmacéutico Biólogo - Medicina Humana - Nutrición



OP.No. ACS/UAZ/158/2019

Asunto: Aceptación.

*Dr. En C. BLANCA PATRICIA LAZALDE RAMOS
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD
PRESENTE*

Aprovechando el presente, me es grato informarle que una vez que fue evaluado por el Consejo de Bioética del Área de Ciencias de la Salud perteneciente a la Universidad Autónoma de Zacatecas, el Proyecto de Investigación: "Evaluación de expresión génica placentaria de Slc38A4 en ratones CDI (NIH) bajo tratamiento con levetiracetam y correlación de niveles plasmáticos", lo dictamino como **APROBADO**.

Sin otro particular por el momento, se expide la presente para los usos y fines legales que al interesado (a) convengan.

ATENTAMENTE

Zacatecas, Zacatecas., a 01 de noviembre de 2019.

Dr. Francisco Luna Pacheco MSc
Coordinador del Consejo Académico del Área de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Zacatecas.

c.c.p. Dr. Luis Alejandro Aguilera Galaviz. - Secretario Académico. - Para su conocimiento.
c.c.p. Dr. Manuel Reta Hernández. - Coordinador de Investigación y Posgrado. - Mismo Fin.
c.c.p. Archivo Institucional



Carretera Zacatecas-Guadalajara, Km.6,
Ejido la Escondida C.P. 98160 Zacatecas, Zac. Mexico.
Tel y Fax. 01 (492) 92-5-66-90 Ext. 4450
Edificio 1 Campus UAZ Siglo XXI

12. Cronograma de actividades:

Actividad/ Fecha.	Jun-Dic 2018	Ene-Feb 2019	Mar-Abr 2019	May-Jun 2019	Jul-Ago 2019	Sep-Oct 2019	Nov-Dic 2019	Ene-Feb 2020	Mar-Abr 2020	May-Jun 2020	Jul- Ago 2020
Aprobación por comité de bioética.											
Escritura del Protocolo.											
Presentación del Protocolo.											
Validación del método analítico.											
Seminario de Investigación II											
Tratamiento de animales.											
Recolección de muestras.											
Medición de concentración de LEV											
Participación en Congresos.				Farma México		* UAZ	* JE	* CIAM			* Mujer
Estancia de Investigación											
Análisis de Resultados.											
Escritura de la Tesis.											
Seminario de Titulación.											
Defensa de la tesis.											
Aceptación Artículo de Revisión.											
Publicación Artículo d											

c. Constancias Congresos



SEP
SECRETARÍA
DE EDUCACIÓN
PÚBLICA



Otorgan la presente
CONSTANCIA

A: Zapata Vázquez Yessica

Por su participación en el **Concurso de Carteles del XXV Congreso Estudiantil de Farmacología** y el **VIII Congreso Estudiantil Ciencia sin Fronteras** con el cartel titulado:

Metabolismo del Levetiracetam en Mujeres Embarazadas.

El cual se llevó a cabo los días 2, 3 y 4 de mayo de 2019, en la Universidad Anáhuac Norte.

M. en E. Celestino García Galindo
Coordinador General del Congreso



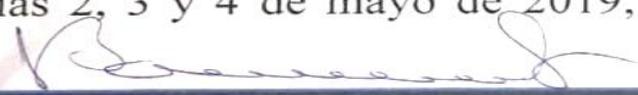
Otorgan la presente
CONSTANCIA

A: Zapata Vázquez Yessica

Por haber obtenido el **3º lugar** en la categoría de **Investigación bibliográfica Posgrado** en el **Concurso de Carteles del XXV Congreso Estudiantil de Farmacología** y el **VIII Congreso Estudiantil Ciencia sin Fronteras** con el cartel titulado:

Metabolismo del Levetiracetam en Mujeres Embarazadas.

El cual se llevó a cabo los días 2, 3 y 4 de mayo de 2019, en la Universidad Anáhuac Norte.


Dr. Tomás Barrientos Fortes
Director de la Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Anáhuac Norte

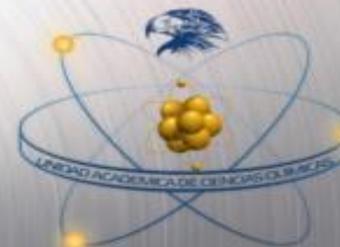


27 al 29
AGOSTO
2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
Francisco García Salinas

LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS
OTORGA EL PRESENTE
CONSTANCIA



*Año Internacional de la
Tabla Periódica*

A:

YESSICA ZAPATA VÁZQUEZ , MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS , CARLOS GALAVIZ
HERNÁNDEZ , MARISOL GALVÁN VALENCIA , BLANCA PATRICIA LAZALDE RAMOS.

Por su participación en la presentación del trabajo en la modalidad de Cartel:

"Transportadores Placentarios"

durante las "XII Jornadas y 2do Encuentro Nacional de Investigación en Ciencias Químicas", en el marco del Año
Internacional de la Tabla Periódica del 27 al 29 de Agosto del 2019, con un valor curricular de **10 horas crédito**
Zacatecas, Zac., 30 de Agosto de 2019

Jorge Luis Ayala Luján
Dr. Jorge Luis Ayala Luján
Director UACQ

www.jornadascquaz.org

Folio: 6262



CIENCIA Y TECNOLOGÍA



GOBIERNO DE MÉXICO



Secretaría Académica

La Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"

otorga la presente

CONSTANCIA

a

Yessica Zapata Vázquez

Por su participación como autor en el trabajo de Cartel titulado

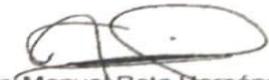
Transportadores SLC en placenta

presentado en las Jornadas de Investigación UAZ-2019, dentro de la Jornada
Estatad de Ciencia y Tecnología de Zacatecas 2019

Zacatecas, Zac., del 12 al 13 de Noviembre de 2019


Dr. Luis Alejandro Aguilera Galaviz
SECRETARIO ACADÉMICO


Dr. Antonio Guzmán Fernández
RECTOR


Dr. Manuel Reta Hernández
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO



La Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"

otorga la presente

CONSTANCIA

a **Yessica Zapata Vázquez**

Por su participación como autor en el trabajo de Presentación Oral titulado

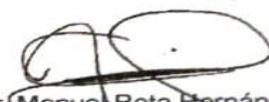
Validación de un Método analítico sencillo y rápido para la determinación de Levetiracetam

presentado en las Jornadas de Investigación UAZ-2019, dentro de la Jornada
Estatad de Ciencia y Tecnología de Zacatecas 2019

Zacatecas, Zac., del 12 al 13 de Noviembre de 2019


Dr. Luis Alejandro Aguilera Galaviz
SECRETARIO ACADÉMICO


Dr. Antonio Guzmán Fernández
RECTOR


Dr. Manuel Reta Hernández
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO



CIENCIA Y TECNOLOGÍA



GOBIERNO DE MÉXICO



Secretaría Académica

La Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a Yessica Zapata Vázquez

Por haber obtenido el 1er. lugar en Presentación Oral, nivel posgrado

Validación de un método analítico sencillo y rápido para la determinación de Levetiracetam

presentado en las Jornadas de Investigación UAZ-2019, dentro de la
Jornada Estatal de Ciencia y Tecnología de Zacatecas 2019.

Zacatecas, Zac., del 12 al 13 de Noviembre de 2019


Dr. Luis Alejandro Aguilera Galaviz
SECRETARIO ACADÉMICO


Dr. Antonio Guzmán Fernández
RECTOR


Dr. Manuel Reta Hernández
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO

HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente

CONSTANCIA

YESSICA ZAPATA VÁZQUEZ

Por su participación como:

ASISTENTE

CONGRESO INTERNACIONAL DE ENFERMERÍA

"Año Internacional de Enfermería"

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

esta constancia quedó asentada en el libro 09, foja 147 de la coordinación de servicios académicos con 24 horas.

Celebrado en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco, del 27 al 29 de Febrero 2020


Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Director General
Hospital Civil de Guadalajara


Dr. José Francisco Muñoz Valle
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud


Dr. Benjamín Decerra Rodríguez
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"


Dr. Rafael Santana Ortiz
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"


Lic. Enfrida Laura Fernández Romero
Presidenta Ejecutiva
IX Congreso Internacional de Enfermería



QR de Validación

HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Otorgan la presente

CONSTANCIA

YESSICA ZAPATA VÁZQUEZ

Lazalde Ramos Blanca Patricia, Gálvan Valencia Marisol, Sosa Macías Martha Guadalupe, Galaviz Hernández Carlos,

Por su participación en el XIX Concurso de trabajos en cartel en la categoría Investigación Básica con el trabajo titulado:

Validación de un método analítico rápido y sencillo para la determinación de Levetiracetam mediante HPLC-UV.

"Fortalecer las Buenas Prácticas Asistenciales"

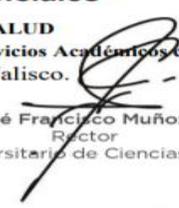
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

esta constancia quedó asentada en el libro 09, foja 147 de la Coordinación de Servicios Académicos con 24 Horas.

Celebrado en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco.

27 al 29 de Febrero de 2020


Dr. Jaime Federico Andrade Villanueva
Director General
Hospital Civil de Guadalajara


Dr. José Francisco Muñoz Valle
Rector
Centro Universitario de Ciencias de la Salud


Dr. Benjamín Becerra Rodríguez
Director
Nuevo Hospital Civil de Guadalajara
"Dr. Juan I. Menchaca"


Dr. Rafael Santana Ortiz
Director
Antiguo Hospital Civil de Guadalajara
"Fray Antonio Alcalde"


Dra. Martha Patricia Sánchez Muñoz
Presidente Ejecutivo
XXII Congreso Internacional Avances en Medicina



XVII encuentro
Participación de la
Mujer
en la
Ciencia

21-25 Septiembre 2020 León, Guanajuato



*Otorga el presente
Reconocimiento
por su valiosa participación a:*

**Yessica Zapata Vázquez, Martha Guadalupe Sosa Macías, Marisol Galván Valencia,
Carlos Galaviz Hernández y Blanca Patricia Lazalde Ramos**

Por el trabajo:

**Validación de un método analítico rápido y sencillo para la determinación de
Levetiracetam mediante HPLC-UV.**

Cristina E. Solano Sosa
Representante del Comité Organizador

Rafael Espinosa Luna
Director General del CIO





LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
Francisco García Salinas



A TRAVÉS DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS
Y LA ASOCIACIÓN NACIONAL DE
FACULTADES Y ESCUELAS DE QUÍMICA, A. C.

Folio: 6796

OTORGAN EL PRESENTE
RECONOCIMIENTO

A:

YESICA ZAPATA VÁZQUEZ

Por ser ALUMNA DESTACADA del programa de M.C.T.Q., de la
Unidad Académica de Ciencias Químicas de la UAZ en el 2019

En el marco de la **XXI** Asamblea General Ordinaria y la **XIX** Conferencia Nacional de la
Asociación Nacional de Facultades y Escuelas de Química, A. C.
del 04 al 06 de Noviembre de 2020

Zacatecas, Zac., 06 de Noviembre de 2020


Dr. Jorge Luis Ayala Luján
Director UACQ


Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidenta ANFEQUI

LA ENSEÑANZA DE LA
QUÍMICA EN LA NUEVA
NORMALIDAD

