

Universidad de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera Farmacia 1404



***Interacción quinidina-topiramato:
de la clínica a la preclínica***

Alumna: María Candela Fagnani

Matrícula: 2707

Tutora: Dra. María Sylvia Viola

Cotutora: Bioq. María Cecilia Kravetz

Agradecimientos

A mis padres, quienes me dieron la posibilidad de estudiar una carrera universitaria y siguieron desde cerca mi camino.

A mis hermanas, Lucía y Sol, por ser mi inspiración y compañeras no sólo en la vida sino también durante la carrera.

A mis amigas de siempre, Milagros y Paula, gracias por estar.

A Uriel, mi novio y compañero de vida y a su familia, por ser parte.

A María Sylvia por su gran labor como tutor, su humildad, sabiduría y compromiso con la tesina.

A Cecilia y a Florencia, que trabajan en la Universidad de Buenos Aires, por su colaboración y ayuda en la manipulación de animales y con el equipo de HPLC.

Al Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria, Cátedra de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires por permitir que desarrolle la tesina facilitando los animales durante la pandemia.

A Micaela por ser mi compañera, amiga y pronto colega con la que compartí trabajos prácticos, laboratorios y tardes de estudio.

A mis amigas y pronto colegas que me dio la carrera por su compañía codo a codo estos cinco años.

Índice de contenidos

Agradecimientos.....	2
Índice de contenidos	3
Abreviaturas	5
Objetivos generales.....	7
Objetivos específicos	7
Resumen	8
1. Introducción.....	10
1.1 Epilepsia y tipos	10
1.2 Tratamientos de las convulsiones.....	11
1.3 Tratamiento farmacológico de Epilepsia Parcial Migratoria de la Infancia	12
1.3.1 Caso clínico	13
1.4 Quinidina	14
1.4.1 Farmacocinética	15
1.4.2 Eventos adversos.....	16
1.4.3 Interacciones con otros medicamentos.....	16
1.5 Topiramato	17
1.5.1 Farmacocinética	17
1.5.2 Efectos adversos	18
1.5.3 Interacciones con otros fármacos	19
1.6 Estudio de las interacciones de Fármacos	19
1.6.1 Cómo estudiar la interacción farmacocinética de medicamentos	21
2. Materiales y Métodos	24
2.1 Simulación de la interacción.....	24
2.2 Estudio en un modelo animal	24
2.2.1 Fármacos.....	24
2.2.2 Animales.....	24
2.3 Diseño farmacocinético	24
2.3.1 Protocolo de elección de dosis.....	24
2.3.2 Protocolo de estudio de la interacción topiramato-quinidina	25
2.3.3 Protocolo de estudio de la interacción acetazolamida-quinidina	25
2.3.4 Análisis farmacocinético.....	25

Interacción quinidina-topiramato: de la clínica a la preclínica

2.4 Dosaje de quinidina.....	25
2.4.1 Equipo y condiciones cromatográficas.....	25
2.4.2 Validación del método analítico.....	26
3. Resultados.....	27
3.1 Estudios de predicción <i>in silico</i> : DDI-Pred	27
3.2 Estudios en animales	28
3.2.1 Definición de dosis y tiempos.....	28
3.2.2 Efectos del topiramato sobre la farmacocinética de la quinidina	28
3.2.3 Estudio con un inhibidor de la anhidrasa carbónica	31
4. Discusión y conclusiones	34
5. Bibliografía.....	37
6. Anexos.....	38
ANEXO I. Espectros de absorción en el UV.....	38
ANEXO II. Valoración de la quinidina por HPLC.....	39

Abreviaturas

AUC: (*area under the curve*) Área bajo la curva.

AUC_{0-t}: (*area under the plasma concentration-time curve calculated from the time of dosing to the last measurable concentration*) Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo calculada desde el momento de dosificación hasta la última concentración medible.

AUC_{t-inf}: (*area under the plasma concentration-time curve calculated from the time of dosing to infinity*) Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo calculada desde el momento de la dosificación hasta el infinito.

AC: Anhidrasa carbónica.

AZA: Acetazolamida.

AED: Fármaco anticonvulsivante.

Cl: Clearance.

C_{máx}: Concentración plasmática máxima.

DDI: (*Drug-drug interaction*) Interacción fármaco-fármaco.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EMA: (*European Medicines Agency*) Agencia Europea de Medicamentos.

EPMI: Encefalopatía parcial migratoria de la infancia.

FDA: (*United States Food and Drug Administration*) Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos.

FM: Fase móvil.

HPLC-UV: (*High Performance Liquid Chromatography*) Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplado a un espectrofotómetro ultravioleta.

ILAE: (*International League Against Epilepsy*) Liga Internacional contra la Epilepsia.

ip: Intraperitoneal.

KNCT1: (*Potassium sodium-activated channel subfamily T member 1*) Canal de sodio-potasio subfamilia T miembro 1.

LOQ: Límite de cuantificación.

Interacción quinidina-topiramato: de la clínica a la preclínica

LOD: Límite de detección.

MDR1: (*Multidrug resistance protein*) Proteína de resistencia a múltiples fármacos.

OATP: (*Organic anion transporting polypeptide*) transporte de aniones orgánicos polipeptídicos.

P-gp: glicoproteína P.

QND: quinidina.

T_{máx}: tiempo al que se alcanza la C_{máx}.

TPM: topiramato.

T_{1/2}: semivida de eliminación o tiempo de vida media.

Objetivos generales

- Analizar en modelos preclínicos la posible interacción entre la quinidina y el topiramato vista en un caso clínico.

Objetivos específicos

- Estudiar *in silico* la posible interacción.
- Estudiar la posible interacción farmacocinética de la quinidina en ratones.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue investigar desde el punto de vista preclínico la posible interacción entre quinidina y topiramato a partir de un caso clínico. Kravetz y col., 2021, informaron el caso de una paciente pediátrica con Encefalopatía Migratoria Parcial de la Infancia (EMPI) por mutación en el canal KCNT1 que fue tratada con quinidina (QND) como alternativa farmacológica. Se logró el control completo de las crisis al alcanzar los niveles séricos del rango terapéutico (1.5- 4.5 mcg/ml). Sin embargo, en la experiencia con esta paciente, se observó una mayor variabilidad de los niveles de quinidina relacionada a las dosis de topiramato (TPM) y también la dependencia para el control de las crisis. Esto sugirió una interacción entre la quinidina y el topiramato. Se propone estudiar en modelos preclínicos la posible interacción farmacocinética quinidina- topiramato.

Se utilizó un simulador *in silico*, DDI Pred, con el fin de evaluar los citocromos involucrados en el metabolismo de la quinidina y el topiramato y su posible interacción por medio del metabolismo. Los resultados de la predicción revelan que no habría interacción a nivel de los citocromos involucrados (CYP3A4, CYP2C8, CYP2C19, CYP2B6, CYP2C9, CYP1A2, CYP2D6) en el metabolismo de QND y TPM.

Se eligió un modelo animal (ratones cepa FB1) para estudiar la farmacocinética *in vivo* de la quinidina más topiramato. Un grupo de ratones fueron pretratados con topiramato 50 mg/kg, ip, y luego de 15 minutos recibieron quinidina 30 mg/kg, ip; otro grupo sólo fue administrado con quinidina. Se determinó la concentración plasmática de quinidina por HPLC-UV a los 10, 30 y 60 minutos desde la administración de la dosis. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de concentración plasmática en función del tiempo para el grupo quinidina y quinidina más topiramato. La constante de eliminación fue de 0,019 min⁻¹ para el grupo de QND y de 0,016 min⁻¹ para el grupo pretratado con TPM. El AUC_(0-t) fue de 87,70 mcg/ml.min y 123,80 mcg/ml.min para el grupo de QND y QND+TPM, respectivamente, con una diferencia significativa de p=0.0012, se demuestra un aumento en la biodisponibilidad de la quinidina luego de una dosis única de topiramato.

El topiramato tiene la propiedad de inhibir a la anhidrasa carbónica (AC) y así aumentar el pH urinario y que cause el aumento de la disponibilidad de la quinidina. Por esto se estudió en dos grupos de ratones la farmacocinética de la quinidina luego de la administración de acetazolamida, un diurético inhibidor específico de la AC. El grupo control recibió QND 30 mg/kg, ip y otro fue pretratado 30 minutos antes con acetazolamida 100 mg/kg, ip, y luego recibió QND 30 mg/kg, ip. La constante de eliminación fue de 0,027 min⁻¹ para el grupo de QND y de 0,022 min⁻¹ para el grupo pretratado con AZA. El AUC_(0-t) fue de 77,55 mcg/ml.min y 83,40 mcg/ml.min, respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos resultantes no mostraron diferencias significativas para el AUC_(0-t),

Interacción quinidina-topiramato: de la clínica a la preclínica

El topiramato en agudo afecta la biodisponibilidad de la quinidina en el modelo estudiado, no se puede descartar el compromiso de la inhibición de la AC, quedan varias posibilidades para seguir estudiando esta interacción.

Palabras clave: ensayo preclínico, quinidina, topiramato, interacciones entre fármacos, interacción farmacocinética, HPLC-UV.

1. Introducción

1.1 Epilepsia y tipos

La epilepsia es un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición continua a la aparición de crisis o convulsiones epilépticas y con consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales¹. La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) define conceptualmente a la crisis epiléptica como la aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal anómala, excesiva o simultánea en el cerebro; las clasifica según sean de inicio focal, generalizado, combinadas generalizada/ focal o desconocido (ver Figura 1)². El diagnóstico de epilepsia requiere la presencia de al menos una crisis epiléptica. La ILAE añade una definición clínica práctica de la epilepsia, donde señala circunstancias para definirla:

- 1- Al menos dos crisis no provocadas (o reflejas) con más de 24 h de separación.
- 2- Una convulsión no provocada (o refleja) y una probabilidad de convulsiones adicionales similares al riesgo de recurrencia general (al menos 60%) después de dos convulsiones no provocadas, que ocurren en los próximos 10 años.
- 3- Diagnóstico de un síndrome de epilepsia.

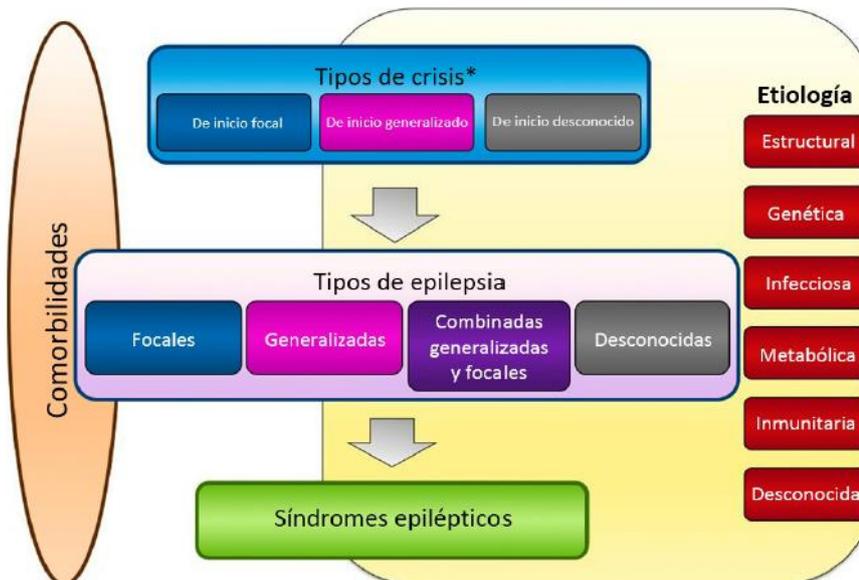


FIGURA 1. MARCO PARA LA CLASIFICACIÓN DE LAS EPILEPSIAS (ILAE) * INDICA EL INICIO DE LAS CRISIS.

El punto de partida para la tipificación de la epilepsia son la clasificación de las crisis: inicio focal, inicio generalizado o inicio desconocido. El segundo nivel es el de tipo de epilepsia donde el paciente debería tener un diagnóstico basado en la definición anteriormente descrita. Las personas con epilepsias generalizadas pueden tener una variedad de tipos de convulsiones

que incluyen ausencias, mioclónicas, atónicas, tónicas y tónico-clónicas. En cuanto a las epilepsias focales, éstas incluyen trastornos unifocales y multifocales, de inicio en un hemisferio que pueden trasladarse al otro. En ambos casos, se pueden observar variedad de convulsiones y el diagnóstico se basa en criterios clínicos, apoyados por el hallazgo de descargas típicas de electroencefalograma (EEG). Existe un nuevo grupo de epilepsias generalizadas y focales combinadas. El diagnóstico se basa en los mismos criterios anteriormente nombrados, un ejemplo es el síndrome de Lennox-Gastaut. El término “desconocido” se utiliza para indicar cuando el médico no puede determinar si el tipo de epilepsia es focal o generalizado porque no hay suficiente información disponible o si la hay, ésta no es concordante con los otros tipos. Este segundo nivel puede ser el final del diagnóstico cuando el médico no puede establecer una valoración del síndrome de epilepsia.

El tercer nivel es un diagnóstico del síndrome de epilepsia que se caracteriza porque incorpora tipos de crisis, EEG y diagnóstico por imágenes. Las singularidades dependen de la edad, los desencadenantes de las crisis, variación diurna, a veces el pronóstico y puede acompañarse de comorbilidades como disfunción intelectual y psiquiátrica.

En el caso de la etiología, se puede determinar mediante neuroimágenes el tipo de origen de la epilepsia del paciente, pudiendo coexistir varias etiologías para una epilepsia. La etiología estructural puede ser adquirida o genética donde una lesión de la estructura indicaría la posible causa de las crisis del paciente, aunque es necesario mayores estudios por imágenes para confirmarlo. La etiología genética es muy diversa, es la consecuencia de una mutación conocida o presunta en la cual las crisis son uno de los principales síntomas. La etiología infecciosa puede ser resultado de un proceso agudo como meningitis o encefalitis, tuberculosis, VIH, entre otros. En cuanto a la etiología metabólica puede ser de origen genético o adquirido, donde un defecto metabólico causa cambios bioquímicos en todo el organismo. En aquellos casos donde se evidencia inflamación del sistema nervioso central mediada por anticuerpos, se puede conceptualizar la etiología inmunitaria. Por último, cuando no se conoce y tampoco puede establecerse un diagnóstico, se la llama desconocida.

En la Figura 1 en el óvalo vertical izquierdo se encuentran las comorbilidades de distintas gravedades y tipos. Entre ellas se encuentran: las dificultades en el aprendizaje, el deterioro intelectual, los trastornos del espectro autista, la depresión; los casos más graves son parálisis cerebral y también trastornos del movimiento, escoliosis, trastornos gastrointestinales y sueño².

1.2 Tratamientos de las convulsiones

La clasificación del tipo de crisis tiene importancia clínica para el diagnóstico y el tratamiento, además de la investigación para el desarrollo de nuevas terapias. Con la identificación del tipo de crisis se puede detectar el desencadenante y evaluar el pronóstico, como también informar sobre los riesgos de las comorbilidades. La comprensión de la epilepsia y la evolución en su

clasificación ha permitido el desarrollo de terapias farmacológicas innovadoras, enfoques dietéticos o quirúrgicos y desarrollos de dispositivos médicos².

En el mercado existen más de 20 medicamentos anticonvulsivantes (AED) que representan la terapia mayormente elegida. El mecanismo de acción de los AEDs es suprimir los síntomas (convulsiones) y se clasifican de primera generación: fenobarbital, primidona, carbamazepina, fenitoína, etosuximida, ácido valproico, benzodiazepinas; los de segunda generación: lamotrigina, levetiracetam, topiramato, zonisamida, oxcarbamazepina, perampanel, vigabatrin, rufinamida, felbamato, acetato de elisacarbacepina, lacosamida, pregabalina, gabapentin, tiagabine, brivaracetam, everolimus y estiripentol. Si bien algunos AEDs de primera generación todavía son de primera elección, los de segunda generación tienen como ventaja menores interacciones y mejor tolerabilidad³.

El tratamiento puede comenzar con un único AED a dosis baja que puede ir incrementándose hasta lograr el control de las convulsiones. Menos del 15 % de los pacientes presentan resistencia al tratamiento farmacológico y deben asociarse otros fármacos para controlar las crisis. La ILAE define resistencia al tratamiento como “el fracaso con dos esquemas de AEDs tolerados, elegidos y utilizados apropiadamente, en monoterapia o en combinación, para lograr una ausencia sostenida de convulsiones”. Frente a esta situación se deberán considerar otras opciones disponibles para evitar un daño mayor que aumente la morbi-mortalidad y la discapacidad³.

La cirugía del foco epiléptico puede ser beneficiosa y ha demostrado ser efectiva en pacientes con convulsiones focales farmacorresistentes para lograr el control de las convulsiones por un tiempo prolongado. El éxito de la intervención quirúrgica depende del tipo de convulsión, patologías subyacentes y un electroencefalograma o resonancia magnética por imágenes claras, para localizar el sitio epileptogénico a ser removido durante la cirugía⁴. Es importante destacar que no siempre se detienen las convulsiones. También, los dispositivos de estimulación del nervio vago pueden ser de elección en aquellos pacientes no candidatos a cirugía y cuya epilepsia es resistente a los fármacos.

Otra posible alternativa es la dieta cetogénica o mayormente conocida como “keto” que se caracteriza por ingerir alimentos con altos contenidos de grasas (90%) y bajo contenido de proteínas y carbohidratos. Puede ser una opción para las epilepsias resistentes a fármacos en adultos, pero no se recomienda en niños por la restricción calórica y la posibilidad de deficiencia de otros nutrientes necesarios para el correcto desarrollo⁵.

1.3 Tratamiento farmacológico de Epilepsia Parcial Migratoria de la Infancia

La epilepsia parcial migratoria de la infancia (EPMI) con convulsiones focales migratorias es una encefalopatía epiléptica rara y grave que pertenece al grupo de las epilepsias de inicio temprano. Se caracteriza por manifestar farmacorresistencia con retraso en el desarrollo⁶. Los

pacientes pueden comenzar con convulsiones alrededor de los 6 meses de vida con un curso clínico caracterizado por epilepsia intratable y discapacidad intelectual severa⁷.

La causa más común es debido a mutaciones particulares como la del gen que codifica para la subunidad más grande del canal de sodio-potasio, subfamilia T miembro 1 llamado KCNT1, este canal iónico se encuentra expresado en gran proporción en el sistema nervioso central⁸. La mutación se encuentra asociada al 50% de los casos a la EPMI, si bien también existen otras anomalías genéticas asociadas como las mutaciones en SCN1A, SCN2A, PLCB1, TBC1D24 y CHD2⁹. Se ha demostrado por estudios *in vitro* que el KCNT1 mutado genera corrientes más amplias en comparación con los canales de KCNT1 de tipo salvaje, o sea la ganancia de función es el responsable de la epileptogénesis asociada con las variantes de KCNT⁶.

Algunos autores han propuesto para su tratamiento a los AEDs en combinación con otros fármacos como la quinidina, el bromuro de potasio¹⁰ o las dietas cetogénicas¹¹ con resultados favorables. Otras medicaciones incluyen al estiripentol, la prednisona, la hormona adrenocorticotropa y la estimulación del nervio vago.

La quinidina, un fármaco antiarrítmico y antimalárico, que bloquea los canales de potasio puede ser una opción de tratamiento. Mullen y col. demostraron en estudios *in vitro* que la ganancia de función por la mutación del canal se revierte con el tratamiento en dosis dependiente con la quinidina¹². A dicha evidencia se suman algunos casos exitosos en niños que han utilizado la quinidina como tratamiento para EPMI^{8,11}, mientras que otros pacientes aún a altos niveles de quinidina no han podido controlar las convulsiones⁷.

1.3.1 Caso clínico

Kravetz y col.¹³, estudiaron el caso de una paciente de 7 años con EPMI, que a los 4 años se le detectó una variante del canal de potasio (KCNT1) con función alterada como causa de sus convulsiones. Después de diferentes esquemas de tratamientos con anticonvulsivantes, se introdujo como alternativa terapéutica a la QND, además del topiramato (200 mg/día) y el nitrazepam (2 mg/día). El seguimiento de la terapia requirió monitorización sérica de la QND debido a la alta variabilidad y al riesgo de cardiotoxicidad (ver Figura 2). Las convulsiones se controlaron con niveles plasmáticos de QND superiores a 1,5 mcg/ml (65–70 mg/kg q.i.d). Las concentraciones superiores a 4,0 mcg/ml se relacionaron con un mayor riesgo de sufrir arritmia debido a la prolongación del segmento QT. A pesar de la intención inicial de retirar el topiramato por completo, la QND sola no pudo mantener el control de las convulsiones, por lo cual el topiramato fue reintroducido. Además, se observó una mayor variabilidad de los niveles de quinidina relacionada a las dosis de topiramato (TPM).

Esta variabilidad fue a dosis mayores de quinidina en comparación con dosis más bajas. Inicialmente, cuando las dosis aumentaron de 240 a 640 mg/día, la concentración de QND

aumentó de 0,6 mcg/ml a 1,0 mcg/ml. Pero analizando el mismo incremento en la dosis (aproximadamente 400 mg/día) con dosis más altas (1,160 a 1,600 mg/día), resultó en una mayor variación de los niveles séricos obtenidos (1.5- 4.1 mcg/ml).

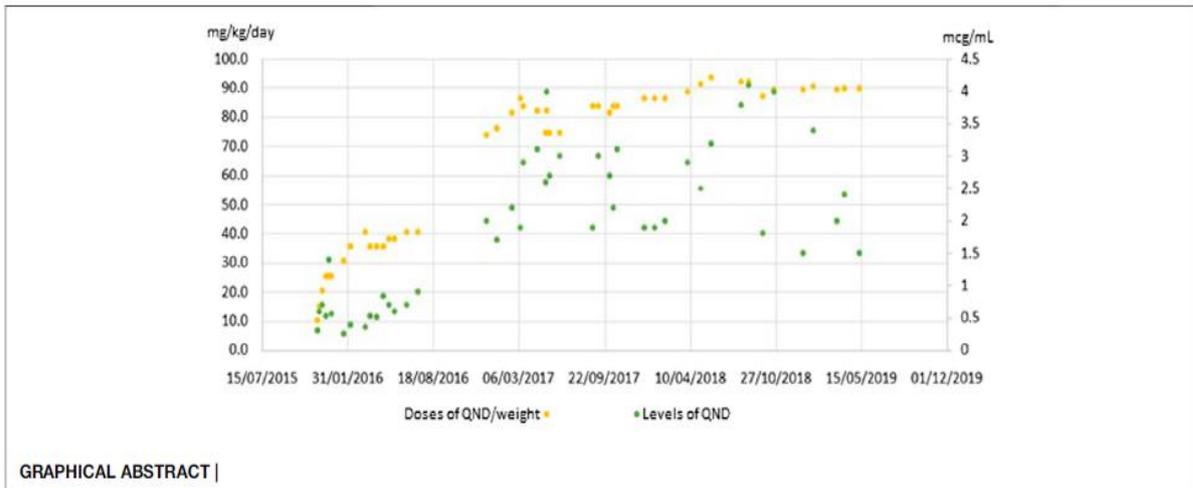


FIGURA 2. MONITORIZACIÓN SÉRICA DE QND DEL CASO KRAVETZ Y COL.

Esto sugeriría una posible interacción entre la quinidina y el topiramato. Se propone estudiar en modelos preclínicos la posibilidad de esta interacción.

1.4 Quinidina

La quinidina es un agente antiarrítmico de clase 1, utilizado frecuentemente para prevenir arritmias ventriculares, también se ha usado como antimalárico. La QND bloquea las corrientes de sodio y múltiples corrientes cardíacas de potasio¹⁴ y además bloquea reversiblemente el canal KCNT1^{6,7,15,16}. Esta última característica como se describió en 1.3.1 es la base para la indicación como anticonvulsivante de uso *off label* o fuera de etiqueta^{6,7}.

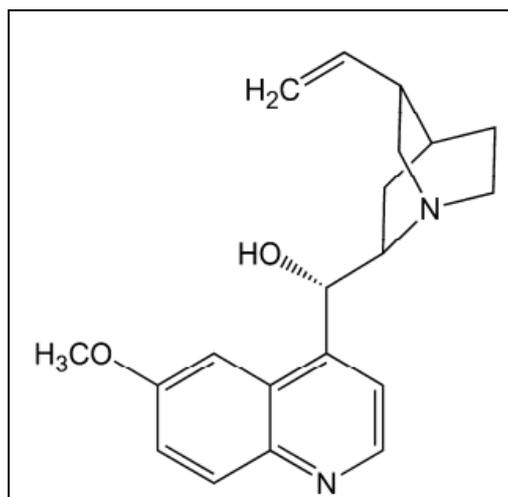


FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA QUINIDINA

1.4.1 Farmacocinética

Absorción: su absorción por vía oral es buena, la velocidad de absorción puede variar dependiendo de la formulación, las características de los individuos (variabilidad interindividual)¹⁷ y puede disminuir con alimentos¹⁶. La QND sufre de un extenso metabolismo de primer paso hepático, su biodisponibilidad absoluta por vía oral es de 70 % o más¹⁷.

La concentración plasmática máxima (C_{máx}) se alcanza aproximadamente entre 60 a 90 minutos luego de la administración oral¹⁹, siendo el rango de niveles plasmáticos efectivos para el control de la epilepsia entre 0,4 a 5,0 mcg/mL¹⁵.

Distribución: en el rango de concentración plasmática terapéutica, el 80 % aproximadamente se une a las proteínas plasmáticas y a las lipoproteínas de alta y baja densidad. Algunos estudios demuestran que la quinidina podría interaccionar con la albúmina y otros sugieren que podría interaccionar con globulinas alfa1 y alfa2¹⁷. La unión a proteínas plasmáticas puede verse afectada en pacientes con cirrosis debido a la hipoalbuminemia, pero no se encuentra afectada en la insuficiencia renal. En el caso de cirrosis, la fracción libre de quinidina aumenta y por lo tanto el riesgo de cardiotoxicidad también. El volumen aparente de distribución es de 2,0 a 3,5 l/kg¹⁸.

Metabolismo: la QND es metabolizada en el hígado casi en su totalidad (60-85 %) por el citocromo CYP3A4 mediante 3-hidroxilación y N-oxigenación, siendo sus metabolitos 3-hidroxiquinidina (activo), N-óxido de quinidina, 2¹-oxiquinidina y O-desmetilquinidina. El 15-40 % de la dosis se elimina sin cambios en la orina²².

Se ha observado en voluntarios sanos que la quinidina sigue una farmacocinética no lineal con la dosis¹⁹, esto corresponde a un clearance (Cl) no lineal dependiente de la dosis o a una biodisponibilidad dependiente de la dosis¹⁵.

La semivida de eliminación es de 5 a 12 horas luego de la administración intravenosa, y su clearance es de 2,5 a 5,0 ml.min/kg. El clearance se ve reducido en ancianos sanos, en pacientes con cirrosis y con problemas cardíacos en comparación con jóvenes. En el caso de insuficiencia renal, como el clearance renal es una pequeña fracción del total, tendría poca influencia en el CI total de la QND¹⁵. Sin embargo, la excreción renal de su isómero óptico se encuentra alterada por la alcalinización de la orina y por lo tanto el clearance renal de la QND se reduce por el aumento del pH urinario.

1.4.2 Eventos adversos

Son comunes las reacciones adversas de hipersensibilidad (fiebre, urticaria, asma, hepatitis y depresión medular). Es frecuente la trombocitopenia que se revierte al suspender el tratamiento. También se ven efectos anticolinérgicos como sequedad bucal, estreñimiento, visión borrosa o retención urinaria²⁰.

La diarrea es frecuente en el 30-50 % de los pacientes, que a veces obliga a dejar el tratamiento²⁰.

El cinchonismo, síndrome por intoxicación con quinidina, se caracteriza por trastornos visuales y auditivos, confusión, alucinaciones y psicosis, está relacionado con la dosis, revierte al disminuir la concentración plasmática del fármaco²⁰.

También se presentan reacciones cardiovasculares como hipotensión, bradicardia y bloqueo AV y depresión de la contractibilidad. Se ha descrito la prolongación del intervalo QT a concentraciones plasmáticas mayores que las terapéuticas. Las dosis mayores de 74,5 mg/kg/día o concentraciones plasmáticas por encima de 9,4 mcg/ml pueden producir problemas más serios que sólo la prolongación del intervalo QT⁸, por ello es muy importante monitorizar las concentraciones plasmáticas. En pacientes con fibrilación auricular puede suceder que al inicio del tratamiento sufran de *torsade de Pointes* como resultado de la prolongación del intervalo QT o luego de un tratamiento prolongado en asociación con hipocalcemia²⁰.

1.4.3 Interacciones con otros medicamentos

Se han reportado para la quinidina interacción medicamentosa con 528 fármacos, de las cuales 199 son interacciones importantes en severidad, 312 moderadas y 17 son menores en severidad²¹.

Algunas de las interacciones de la QND están mediadas por la potente inhibición estereoselectiva de la actividad del citocromo hepático CYP2D6, como es el caso del haloperidol, antidepresivos tricíclicos y propranolol; o la codeína y la hidrocodona²².

La quinidina puede ser prescrita en asociación con otros anticonvulsivantes como la carbamazepina, la fenitoína o el fenobarbital, que inducen al CYP3A4 y por lo tanto aumentan

su metabolismo⁹. El ketoconazol, la eritromicina y el verapamilo afectan el metabolismo de la QND porque inhiben el citocromo CYP3A4 y disminuye su clearance hepático, generando el aumento de la concentración plasmática de la misma²².

La quinidina interacciona con la digoxina²² provocando el aumento de la concentración plasmática. Uno de los posibles mecanismos es que la quinidina inhibe la excreción de la digoxina al bloquear la P-gp en el túbulo renal y por lo tanto inhibe la secreción tubular de la digoxina²³.

1.5 Topiramato

El topiramato se encuentra dentro de la nueva generación de anticonvulsivantes, junto con la gabapentina, la vigabatrina, la oxcarbamacepina, la lamotrigina y el felbamato.

El TPM es un monosacárido derivado de la D-fructosa, que fue aprobado como terapia adjunta para las convulsiones parciales y generalizadas. Luego se comenzó a utilizar para el dolor neuropático, la migraña, el temblor esencial, el trastorno bipolar, la bulimia nerviosa y la dependencia alcohólica²⁴.

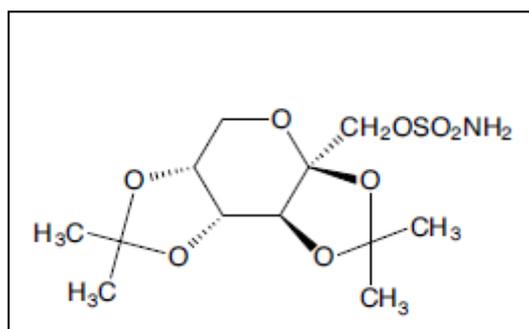


FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL TOPIRAMATO²⁵

1.5.1 Farmacocinética

Absorción: se absorbe rápidamente con una muy buena biodisponibilidad (81-95%). En estudios de dosis única en voluntarios sanos el área bajo la curva aumentó linealmente con la dosis y la concentración plasmática máxima se alcanzó a las 2-4 horas, lo mismo sucede en los niños. Sin embargo, el clearance en los niños fue 50 % mayor que en los adultos²⁵.

Distribución: el volumen de distribución del TPM es de 0,6 a 0,8 L/kg, se distribuye bien en el agua corporal total²⁶. En las mujeres es un 50 % menor que en los hombres, por su mayor porcentaje de grasa, aunque no tiene implicancia clínica relevante. La concentración plasmática tanto en hombres como en mujeres no ha mostrado diferencias²⁵.

El TPM tiene baja unión a proteínas plasmáticas (9-17 %) y a bajas concentraciones se une a los eritrocitos hasta que se saturan los sitios de unión²⁶.

Metabolismo: no sufre un extenso metabolismo hepático. En voluntarios sanos que recibieron una dosis de [¹⁴C]topiramato 100 mg, el topiramato sin cambios representó el 85 % de la radiactividad plasmática total a las 24 horas después de la administración. En los humanos se han identificado seis trazas de metabolitos formados por glucuronidación, hidroxilación y hidrólisis. Ninguno de estos metabolitos representó más del 5 % de la radiactividad total. Se encontró que los metabolitos tienen poco o ningún efecto anticonvulsivo²⁵.

Eliminación: en el estado estacionario su semivida de eliminación es de 21 horas²⁵. En un estudio en hombres sanos que recibieron una única dosis de TPM, la mayor ruta de eliminación (80,6 % del total de la dosis) fue la renal tanto para topiramato como para sus metabolitos, sólo el 0,72 % fue por las heces. En pacientes con daño renal, se observó un incremento en las concentraciones séricas y el T_{1/2} también fue mayor, aunque la C_{máx} y el T_{máx} no sufrieron cambios²⁶.

El aclaramiento de topiramato aumenta aproximadamente 2 veces cuando se administra con AEDs inductores enzimáticos, principalmente como resultado del aumento del aclaramiento no renal. Por el contrario, en pacientes con patologías renales, el CI disminuye. Durante la hemodiálisis el topiramato de la sangre es removido, para compensar la pérdida, estos pacientes tendrán que recibir un suplemento de la dosis²⁵.

1.5.2 Efectos adversos

Los eventos adversos más reportados en estudios clínicos controlados incluyen: mareos, pensamiento lento, somnolencia, ataxia, fatiga, confusión, alteración de la concentración y parestesia. Estos eventos ocurrieron en los dos primeros meses de tratamiento con el TPM y el 80-90 % se resolvieron cerca del final del estudio²⁵.

El TPM tiene una estructura similar a la acetazolamida que le confiere una acción inhibitoria de la anhidrasa carbónica sobre las isoenzimas II y IV, aunque 10 a 100 veces menor. La inhibición de la AC puede generar un cuadro de acidosis tubular renal por deficiencia de la enzima, que genera aumento del pH urinario. También se ha informado nefrolitiasis y parestesias debido a la actividad inhibitoria de la anhidrasa carbónica²⁵.

Otros efectos secundarios infrecuentes son miopía grave, glaucoma de ángulo cerrado⁴⁵, hipertermia y anhidrosis^{24,27}.

1.5.3 Interacciones con otros fármacos

El sitio web Drugs.com reporta para el topiramato que podría interactuar con 264 fármacos, donde 165 serían interacciones medicamentosas moderadas, 96 severas y sólo 3 interacciones menores²¹.

La administración del TPM conjunta con AEDs no inductores no causa mayores cambios en la concentración plasmática. Sin embargo, la administración de AEDs inductores pueden afectar la eliminación TPM resultando en una concentración plasmática menor de aproximadamente un 50 %²⁶, tal es el caso la carbamazepina y la fenitoína²⁵.

El topiramato inhibe la actividad del citocromo CYP2C19, reduciendo el clearance de los fármacos que se metabolizan en dicho citocromo, pero no tiene actividad sobre otros citocromos como CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3E1 y CYP3A4²⁸. En el caso de los anticonceptivos orales combinados (ACO), un estudio encontró que el topiramato tiene un efecto moderado sobre la farmacocinética de los que contienen noretindrona y etinilestradiol. El TPM no generó ningún cambio en la noretindrona pero sí disminuyó la concentración plasmática del etinilestradiol. La diferencia en el efecto del topiramato sobre el componente de progesterona en este estudio y el informado con los AED inductores enzimáticos conocidos puede estar relacionada con la variación en el derivado de la progesterona utilizado (por ejemplo, noretindrona vs. levonorgestrel). El resultado puede deberse a la conocida baja actividad inductora sobre el citocromo P450 que tiene el TPM²⁹.

1.6 Estudio de las interacciones de Fármacos

Se denomina interacción farmacológica a la acción que un fármaco ejerce sobre otro, de modo que uno de ellos experimente un cambio cuantitativo o cualitativo en sus efectos. En toda interacción hay un fármaco cuya acción es modificada (fármaco interferido) y otro u otros que actúan como desencadenantes de la interacción, en algunos casos, la interacción puede ser bidireccional³⁰.

Los fármacos con diferentes mecanismos de acción pueden combinarse para lograr efectos sinérgicos aditivos positivos. Tales interacciones positivas permiten utilizar dosis reducidas y así limitar los efectos adversos que dependen de la dosis o de la concentración³¹.

Las interacciones por combinación de fármacos pueden mostrar también un sinergismo negativo o efectos subaditivos donde la eficacia de la combinación del fármaco es menor de la esperada si los efectos fueran aditivos³¹.

Las interacciones entre fármacos (DDI por sus siglas en inglés) se clasifican en farmacocinéticas, farmacodinámicas, o una combinación de ambas³¹ y químicas.

- **Interacción farmacodinámica**

Son las que se producen en el mecanismo de acción del fármaco, se diferencian en dos tipos a nivel de los receptores o sobre la respuesta de un sistema u órgano efector. Los efectos finales pueden ser debidos a fenómenos de sinergia, antagonismo y o potenciación. Las interacciones pueden ser a nivel de los receptores farmacológicos (antagonismo, agonismo parcial, hipersensibilización y desensibilización de receptores); en los procesos moleculares subsiguientes a la activación de receptores y/o en sistemas fisiológicos distintos que se contrarrestan o se contraponen entre sí.

- **Interacción farmacocinética**

Se deben a modificaciones producidas por el fármaco desencadenante sobre los procesos de absorción, distribución y eliminación del otro fármaco³⁰.

Absorción: la alteración en la absorción gastrointestinal puede deber a cambios en el pH, en la motilidad, la formación de complejos insolubles, interacción con los alimentos y alteraciones en el metabolismo o el transporte por la glicoproteína P a nivel intestinal.

Las modificaciones pueden consistir en una alteración en la velocidad de absorción o en un cambio en la cantidad total de fármaco absorbido, o en ambos efectos a la vez. Puede verse modificado el vaciamiento gástrico y en consecuencia la absorción intestinal. Los fármacos como los opioides ralentizan el proceso y otros procinéticos como la metoclopramida lo aceleran.

Distribución: la competencia por el sitio de unión a proteínas plasmáticas y por ende el aumento en la fracción libre del fármaco desplazado, lleva a un aumento del efecto del fármaco afectado y a una eliminación renal o hepática más rápida. Tal es el caso de los fármacos con alta unión a proteínas y bajo volumen de distribución.

Otro caso de alteración en la distribución ocurre con las sustancias que modifican el pH de la sangre generando variaciones en el grado de ionización que puede alterar la distribución al SNC, por ejemplo.

Las interacciones por cambio en la distribución ocurren cuando un fármaco dificulta la salida o entrada de otro al sitio de acción. Los fármacos inhibidores de la P-gp y otros transportadores de membrana bloquean el transporte de algunos fármacos antineoplásicos hacia el exterior celular, facilitando así su acción en el interior de la célula.

Metabolismo: las enzimas que metabolizan fármacos pueden ser inducidas o inhibidas por

otros fármacos. La estimulación del metabolismo aumenta el aclaramiento y disminuye la concentración en la fase estacionaria y, en consecuencia, la eficacia terapéutica del fármaco afectado. La duración depende de la semivida plasmática del fármaco generador de la interacción y es gradual. El proceso se prolonga en el tiempo con fármacos inductores como el fenobarbital (semivida larga).

La inhibición del metabolismo de un fármaco incrementa su vida media, aumenta la intensidad del efecto y la probabilidad que se generen efectos tóxicos. La inhibición se produce de manera rápida y su máximo se establece cuando el inhibidor alcanza el estado estacionario. Las enzimas mayormente implicadas en interacciones son CYP1A2, CYP2C, CYP2D6 y CYP3A.

Excreción: la interacción tiene lugar principalmente en el mecanismo de transporte en el túbulo renal. Los cambios en el pH de la orina pueden modificar el grado de ionización de los fármacos y alterar los procesos de reabsorción pasiva.

- **Interacción química o farmacéutica**

Se refiere a las incompatibilidades de tipo físico-químico, que impiden mezclar dos o más fármacos en una misma solución. Los servicios de farmacia son indispensables para establecer y preparar correctamente las soluciones que hay que inyectar o infundir³⁰.

1.6.1 Cómo estudiar la interacción farmacocinética de medicamentos

Durante la etapa de desarrollo de un fármaco se lleva a cabo la evaluación del riesgo por interacción con otros fármacos, esta evaluación es útil para diseñar los estudios más adecuados para probar o descartar la interacción por medio de modelo *in silico*, *in vitro* o *in vivo*, en animales o en humanos. También se evalúan las interacciones de los productos comercializados para detectar las señales de riesgo de interacciones que no han aparecido en los ensayos clínicos. Las señales deben comprenderse, monitorizarse, estudiarse y comunicarse en el prospecto del medicamento. Incluso muchos estudios de interacciones pueden realizarse mediante análisis retrospectivos de datos de población, informes de casos o datos *in vitro* adicionales³².

El primer paso en el diseño de un estudio DDI es conocer la farmacocinética y la farmacodinamia de los fármacos implicados: identificar la ruta de eliminación principal; estimar la contribución de las enzimas y transportadores en la distribución del fármaco; y caracterizar su efecto. Es muy importante revisar los antecedentes de interacciones del grupo al que pertenece el nuevo fármaco, se deberá probar que las produce o no como otros miembros del grupo. Posteriormente, hay que detectar la naturaleza de la interacción, es decir, si se trata de una interacción fármaco-fármaco, entre un fármaco y un alimento o bebida (interacción

nutriente-fármaco) o un suplemento (interacción suplemento dietético-fármaco) dado, entre un fármaco y alguna patología del paciente³³.

Luego, será de utilidad la elección del modelo: *in vitro*, *in silico* o *in vivo* junto con toda información sobre la farmacocinética y la dinámica en humanos, así se puede determinar el riesgo potencial de la DDI, qué parámetros farmacocinéticos y dinámicos podrían verse afectados y diseñar el estudio más apropiado³⁴.

La EMA en su guía para la investigación de interacciones entre fármacos, sugiere las simulaciones de farmacocinéticas basadas en modelos fisiológicos (*physiologically based pharmacokinetic, PBPK*). También son de gran valor los estudios farmacocinéticos *in vivo* que consideren los mecanismos de la absorción, distribución y eliminación. En aquellos casos donde se observa una marcada interacción *in vivo* y el mecanismo no es claro, se deben llevar a cabo estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para explicar el mecanismo y predecir interacciones que puedan ocurrir de manera similar³⁵.

La EMA indica que debe tenerse en cuenta los factores extrínsecos que podrían alterar la solubilidad, la absorción y el transporte del fármaco; el metabolismo y las enzimas implicadas en la eliminación pre-sistémica; si tiene metabolitos o no y la implicancia de los transportadores en el proceso de eliminación renal, intestinal y biliar³⁵.

La FDA, en su guía para la industria sobre el estudio de interacciones mediadas por transportadores y el citocromo P450, sugiere que se evalúe el potencial del fármaco como inductor o inhibidor y como sustrato de las enzimas metabolizadoras y de los transportadores P-gp y BCRP, de transportadores hepáticos OATP1B1 y OATP1B3, de transportadores renales como OAT, OCT y MATE. También es necesario evaluar los metabolitos del fármaco víctima en la seguridad y la eficacia, la interacción con medicación concomitante posible a la indicación terapéutica, ya que éstos pueden actuar como perpetradores o sustratos de enzimas metabolizadoras o en transportadores³³.

La elección del modelo animal para estudiar una interacción fármaco-fármaco se basa en las similitudes en cuanto al LADMER (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Respuesta) y también en las características bioquímicas y fisiológicas como son el pH gastrointestinal, la perfusión de los órganos, la expresión de enzimas y transportadores de los tejidos, la unión a proteínas, entre otros³⁶.

Los estudios *in vivo* en animales se llevan a cabo dividiéndolos en grupos de acuerdo con el tratamiento e idealmente habrá un grupo placebo o blanco que recibirá el vehículo sin principio activo. Cuando se desea determinar si el fármaco es perpetrador de algún parámetro farmacocinético del fármaco en estudio, se puede realizar un pretratamiento con el fármaco

sospechoso y luego, teniendo en cuenta la farmacocinética del perpetrador, administrar el fármaco víctima.

En cuanto al régimen de dosificación de los fármacos debe tenerse en cuenta la siguiente propuesta para un sustrato fármaco y el fármaco que interactúa: dosis única / dosis única, dosis única / dosis múltiple, dosis múltiple / dosis única y dosis múltiple / dosis múltiple. La elección entre las propuestas depende de los factores relacionados al fármaco sustrato y al fármaco que interactúa. No sólo hay que tener en cuenta el uso agudo o crónico, sino aspectos de seguridad como si tiene rango terapéutico estrecho, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas³⁷. Antes de iniciar los ensayos en animales, es importante realizar una puesta a punto del método y evaluar y analizar el comportamiento del fármaco en el animal para detectar si se podrá correlacionar con la predicción y con lo observado en humanos³². De acuerdo con el parámetro farmacocinético y el lugar donde ocurre la interacción será de dónde se tomarán las muestras para analizar.

Se han desarrollado una variedad de sistemas y modelos informativos *in silico* y de laboratorio para predecir la exposición a medicamentos y las interacciones medicamentosas en humanos³⁸. Si bien los estudios de simulación han disminuido el número de nuevas entidades químicas que fracasan en los ensayos clínicos, todavía se reconoce que la predicción de la disposición de fármacos a partir de datos *in vitro* e *in silico* necesita una mejora fundamental³⁹. Los estudios en animales para la evaluación preclínica de las posibles interacciones fármaco-fármaco se ven obstaculizados por las diferencias significativas de especies en el metabolismo y la consiguiente diferencia en la fracción de fármaco metabolizado. La humanización del algún citocromo P450 individual o incluso para grupos enteros no resuelve el problema de los efectos de las enzimas de otras subfamilias de P450⁴⁰.

Por último, los datos obtenidos de los estudios *in vitro* generalmente se encuentran en la sección de farmacocinética y rara vez se incluye en otra sección del prospecto o de la información para el prescriptor. De no ser suficiente o no contar con información clínica para incluir en el prospecto, el patrocinador debe incluir la información de los estudios *in vitro* tal como la caracterización del mecanismo metabólico y de transporte implicados como así también interacciones farmacocinéticas entre el fármaco y otros fármacos de venta libre o bajo receta, con otras clases de fármacos, suplementos dietarios, alimentos o bebidas incluyendo características de la inhibición, inducción o genéticas si es clínicamente significativo³⁶.

Los resultados hallados en los ensayos *in vitro* como se dijo anteriormente, ayudan a determinar la necesidad de ensayos clínicos en humanos y brindan información valiosa acerca de lo que podría esperarse. En este trabajo se recorre el camino inverso de la clínica a la básica.

2. Materiales y Métodos

2.1 Simulación de la interacción

Se realizaron simulaciones *in silico* de la posible interacción entre la quinidina y el topiramato, utilizando una aplicación disponible *on line*:

- **DDI-Pred** (<http://way2drug.com/ddi/index.php>)⁴¹, es un servicio web de acceso libre para la predicción de interacciones entre fármacos, que se basa en la tecnología PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) y GUSAR (*General Unrestricted Structure Activity Relationships*). La predicción PASS usa un clasificador *naïve* Bayes avanzado y estima los perfiles probables de actividad biológica, apoyándose en su estructura química y en la relación estructura-actividad⁴¹.

2.2 Estudio en un modelo animal

2.2.1 Fármacos

El topiramato y el sulfato de quinidina se obtuvieron de la Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A (Buenos Aires, Argentina). Para la administración en los animales, los fármacos se diluyeron en una solución acuosa de solución fisiológica y dimetilsulfóxido (DMSO). En el caso de la acetazolamida, ésta se diluyó en agua previo a la administración.

2.2.2 Animales

Se utilizaron ratones cepa FB1 hembras y machos, peso entre 20 y 30 gramos provistos por el Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria, Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento previo al experimento.

Los fármacos se administraron por vía intraperitoneal (ip) en los tiempos indicados según protocolo. Las muestras de sangre de los ratones se extrajeron por desangrado luego de la decapitación y punción arterial en el ojo, utilizando capilares heparinizados.

2.3 Diseño farmacocinético

2.3.1 Protocolo de elección de dosis

Se realizó un experimento piloto para encontrar la dosis adecuada de quinidina que permitiera su determinación por HPLC-UV. Se administró a los ratones la quinidina en dosis de 15 mg/kg y 30 mg/kg, ip. Se tomaron las muestras de sangre a los 15 y a los 40 minutos luego de la administración de quinidina. La sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se separó el plasma que se almacenó a -70°C hasta su análisis.

2.3.2 Protocolo de estudio de la interacción topiramato-quinidina

Se realizó el pretratamiento con una dosis única de topiramato 50 mg/kg, ip, 15 minutos antes de la administración de quinidina 30 mg/kg, ip. Los ratones fueron sacrificados a los 10, 30 y 60 minutos. En ambas etapas las muestras de sangre fueron tomadas al momento del sacrificio.

2.3.3 Protocolo de estudio de la interacción acetazolamida-quinidina

En este protocolo, los ratones fueron pretratados con una dosis de acetazolamida de 100 mg/kg, ip, 30 minutos antes de la administración de quinidina 30 mg/kg, ip. Las muestras de sangre fueron tomadas al momento del sacrificio a los 15, 30 y 60 minutos

2.3.4 Análisis farmacocinético

Para el análisis farmacocinético de la concentración de quinidina en plasma en función del tiempo, se utilizó el programa PKsolver (programa agregado al Microsoft Excel), considerando un modelo farmacocinético de distribución monocompartimental y eliminación de primer orden. A partir de las curvas promedio de cada tratamiento se obtuvieron la C_{max}, T_{max}, AUC_(0-t) y AUC_(0-inf), T_{1/2}, Cl/F y Vd/F.

Además, para cada tratamiento, con los replicados se calcularon las AUC_(0-t), error estándar y el intervalo de confianza (95 %). Se realizaron las comparaciones con Test t a posteriori usando el programa GraphPad Prism, versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

2.4 Dosaje de quinidina

2.4.1 Equipo y condiciones cromatográficas

La determinación de quinidina en plasma se llevó a cabo por técnica de estándar interno (propranolol) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un espectrofotómetro UV (Kravetz, 2018)⁴².

Las condiciones cromatográficas fueron: una columna de fase inversa Phenomenex Kinetex XB-C 100 A (150x4,6 mm de diámetro y tamaño de partícula 2,6 μ) a 50°C, el solvente de elución fue una solución buffer fosfato 10mM (pH 3,5): acetonitrilo (75:25) en condiciones isocráticas y flujo de 0,8 ml/min. La fase móvil (FM) fue filtrada utilizando un filtro millipore cada día para eliminar posibles impurezas y gases que pudieran interferir. El equipo de HPLC cuenta con un desgasificador mediante el cual elimina los gases que pudiesen contener los solventes de elución antes de ingresar en la columna. La detección del UV se realizó a una longitud de onda de 225 nm.

El tiempo de corrida total fue de 12 minutos, siendo el tiempo de retención para la quinidina a los 3,9 minutos y del propranolol a los 7,5 minutos, no hubo interferencias durante la elución de ambos compuestos.

Una vez que la corrida finaliza, la columna permanece guardada con una concentración agua-acetonitrilo 50:50 ya que la FM cuenta con acetonitrilo y una solución acuosa de fosfato. Al comenzar el ensayo se parte de esa relación y con un flujo 0,2 ml/min y se comienza a aumentar sin cambiar la proporción de solvente. Luego se cambia la proporción entre ambos solventes hasta llegar al flujo y la proporción óptima para la separación cromatográfica.

2.4.2 Validación del método analítico

La validación del método de HPLC-UV para cuantificar quinidina en suero humano fue desarrollado por Kravetz y col. (2018)⁴², en el Laboratorio de Monitoreo Terapéutico de Fármacos, Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Para el dosaje se utilizó el método del estándar interno utilizando una solución de propranolol, que se añadió a una solución de plasma con concentración conocida de quinidina y se extrajo con una solución de ciclohexano. La fase orgánica se evaporó a sequedad y luego se re-disolvió en fase móvil y se inyectó una alícuota en el HPLC. Las condiciones cromatográficas fueron las anteriormente descriptas.

La validación se realizó en concordancia con la Guía de la FDA de Estados Unidos para la validación de métodos bioanalíticos de la industria. Los parámetros de validación estudiados fueron especificidad, linealidad, límite de cuantificación (LOQ), límite de detección (LOD), repetibilidad, precisión, sensibilidad y estabilidad (Tabla 1)⁴².

TABLA 1. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC UTILIZADO PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR QNC

Parámetro	Resultado
Especificidad	No se encontraron interferencias
Linealidad	0.5-8.0 mcg/m
LOQ	0,5 mcg/ml
LOD	0,1 mcg/ml
Precisión	<10% CD
Estabilidad	Estable 24 horas a 4°C, una semana a -20°C y un mes a -80°C

- Reactivos y soluciones: como se indicó anteriormente los reactivos son de calidad HPLC.
 - ➔ Quinidina: polvo blanco cristalino, inodoro, comprado a Droguería Saporiti, lote 6283, con un 100,5 % de pureza sobre base seca
 - ➔ Propranolol: clorhidrato de propranolol, polvo blanco cristalino, comprado al Instituto Nacional de Medicamentos (INAME), pureza 100,5% sobre base seca.

- Acetazolamida: acetamida cristalina, marca Sigma Chemical Company, N°A-6011, lote I22F-0140, origen Estados Unidos.
- Solución fisiológica: solución isotónica de cloruro de sodio, marca Rivero.
- Acetonitrilo: marca Sintorgan, lote 40636, título 95,3%.
- Solución buffer fosfato de potasio: potasio fosfato monobásico p.m. 136.09, marca Cicarelli, lote 27957, origen Argentina.
- Equipos
 - Balanza analítica: marca Ohaus.
 - Agitador magnético con buzo.
 - pH-metro: marca Denver Instrument modelo UB-10.
 - Vórtex: marca Biotraza.
 - Sistema de purificación de las soluciones para eluir: bomba de vacío, trampa de vacío, Erlenmeyer, filtro milipore 0,45 nm.
 - Equipo HPLC acoplado a un espectrofotómetro UV marca Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000.

ANEXO I: Espectros de absorción UV

ANEXO II: Determinación de QND en ratones por HPLC (experimentos)

3. Resultados

3.1 Estudios de predicción *in silico*: DDI-Pred

Se buscó en PubMed las interacciones para la quinidina reportadas en bibliografía con las palabras claves en inglés “*drug interaction with quinidine*” y “*drug-drug interaction with quinidine*”. Se obtuvieron entre 1.076 y 1.250 resultados de trabajos publicados desde 1946 hasta junio 2021. También se buscó para el topiramato manteniendo las mismas consignas “*drug interaction with topiramate*” y “*drug-drug interaction with topiramate*”, se obtuvieron 550 resultados de trabajos publicados entre 1993 y junio 2021. También se exploró sin éxito en buscadores informales como Google. No se encontró ningún reporte de la interacción entre la quinidina y el topiramato.

Se utilizó una página web de simulación *in silico*⁴¹ para la interacción QND más TPM. Los resultados de la predicción PASS se presentan como una lista clasificada de varias actividades biológicas con las probabilidades calculadas: Pa ("estado activo") y Pi ("estado inactivo")⁴³. La precisión promedio de la predicción estimada en el procedimiento de *leave-one-out- cross-validation* es de aproximadamente el 95%, este es un método interactivo que se inicia empleando como un conjunto de todas las observaciones disponibles excepto una, que se excluye para emplearla como validación. Las actividades más probables son aquellas predichas con el valor máximo $\Delta P = Pa - Pi$.

Los resultados de la predicción para la interacción QND y TPM se muestran en la Tabla 2. El ΔP da negativo para las predicciones de los CYP3A4, CYP2C8, CYP2C19, CYP2B6, CYP2C9, CYP1A2 y CYP2D6, se concluye que estas enzimas no están involucradas en la posible interacción entre ambos fármacos.

TABLA 2. PREDICCIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE QUINIDINA Y TOPIRAMATO PARA LAS ISOFORMAS DEL CITOCROMO P450

Isoforma CYPs	Pa	Pi	ΔP
Interacción CYP3A4	0,032	0,371	-0,339
Interacción CYP2C8	0,003	0,656	-0,653
Interacción CYP2C19	0,030	0,920	-0,890
Interacción CYP2B6	0,009	0,917	-0,908
Interacción CYP2C9	0,001	0,926	-0,925
Interacción CYP1A2	0,001	0,948	-0,947
Interacción CYP2D6	0,001	0,959	-0,950

3.2 Estudios en animales

3.2.1 Definición de dosis y tiempos

Se realizó un experimento piloto en ratones para la elección de la dosis y el tiempo de administración de quinidina, tal que la dosis elegida permitiera determinar las concentraciones plasmática a distintos tiempos por HPLC desarrollada por Kravetz y col., 2018.

Se administró quinidina 15 y 30 mg/kg, ip, a ratones hembra (4) y se extrajo sangre a los 15 y 40 minutos. La concentración de quinidina plasmática promedio a los 15 minutos en los animales (2) que recibieron 15 mg/kg fue 1,3 mcg/ml. Para la dosis de 30 mg/kg, ip, luego de 15 minutos administrada la quinidina, la concentración plasmática fue de 2,3 mcg/ml y luego de los 40 minutos fue de 1,2 mcg/ml.

A partir de los resultados de la dosis de 30 mg/kg, se calculó la semivida de eliminación de la quinidina que fue de 25 minutos. Con estos resultados se decidió usar la dosis de quinidina de 30 mg/kg y tiempos de muestreo a los 10 ó 15, 30 y 60 minutos para construir la curva de concentración plasmática de quinidina en función del tiempo.

3.2.2 Efectos del topiramato sobre la farmacocinética de la quinidina

Para estudiar la interacción farmacocinética de la quinidina y el topiramato en ratones (machos), los dos grupos de estudio fueron: QND 30 mg/kg, extracción de sangre a los 10, 30 y 60 min y el grupo pretratado con TPM 50 mg/kg y QND 30 mg/kg 15 minutos después y extracción igual que al otro grupo. En la Tabla 3 se muestran los resultados de las

concentraciones plasmáticas de los 2 grupos y en la Figura 4 la curva de concentración en función del tiempo para cada grupo (n=4-5 ratones para cada tiempo).

TABLA 3. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA PARA LOS DOS TRATAMIENTOS

Tiempo (min)	Concentración plasmática de QND (mcg/mL)													
	QND					Media	Desvío estándar	QND + TPM					Media	Desvío estándar
10	3,1	3	2,3	2,8	1,9	2,6	0,5	3,6	3,6	2,8	3,6	3,0	3,3	0,4
30	2	2	1,7	1,3	2,3	1,9	0,8	2,0	2,7	2,7	2,1	4,0	2,7	0,8
60	BQL	0,8	1,0	1,1	1,1	1,0	0,1	2,3	1,4	1,6	1,2	1,2	1,5	0,5

Nota: (cada valor es el resultado de un ratón).

BQL: (*Below Quantification Limit*) por debajo del límite de cuantificación.

En la **Figura 4**, se observa que la curva para QND + TPM tiene un área bajo la curva mayor que para el tratamiento con sólo QND. Esta observación indica que los ratones tuvieron mayor disponibilidad de QND en el grupo tratado previamente con TPM.

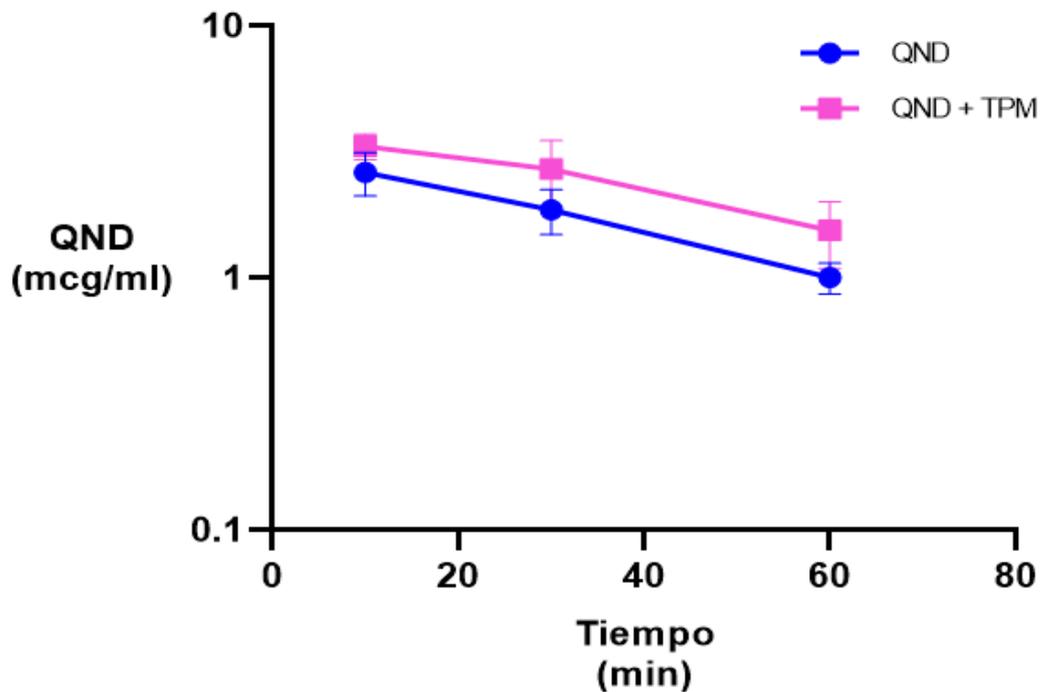


FIGURA 4. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA PROMEDIO DE QUINIDINA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (N=4-5 RATONES POR TIEMPO)

Para la estimación de los parámetros farmacocinéticos, se analizaron las curvas promedio por un método no compartamental, considerando que la quinidina tiene una cinética de eliminación de primer orden. En la Tabla 4 se muestran los parámetros farmacocinéticos de los dos grupos. La constante de eliminación (K_e) para el grupo tratado con QND tuvo un valor de 0.019 min^{-1} , y para el grupo tratado con QND más TPM fue 0.016 min^{-1} , el $T_{1/2}$ fue 35,7 y 44 min, respectivamente. Las AUC_{0-t} y $AUC_{0-t\infty}$ fueron mayores para la administración conjunta con TPM en 1.4 y 1.8 veces, respectivamente. Esto indicaría que los ratones tratados con topiramato tuvieron mayor biodisponibilidad de quinidina. Se observó un menor V_d/F para el tratamiento en conjunto y el Cl/F disminuyó para este mismo grupo, acorde al aumento de la biodisponibilidad.

TABLA 4. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA LOS DOS TRATAMIENTOS

Parámetro	QND	QND + TPM	Porcentaje de cambio (%)
Ke (1/min)	0,019	0,016	16
$T_{1/2}$ (min)	35,7	44,3	+ 24
C _{máx} (mcg/mL)	2,62	3,32	+ 27
AUC 0-t (mcg/mLxmin)	100,8	140,0	+ 40
AUC 0-Inf (mcg/mLxmin)	152,41	238,9	+ 57
V _d /F (mL)	10,16	8,03	21
Cl/F (mL/min)	0,20	0,13	35

Nota: los porcentajes indicados con un signo + muestran el incremento en el porcentaje de cambio.

Se calculó el AUC_{0-t} por el método de los trapecios para ambos tratamientos, con sus intervalos de confianza y su posterior comparación estadística por el Test t, en la Tabla 5 se muestra los valores y diferencia significativa entre los dos grupos ($p = 0.0012$).

TABLA 5. COMPARACIÓN DE AUC_{0-T}

	QND	QND+TPM
AUC (mcg/mLxmin)	87,70	123,80*
Error Estándar	8,75	16,38
Intervalo de Confianza 95%	70,54 -104,9	91,69 - 155,9

* $p=0.0012$

Estas observaciones indican que existe una interacción entre ambas drogas en este modelo animal, que afecta la disponibilidad de la quinidina cuando es administrada luego de 15 minutos del topiramato.

3.2.3 Estudio con un inhibidor de la anhidrasa carbónica

La alcalización de la orina por la acción del topiramato por inhibir la anhidrasa carbónica sería responsable de los cambios plasmáticos de quinidina más topiramato, se decidió estudiar el efecto de la acetazolamida (AZA), un inhibidor selectivo y potente de la AC en la farmacocinética de la quinidina.

Con un esquema similar al protocolo anterior, se administró a ratones (hembras) AZA 100 mg/kg ip, 30 minutos antes de la administración de quinidina 30 mg/kg. Se sacrificaron los ratones a los 15, 30 y 60 minutos desde la administración de la quinidina. Al momento del sacrificio se tomaron las muestras de sangre y se procedió al dosaje de quinidina (ver Tabla 6). Se calcularon los valores promedios para cada tiempo (n = 4-5 ratones).

TABLA 6. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE QUINIDINA PARA LOS DOS TRATAMIENTOS

Tiempo (min)	Concentración plasmática de QND (mcg/mL)													
	QND						Media	Desvío estándar	QND + AZA				Media	Desvío estándar
15	2,1	2,5	BLQ	2,6	0,6*	2,4	0,2	1,7	3,7	2,8	2,6	3,8	2,9	0,9
30	1,6	2,6	2,7	1,7	2,1	2,14	0,5	2,3	2,7	3,1	1,6	BQL	2,4	0,6
60	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9	0,8	0,1	1,3	1,4	0,9	0,9	1,0	1,1	0,2

Nota: (cada valor es el resultado de un ratón).
 BQL: por debajo del límite de cuantificación.
 0,6*: valor que difiere 2 veces con la media, fue descartado como *outlier*.

En la Figura 5 se observan las curvas de concentraciones plasmáticas de quinidina en función del tiempo para los dos tratamientos, la curva de quinidina está por debajo de la curva del tratamiento QND más AZA.

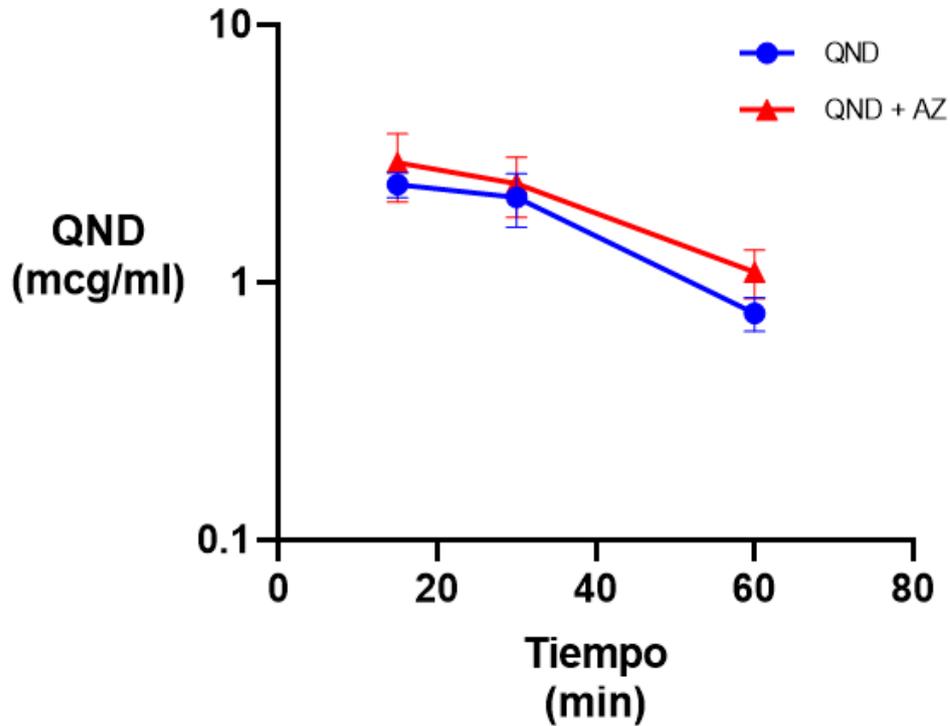


FIGURA 5. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA PROMEDIO DE QUINIDINA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos (ver Tabla 7), la constante de eliminación para los ratones tratados con quinidina fue de $0,027 \text{ min}^{-1}$ y de $0,022 \text{ min}^{-1}$ para el grupo de los ratones que recibieron QND+AZA, el $T_{1/2}$ tuvo un valor de 25,8 y de 31 minutos, respectivamente. Las $AUC_{(0-t)}$ y $AUC_{(0-t=\infty)}$ fueron 1.2 y 1.3 veces mayor, para QND+AZA que para QND sola.

TABLA 7. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA LOS DOS TRATAMIENTOS

Parámetro	QND	QND + AZA	Porcentaje de cambio (%)
Ke (1/min)	0,027	0,022	19
T _{1/2} (min)	25,8	31	+ 16
C _{máx} (mcg/mL)	2,4	2,92	+ 22
AUC _(0-t) (mcg/mLxmin)	95,5	114,98	+ 20
AUC _(0-inf) (mcg/mLxmin)	123,87	164,16	+ 33
Vd/F (mL)	9,03	8,17	10
Cl/F (mL/min)	0,24	0,18	25

Nota: los porcentajes indicados con el signo + muestran el incremento en el porcentaje de cambio

Se calcularon las AUC_(0-t), error estándar e intervalos de confianza, y se compararon estadísticamente con el test T, como se describió anteriormente el resultado no demostró una diferencia significativa (p=0,1539), pero una tendencia a mayor disponibilidad de la quinidina con el tratamiento que incluye AZA

TABLA 8. COMPARACIÓN DE AUC_{0-T}

	QND	QND+AZA
AUC (mcg/mLxmin)	77,55	83,40*
Error estándar	8,83	19,87
Intervalo de Confianza 95%	60,24 a 94,86	44,46 a 122,30

*p=0,1539

Si bien las diferencias no fueron significativas, hay una tendencia a una mayor disponibilidad de la quinidina con el tratamiento que incluye AZA.

4. Discusión y conclusiones

En la investigación médica aplicada, los parámetros farmacocinéticos calculados en estudios en animales se utilizan para predecir la farmacocinética en los humanos, mediante el escalado alométrico entre especies⁴⁴. En esta tesina, se recorrió el camino inverso, a partir de un caso clínico (Kravetz y col., 2021), se estudió la posible interacción farmacocinética entre la quinidina y el topiramato en dos modelos preclínicos: uno predictivo en un simulador *in silico* y uno *in vivo* en un modelo animal.

En el sitio web Drugs.com que brinda información con fines educativos sobre más de 24.000 fármacos de prescripción, venta libre y productos naturales no se encontró ningún informe sobre la interacción entre la QND y el TPM²¹. En el sitio *Drugbank* se encontró una posible interacción de severidad moderada para la combinación de topiramato con quinidina, que indica un aumento del riesgo de hipertermia y oligohidrosis^{27,45}. Si bien la falta de reportes publicados no indica que no exista interacción alguna, se simuló en un modelo predictivo, la posible interacción farmacocinética a nivel de las enzimas del citocromo P450⁴¹. El resultado de la predicción permitió descartar esta posibilidad. Aun cuando se ha descrito que el topiramato puede ser un inductor enzimático débil en dosis mayores a 200 mg por día⁴⁶ y también que tiene actividad inhibitoria sobre el CYP2C19, pero no tiene actividad sobre el CYP3A4 que es la isoforma por la cual se metaboliza mayoritariamente la QND. La bibliografía apoya los resultados obtenidos en la predicción sobre el metabolismo.

En este trabajo se realizó un ensayo piloto de elección de la dosis y los tiempos de extracción de sangre para describir la farmacocinética de la quinidina en ratones y evaluar la hipótesis formulada. La dosis elegida de quinidina fue 30 mg/kg, ip^{47,48}, y se observó un tiempo de semivida de eliminación para la quinidina de 25 minutos, que determinó los tiempos de muestreo del protocolo para estudiar la farmacocinética de quinidina administrada luego de topiramato. Se diseñó un protocolo de muestreo de sacrificio en serie obteniendo sólo una muestra de sangre por animal para el tiempo de interés⁴⁴. El diseño clásico de datos completos, donde en cada animal se muestrean todos los tiempos, generalmente sólo es aplicable para animales grandes utilizando el enfoque tradicional de dos etapas. La primera etapa implica la estimación de los parámetros farmacocinéticos para cada animal por separado y la segunda etapa utiliza las estimaciones de parámetros individuales para la inferencia estadística. En el caso de los ratones el muestreo de sangre está restringido, se puede aplicar el diseño del lote o de sacrificio en serie⁴⁹.

El grupo de ratones que recibieron topiramato 15 minutos antes de la quinidina mostró un aumento significativo de la biodisponibilidad en un 40 %. Este efecto del topiramato es en agudo, un mecanismo que implica cambio rápido de la concentración. Esto concuerda con la alteración de la AC y cambios en el pH urinario que podría ser la causa del aumento de AUC.

Esto llevó a la hipótesis de la interacción por la alteración en la eliminación renal, porque se sabe que el topiramato es un inhibidor de la anhidrasa carbónica y provoca el aumento del pH urinario. Se han descrito algunos casos como el de una mujer con migraña tratada con topiramato

150 mg/día que presentó acidosis tubular renal mixta asociada al tratamiento. El pH urinario fue de 6,0 con una brecha aniónico-urinaria positiva como resultado de la disfunción tubular causada por la inhibición de la anhidrasa carbónica⁵⁰. En otra publicación, se asoció un aumento del pH urinario por la inhibición de la AC renal en el 78 % de los voluntarios sanos tratados con topiramato en comparación con los placebos. El tratamiento con topiramato aumenta la excreción urinaria de bicarbonato, causa acidosis metabólica sistémica, excreción de citrato urinario y un aumento significativo del pH urinario⁵¹. Para probar la hipótesis de cambios en el pH, se estudió la farmacocinética de la quinidina previo a la inhibición de la AC con acetazolamida (100 mg/kg) y verificar si otro fármaco con este mecanismo el mismo efecto. Se eligió la dosis de 100 mg/kg, ip de AZA que se administró 30 minutos antes de quinidina, porque otros autores demostraron cambios en la eliminación de los barbitúricos por acidificación del plasma y alcalinización de la orina con esta dosis y tiempo⁵². Los resultados obtenidos en la farmacocinética en ratones en el grupo de QND + AZA sólo demostraron una tendencia a aumentar el AUC (+ 20 %) no significativa. Si bien la dosis de AZA 100 mg/kg es utilizada en ratones por varios autores^{52,53}, es posible que en esta cepa de ratones la dosis para inhibir a la AC sea otra. Por otra parte, el tiempo de administración previo a la QND también se eligió de acuerdo con los resultados de Sato y col., pero puede no ser suficiente o ser excesivamente mayor para ver el cambio del pH urinario, la realización de próximos estudios con dosis y tiempos diferentes ayudarán a definir el efecto de la AZA en eliminación renal de la quinidina en esta cepa de ratones. La bibliografía reporta pocos casos de interacción moderada con la quinidina²¹, por reducir su excreción urinaria, aumento de la concentración plasmática, la actividad terapéutica y los efectos tóxicos⁵⁴. Por la disponibilidad durante la pandemia, los experimentos con topiramato y acetazolamida se utilizaron ratones de distinto sexo, esto podría generar diferencias en los resultados que habría que explorar, porque existe un antecedente de mayor sensibilidad del efecto letal de la quinidina en los ratones hembra que en los machos⁵⁵, que no tiene significancia clínica

Entre los estudios de las interacciones de fármacos en preclínica también se evalúan los diferentes transportadores. Sería de interés evaluar la implicancia de los transportadores OATP en la eliminación de quinidina en modelos de ratones transgénicos, aun cuando no se encuentran fácilmente disponibles y el costo es alto. El uso de estos ratones puede mejorar la calidad de la evaluación preclínica en el desarrollo de fármacos y proporciona información valiosa sobre los mecanismos subyacentes de la DDI⁵⁶. Como la quinidina es sustrato e inhibidor y el topiramato es inhibidor de la P-gp, podrían competir, para descartar la

competencia entre los fármacos se deberá estudiar la proteína P-gp en modelos *in vitro* de células CACO-2 o en líneas celulares MDR1 transfectadas⁵⁷.

En el caso informado por Kravetz y col., no se pudo suspender el topiramato perdía el control de las crisis, queda pendiente el estudio de la interacción farmacodinámica del sinergismo en un modelo. Para ello se deberá estudiar con modelos animales de convulsiones que ejemplifique la EPMI.

Conclusión: el estudio de las DDIs implica ensayos preclínicos y clínicos, en este trabajo se han realizado dos estudios que incluye la simulación con el metabolismo y la acción del topiramato en agudo sobre la farmacocinética de quinidina en ratones. El topiramato en agudo afecta la biodisponibilidad de la quinidina en el modelo estudiado. No se puede descartar el compromiso de la inhibición de la AC, quedan varias posibilidades para seguir estudiando esta interacción.

5. Bibliografía

- ¹ Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, H., Elger, C. E., Engel Jr, J., Forsgren, L., French, J. A. (2014). *ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy*. *Epilepsy*, 55:475–482.
- ² Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., Zuberi, S. M. (2017). *ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology*. *Epilepsy*, 58 (4): 512-521. DOI: 10.1111/epi.13709.
- ³ Perucca, P., Scheffer, I. E., Kiley, M. (2018). *The management of epilepsy in children and adults*. *The Medical Journal of Australia*, 208 (5): 226-233. DOI: 10.5694/mja17.00951.
- ⁴ Ryvlin, P., Cross, J. H., Rheims, S. (2014). *Epilepsy surgery in children and adults*. *Lancet Neurology*, 13 (11): 1114-1126. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70156-5.
- ⁵ D'Andrea Meira, I., Romão, T. T., Pires do Prado, H. J., Krüger, L. T., Pires, M., & da Conceição, P. O. (2019). Ketogenic Diet and Epilepsy: What We Know So Far. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00005>.
- ⁶ Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V. R., Brown, M. R., Langouet, M., Chen, H., Kronengold, J., Abhyankar, A., Cilio, R., Nitschke, P., Kaminska, A., Boddaert, N., Casanova, J.L., Desguerre, I., Munnich, A., Dulac, O., Kaczmarek, L.K., Colleaux, L., Nabbout, R. (2012). *De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy*. *Nature Genetics*, 44 (11), 1255-9. DOI: 10.1038/ng.2441.
- ⁷ Numis, A.D., Nair, U., Datta, A.N., Sands, T.T., Oldham, M.S., Patel, A., Li, M., Gazina, E., Petrou, S., Cilio, M.R. (2018). *Lack of response to quinidine in KCNT1-related neonatal epilepsy*. *Epilepsia*, 59:1889-1898. DOI: 10.1111/epi.14551.
- ⁸ Yoshitomi, S., Takahashi, Y., Yamaguchi, T., Oboshi, T., Horino, A., Ikeda, H., Imai, K., Okanishi, T., Nakashima, M., Saito, H., Matsumoto, N., Yoshimoto, J., Fujita, T., Ishii, A., Hirose, S., Inoue, Y. (2019). *Quinidine therapy and therapeutic drug monitoring in four patients with KCNT1 mutations*. *Epileptic Disor*, 21 (1): 48-54. DOI: 10.1684/epd.2019.1026.
- ⁹ Dilena, R., DiFrancesco, J. C., Soldovieri, M. V., Giacobbe, A., Ambrosino, P., Mosca, I., Galli, M. A., Guez, S., Fumagalli, M., Miceli, F., Cattaneo, D., Darra, F., Gennaro, E., Zara, F., Striano, P., Castellotti, B., Gellera, C., Varesio, C., Veggiotti, P., Tagliatela, M. (2018). *Early Treatment with Quinidine in 2 Patients with Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures (EIMFS) Due to Gain-of-Function KCNT1 Mutations: Functional Studies, Clinical Responses, and Critical Issues for Personalized Therapy*. *Neurotherapeutics*, 15 (4), 1112-1126. DOI: 10.1007/s13311-018-0657-9.

-
- ¹⁰ Caraballo, R., Pasteris, M. C., Fortini, P. S., Portuondo, E. (2014). *Epilepsy of infancy with migrating focal seizures: six patients treated with bromide*. *Seizure*, 23 (10), 899–902. DOI: 10.1016/j.seizure.2014.06.016.
- ¹¹ Caraballo, R., Noli, D., Cachia, P. (2015). *Epilepsy of infancy with migrating focal seizures: three patients treated with the ketogenic diet*. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 17(2), 194–197. DOI: 10.1684/epd.2015.0741.
- ¹² Mullen, S. A., Carney, P. W., Roten, A., Ching, M., Lightfoot, P. A., Churilov, L., Nair, U., Li, M., Berkovic, S. F., Petrou, S., Scheffer, I. E. (2018). *Precision therapy for epilepsy due to KCNT1 mutations: A randomized trial of oral quinidine*. *Neurology*, 90(1): e67-e72. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004769.
- ¹³ Kravetz M.C., Viola M. S., Prenz J., Curi M., Bramuglia G.F., Tenenbaum S.N. (2021). *Case Report of novel genetic variant in KCNT1 channel and pharmacological treatment with quinidine*. *Precision medicine in refractory epilepsy*. *Frontiers in Pharmacology*, 12:648519. DOI: 10.3389/fphar.2021.648519.
- ¹⁴ Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., Knollmann, B. C. (2018). *Fármacos antiarrítmicos*. Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (13 Ed). Editorial McGraw-Hill.
- ¹⁵ Milligan, C. J., Li, M., Gazina, E. V., Heron S. E., Nair, U., Trager, C., Reid, C. A., Venkat, A., Younkin, D P., Dlugos, D. J., Petrovski, S., Goldstein, D. B., Dibbens, L. M., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Petrou, S. (2014). *KNCT1 gain-of-function in two epilepsy phenotypes is reversed by quinidine*. *Annals of Neurology*, 75 (4): 581-590. DOI: 10.1002/ana.24128.
- ¹⁶ Jia, Y., Lin, Y., Li, J., Li, M., Zhang, Y., Hou, Y., Liu, A., Zhang, L., Li, L., Xiang, P., Ye, J., Huang, Z., Wang, Y. (2019). *Quinidine Therapy for Lennox-Gastaut Syndrome with KCNT1 Mutation*. A Case Report and Literature Review. *Front. Neurol.* 10:64. DOI: 10.3389/fneur.2019.00064.
- ¹⁷ Ueda, C. T., Makoid, M. C. (1979). *Quinidine and dihydroquinidine interactions in human plasma*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(4):448-50. DOI: 10.1002/jps.2600680414.
- ¹⁸ Ochs, H. R., Greenblatt, D. J., Woo, E. (1980). *Clinical pharmacokinetics of quinidine*. *Clinical Pharmacokinetics*, 5(2):150-68. DOI: 10.2165/00003088-198005020-00003.
- ¹⁹ Wooding-Scott, R. A., Smalley, J., Visco, J., Slaughter, R. L. (1988). *The pharmacokinetics and pharmacodynamics of quinidine and 3-hydroxyquinidine*. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 26(4), 415–421. DOI:10.1111/j.1365-2125.1988.tb03400.x.
- ²⁰ Knollmann, B. C & Roden, D. M. *Fármacos antiarrítmicos*. (2019). En Goodman & Gilman. (13ª Ed). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Mc Graw Hill Education.
- ²¹ Drugs.com. (s.f.). *Drug interaction report*. Recuperado el 28 de Junio de 2021 https://www.drugs.com/interactions-check.php?drug_list=1981-0,2216-0&types%5B%5D=major&types%5B%5D=minor&types%5B%5D=moderate&types%5B%5D=food&types%5B%5D=therapeutic_duplication&professional=1.

-
- ²² Grace, A. A., Camm, A. J. (1998). *Quinidine*. New England Journal of Medicine, 338 (1), 35–45. DOI:10.1056/nejm199801013380107.
- ²³ Hager, W. D., Fenster, P., Mayersohn, M., Perrier, D., Graves, P., Marcus, F. I and Goldman, S. (1979). Digoxin-Quinidine interaction. Pharmacokinetic evaluation. The New England Journal of Medicine. 300 (22): 1238-1241. DOI: 10.1056/nejm197905313002202
- ²⁴ López Gastón, O., Pastorino, M. L, Alfonso, A., Varela, J., Giannaula, R. (2009). *Topiramato e inhibición de la anhidrasa carbónica*. Revista de Nefrología Diálisis y Trasplante, 29 (2): 69-73.
- ²⁵ Sachdeo, R. C. (1998). *Topiramate. Clinical profile in epilepsy*. Clinical Pharmacokinetics, 34 (5): 335-46. DOI: 10.2165/00003088-199834050-00001.
- ²⁶ Perucca, E. (1996). *Pharmacokinetic profile of topiramate in comparison with other new antiepileptic drugs*. Epilepsia, 37 (2): S8-S13. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1996.tb06032.x.
- ²⁷ NDA 020505-S-050 Topamax (*Topiramate*) oral tablets (25mg, 50mg, 100mg and 200mg). NDA 020844-S-041 Topamax (*Topiramate*) sprinkle capsules (15mg and 25 mg). (2012). FDA Approved Labeling Text. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020844s041lbl.pdf. Recuperado el 11 de agosto de 2021.
- ²⁸ Perucca, E. (1999). *Antiepileptic drugs*. En J. K Aronson (Ed.), Side effects of drugs (Annual., Vol. 22, pp.81-96). Elsevier Science B.V.
- ²⁹ Rosenfeld, W. E., Doose, D. R., Walker, S. A., Nayak, R. K. (1997). *Effect of Topiramate on the Pharmacokinetics of an Oral Contraceptive Containing Norethindron and Ethinyl Estradiol Patient with Epilepsy*. Epilepsia, 38 (3): 317-323.
- ³⁰ Cos de M. A. (2008). *Interacciones de fármacos y sus implicancias clínicas*. En Flórez, J. (5 Ed). Farmacología Humana. Editorial Masson S.A.
- ³¹ Blumenthal, D. K. (2018). *Farmacodinámica: mecanismos moleculares de la acción de los fármacos*. En Goodman & Gilman. (13ª Ed). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Mc Graw Hill Education.
- ³² Tornio, A., Filppula, A. M., Niemi, M., & Backman, J. T. (2019). *Clinical Studies on Drug-Drug Interactions Involving Metabolism and Transport: Methodology, Pitfalls, and Interpretation*. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 105 (6), 1345–1361. DOI: 10.1002/cpt.1435.
- ³³ Lynch, S.S., (2019). Interacciones farmacológicas. Manual MSD, Versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es-ar/professional/farmacolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica/factores-que-afectan-la-respuesta-a-los-f%C3%A1rmacos/interacciones-farmacol%C3%B3gicas?query=Interacciones%20farmacol%C3%B3gicas>. Recuperado el 13 de mayo de 2021.
- ³⁴ *In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry*. US Department of Health and Human Services of the

Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Clinical pharmacology. (2020). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>.

³⁵ *Guideline on the Investigation of Drug Interactions*. Committee for human medicinal products (CHMP) of the European Medicines agency (EMA). Doc. Ref. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1. (2012).

³⁶ Swati, J., Abhisheak, S., Mahendra, S., Kalpesh, V., Nagarjun, R., & Jawahar, L. (2014). *Novel pre-clinical methodologies for pharmacokinetic drug–drug interaction studies: spotlight on “humanized” animal models*. *Drug Metabolism Reviews*, 46 (4), 475-493. DOI: 10.3109/03602532.2014.967866.

³⁷ Lewis, L. D. (2010). *Drug-drug interactions: is there an optimal way to study them?* *British Journal of Clinical Pharmacology*, 70 (6), 781–783. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2010.03829.x.

³⁸ Wood FL, Houston JB, and Hallifax D. (2017). *Clearance prediction methodology needs fundamental improvement: trends common to rat and human hepatocytes/microsomes and implications for experimental methodology*. *Drug Metab Dispos* 45:1178–1188.

³⁹ Kola, I and Landis, J. (2004). *Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?* *Nat Rev Drug Discov* 3:711–715.

⁴⁰ Henderson, C.J., Kapelyukh, Y., Scheer, N., Rode, A., McLaren, A. W., McLeod, A. K., Lin, D., Wright, J., Stanley, L.A & Wolf, C. R. (2019). *An Extensively Humanized Mouse Model to Predict Pathways of Drug Disposition and Drug/Drug Interactions, and to Facilitate Design of Clinical Trials*. *Drug Metab Dispos* 47:601-615. DOI: 10.1124/dmd.119.08639

⁴¹ Way 2 drug. (s.f). *DDI-Pred: web-service for drug-drug interaction prediction*. <http://way2drug.com/ddi/index.php>

⁴² Kravetz, M. C., Barrionuevo, N. M., Rodríguez Basso A., Núñez, M. H., Rothlin, R., Viola, M. S., Bramuglia, G. (14-16 de noviembre de 2018). *Monitoreo terapéutico de quinidina: validación analítica*. 50 Reunión Anual De La Sociedad De Farmacología Experimental (SAFE), 1ra Reunión Conjunta SAFE- RICIFA, La Punta, San Luis- Argentina.

⁴³ Dmitriev, A.V., Rudik, A.V., Karasev, D.A., Pogodin, P.V., Lagunin, A.A., Filimonov, D.A., Poroikov, V.V. (2021). *In Silico Prediction of Drug-Drug Interaction Mediated by Cytochrome P450 Isoforms*. *Pharmaceutics* 13, 538. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040538>

⁴⁴ Wolfsegger, M. J., & Jaki, T. (2009). *Non-compartmental estimation of pharmacokinetic parameters in serial sampling designs*. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 36(5), 479–494. DOI:10.1007/s10928-009-9133-9.

⁴⁵ NDA 020505-S-050 Topamax (*Topiramate*) oral tablets (25mg, 50mg, 100mg and 200mg). NDA 020844-S-041 Topamax (*Topiramate*) sprinkle capsules (15mg and 25 mg). (2012). FDA

Approved Labeling Text.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020844s041lbl.pdf. Recuperado el 11 de agosto de 2021.

⁴⁶ Zaccara, G., Perucca, E. (2014). *Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs*. *Epileptic Disord*, 16 (4): 409-32. DOI:10.1684/epd.2014.0714.

⁴⁷ Yamada, K., Yasuhara, M., Yatsuzuka, A., Okumura Katsuhiko., Sakurai, T., Kawai, C., Hori, R. (1992). *Mechanisms of Pharmacokinetic Interaction between Propranolol and Quinidine in Rats*. *Chem. Pharm. Bull.* 40(7) 1876-1879.

⁴⁸ Watari, N., Wakamatsu, A., Kaneniwa, N. (1989). *Comparison of Disposition Parameters of Quinidine and Quinine in the Rat*. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 12, 608-615.

⁴⁹ Wolfsegger, M. J. (2006). *Establishing Bioequivalence in Serial Sacrifice Designs*. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 34 (1), 103-133. DOI: 10.1007/s10928-006-9037-x

⁵⁰ Sacré, A., Jouret, F., Manicourt, D., & Devuyt, O. (2006). *Topiramate induces type 3 renal tubular acidosis by inhibiting renal carbonic anhydrase*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(10), 2995–2996. DOI:10.1093/ndt/gfl251.

⁵¹ Welch, B. J., Graybeal, D., Moe, O. W., Maalouf, N. M., & Sakhaee, K. (2006). *Biochemical and Stone-Risk Profiles With Topiramate Treatment*. *American Journal of Kidney Diseases*, 48(4), 555–563. DOI: 10.1053/j.ajkd.2006.07.003.

⁵² Sato J, Ueda K, Saito A, Tada H, Owada E, Ito K, Murata T. (1983). *Effect of acetazolamide on barbiturate-induced sleeping time in mice. III. Pharmacokinetics of serum elimination and brain distribution*. *J Pharmacobiodyn.* Jun;6(6):381-90. DOI: 10.1248/bpb1978.6.381. PMID: 6631659.

⁵³ Pospelov, A. S., Ala-Kurikka, T., Kurki, S., Voipio, J., Kaila, K. (2021). *Carbonic anhydrase inhibitors suppress seizures in rat model of birth asphyxia*. *Epilepsia*. 62(8), 1971-1984. DOI: 10.1111/epi.16963

⁵⁴ NDA 12-945/S-037 & S-038 Diamox Sequels (Acetazolamide extended-release capsules). FDA Label. https://s3-us-west-2.amazonaws.com/drugbank/fda_labels/DB00819.pdf?1265922803. Recuperado de Drug Bank el 17 de septiembre de 2021.

⁵⁵ Rojas Martínez, R., Pérez Cabrera, A., Rojas del Calvo, A. M., Rodríguez Sosa, V. (1996). *Dosis letales de sulfato de quinina y quinidina en el ratón: influencia del sexo*. *Rev Cubana Farm* v.30 n.2 páginas http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000200004.

⁵⁶ Watanabe, A., Watari, R., Ogawa, K., Shimizu, R., Tanaka, Y., Takai, N., Nezasa, K. -I., & Yamaguchi, Y. (2015). *Using Improved Serial Blood Sampling Method of Mice to Study*

Pharmacokinetics and Drug-Drug Interaction. Journal of Pharmaceutical Sciences, 104(3), 955-961. DOI:10.1002/jps.24236.

⁵⁷ Shirasaka, Y., Sakane, T., Yamashita, S. (2006). *Effect of P-Glycoprotein Expression Levels on the Concentration-Dependent Permeability of Drugs to the Cell Membrane*. Wiley InterScience www.interscience.wiley.com. 97(1), 553-565. DOI 10.1002/jps.21114.

6. Anexos

ANEXO I. Espectros de absorción UV

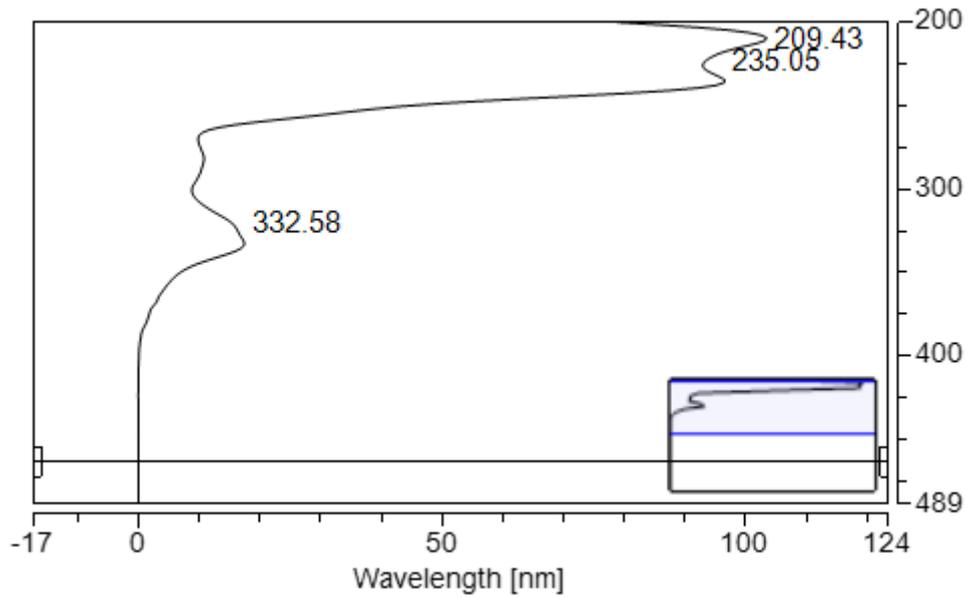


FIGURA 6. ESPECTRO UV DE LA QUINIDINA A 225 NM

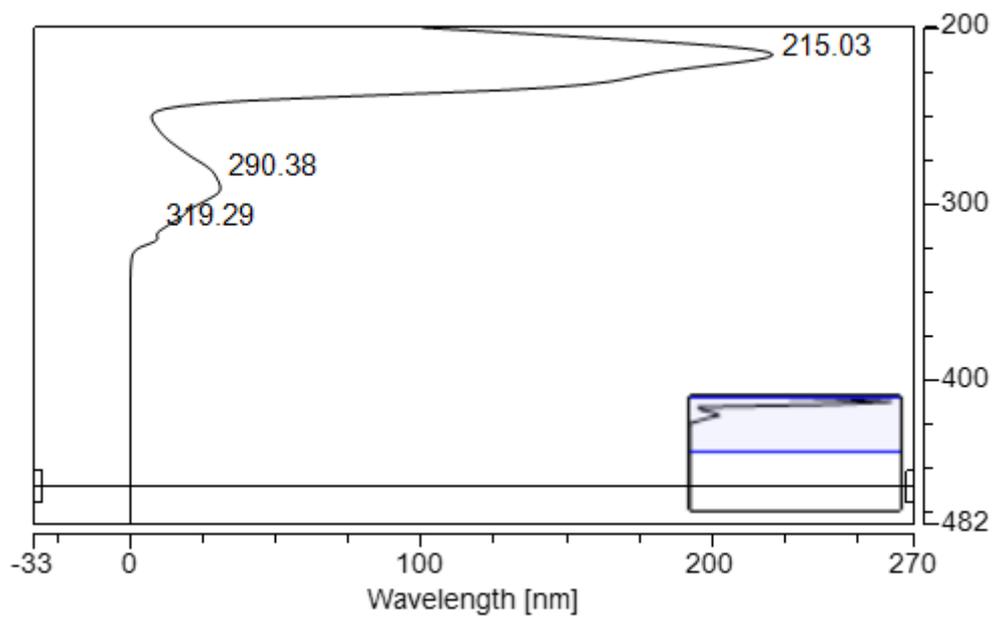


FIGURA 7. ESPECTRO UV DEL PROPRANOLOL A 225 NM

ANEXO II. Valoración de QND en ratones por HPLC (experimentos)

TABLA 9. VALORACIÓN DE QND EN RATONES EN EL PROTOCOLO DE ELECCIÓN DE DOSIS Y TIEMPOS

Curva de calibración y valoración de Quinidina en plasma de ratón 15/01/2021									
Curva de calibración en plasma									
Nivel	Pesada (mg)	N corregido	Area QND	Area STI	Rel. areas	cc (µg/ml)	Bias		
1	10,2	1,0	1,2501	5,4849	22,79166	2,24	130,5		
1	10,2	1,0	1,2501	5,4849	22,79166	2,24	130,5		
2	10,2	1,9	2,4766	15,2869	16,20080	1,20	-38,3		
2	10,2	1,9	2,4766	15,2869	16,20080	1,20	-38,3		
3	10,2	2,9	3,4667	13,5742	25,53889	2,67	-8,3		
3	10,2	2,9	3,4667	13,5742	25,53889	2,67	-8,3		
4	10,2	3,9	4,6908	15,9944	29,32776	3,27	-15,8		
4	10,2	3,9	4,6908	15,9944	29,32776	3,27	-15,8		
5	10,2	4,9	6,7777	17,9245	37,81249	4,61	-5,1		
5	10,2	4,9	6,7777	17,9245	37,81249	4,61	-5,1		
8	10,2	7,8	12,0042	19,1968	62,53230	8,52	9,5		
8	10,2	7,8	11,2928	18,6508	60,54861	8,20	5,5		

Análisis de las muestras													
Ratón	Peso (gr)	Vol. Admin (ml)	Conc. Admin (mg/ml)	Muestra	t extracción (min)	Muestra	Area QND	Area STI	Rel. areas	cc (µg/ml)	cc corregida (µg/ml)	promedio en sangre (µg/ml)	nd= pico no detectado
1	25	3,0	3,0	Sangre 1	40	300	2,7342	20,9763	13,03471	0,70	1,17		
1	25	3,0	3,0	Sangre 1	40	300	2,7685	20,958	13,20021	0,73	1,21	1,2	dudosa detección del pico
2	23	3,0	3,0	Sangre 2	15	200	2,5422	17,7492	14,32290	0,90	2,26		
2	23	3,0	3,0	Sangre 2	15	200	2,0794	14,1664	14,67839	0,96	2,40	2,3	
3	24	1,5	1,5	Sangre 3	40	250	61,8395	17,3336	356,76086	54,97	109,93		
3	24	1,5	1,5	Sangre 3	40	250	25,1918	6,8841	365,94181	56,42	112,83	111,4	>> turbio
4	25	1,5	1,5	Sangre 4	15	200	2,0823	20,9288	9,94945	0,21	0,53		
4	25	1,5	1,5	Sangre 4	15	200	1,671	12,2386	13,65362	0,80	2,00	1,3	

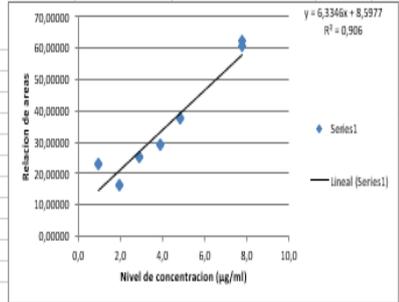


TABLA 10. VALORACIÓN DE QND EN RATONES EN EL PROTOCOLO DE QND Y QND MÁS TPM

Curva de calibración y valoración de Quinidina en plasma de raton 25/03/2021										
Curva de calibración en plasma										
Nivel	Pesada (mg)	N corregido	Area QND	Area STI	Rel. area:c (µg/ml)	Bias				
0,25	10,2	0,24	0,3726	37,6121	0,93064	0,21	-13,6			
0,25	10,2	0,24	0,3726	37,6121	0,93064	0,21	-13,6			
0,5	10,2	0,5	0,7448	39,1609	1,90190	0,42	-13,8			
0,5	10,2	0,5	0,7769	38,7423	2,00530	0,44	-9,0			
1	10,2	1,0	1,5515	36,5633	4,24333	0,96	-1,7			
1	10,2	1,0	1,5414	35,323	4,29084	0,97	-0,6			
2	10,2	1,9	2,9639	35,1224	8,43877	1,92	-1,4			
2	10,2	1,9	2,9413	34,6152	8,49713	1,93	-0,7			
3	10,2	2,9	4,6834	35,7138	13,11370	2,99	2,4			
3	10,2	2,9	4,6834	35,7138	13,11370	2,99	2,4			
4	10,2	3,9	6,3233	33,8234	18,69505	4,27	9,7			
4	10,2	3,9	6,3233	33,8234	18,69505	4,27	9,7			
5	10,2	4,9	7,3363	36,9183	19,87172	4,54	-6,7			
5	10,2	4,9	7,3363	36,9183	19,87172	4,54	-6,7			

Análisis de las muestras											
Raton	Peso (gr)	l. Admín a t=0	m. Admín (m)	Muestra	t extracción (mil.)	Muestra (Area QND)	Area STI	Rel. areas:c (µg/ml)	cc corregida (µg/promedio en sangre (µg/ml))		
A	36	3,0 mg/ml	0,36	Sangre A	10	250	2,7272	34,4904	7,90713	1,79	3,59
A	36	3,0 mg/ml	0,36	Sangre A	10	250	2,7272	34,4904	7,90713	1,79	3,59
B	35	3,0 mg/ml	0,35	Sangre B	30	350	2,339	38,0134	6,15309	1,39	1,39
B	35	3,0 mg/ml	0,35	Sangre B	30	350	2,3376	37,4032	6,24973	1,41	2,02
C	33	3,0 mg/ml	0,33	Sangre C	60	140	0,9301	32,9735	2,82075	0,63	2,25
C	33	3,0 mg/ml	0,33	Sangre C	60	140	0,9149	31,7064	2,88554	0,64	2,30
D	37	3,0 mg/ml	0,37	Sangre D	10	400	3,5229	32,0452	10,99353	2,50	3,13
D	37	3,0 mg/ml	0,37	Sangre D	10	400	3,5229	32,0452	10,99353	2,50	3,13
E	30	3,0 mg/ml	0,3	Sangre E	30	250	1,1898	27,1527	4,38188	0,99	1,97
E	30	3,0 mg/ml	0,3	Sangre E	30	250	1,1898	27,1527	4,38188	0,99	1,97
F	35	3,0 mg/ml	0,35	Sangre F	60	100	0,0529	34,4955	0,15335	0,02	0,09
F	35	3,0 mg/ml	0,35	Sangre F	60	100	0,0529	34,4955	0,15335	0,02	0,09
G	34	3,0 mg/ml	0,34	Sangre G	15	300	2,1692	33,489	6,47735	1,47	2,44
G	34	3,0 mg/ml	0,34	Sangre G	15	300	2,1692	33,489	6,47735	1,47	2,44
H	Falta dato		0	Sangre H	0	100					
H	Falta dato		0	Sangre H	0	100					
I	32		ControlTopi	Sangre I	20	300					
I	32		ControlTopi	Sangre I	20	300					

TABLA 11. VALORACIÓN DE QND EN RATONES EN EL PROTOCOLO DE QND Y QND MÁS TPM

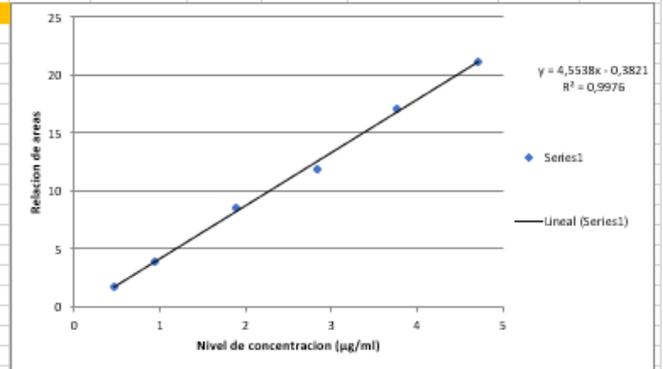
Curva de calibración y valoración de Quinidina en plasma de ratos 31/03/2021							
Curva de calibración en plasma							
Nivel	Pesada (mg)	corregid	Area QNC	Area STI	Rel. areas	cc (µg/ml)	Bias
0,25	10,2	0,24	0,4029	33,0436	1,21930	0,27	10,8
0,25	10,2	0,24	0,3128	33,1636	0,94320	0,21	-14,7
0,5	10,2	0,5	0,796	33,4104	2,38249	0,53	9,1
0,5	10,2	0,5	0,796	33,4104	2,38249	0,53	9,1
1	10,2	1,0	1,5632	37,9424	4,13574	0,92	-4,9
1	10,2	1,0	1,5632	37,9424	4,13574	0,92	-4,9
2	10,2	1,9	3,08	36,5792	8,42009	1,89	-3,0
2	10,2	1,9	3,08	36,5792	8,42009	1,89	-3,0
3	10,2	2,9	5,3237	39,1183	13,60923	3,05	4,6
3	10,2	2,9	5,3237	39,1183	13,60923	3,05	4,6
4	10,2	3,9	6,745	39,7534	16,96710	3,81	-2,1
4	10,2	3,9	6,7404	39,7278	16,96646	3,81	-2,1
5	10,2	4,9	7,2399	33,3278	21,72331	4,87	0,3
5	10,2	4,9	7,2399	33,3278	21,72331	4,87	0,3

Análisis de las muestras de plasma															
Rato n	Peso (gr)	Dss Topi	t inyeccio	Vol. Admín	Dss QND	t inyecci	Vol. Admín	t extracci	Vol. Muestra	Area QND	Area STI	Rel. areas	cc (µg/ml)	cc corregid	cc promedio en saagre (µg/ml)
1	35	-	-	0,35	30	0	0,35	60	250	0,5744	39,8831	1,44021	0,32	0,64	0,8
2	33	-	-	0,33	30	0	0,33	60	400	0,7145	30,3873	2,35131	0,52	1,05	1,0
3	31	-	-	0,31	30	0	0,31	60	400	1,4821	40,6222	3,64850	0,81	1,02	1,0
4	32	-	-	0,32	30	0	0,32	60	350	1,4285	38,1046	3,74830	0,84	1,05	1,1
5	30	50	-25	0,30	30	0	0,30	60	350	1,2665	32,7638	3,86484	0,86	1,08	1,1
6	30	50	-30	0,30	30	0	0,30	60	400	1,2665	32,7638	3,86484	0,86	1,08	1,1
7	29	50	-35	0,29	30	0	0,29	60	260	1,1154	35,1493	3,17341	0,71	1,01	1,1
8	30	50	-40	0,30	30	0	0,30	60	400	1,1467	28,8527	3,37433	0,89	1,27	1,2
9	30	50	-25	0,30	30	0	0,30	60	350	1,7065	38,4682	4,43613	0,99	1,42	1,4
10	30	50	-30	0,30	30	0	0,30	60	400	1,7065	38,4682	4,43613	0,99	1,42	1,4
11	30	50	-30	0,30	30	0	0,30	60	400	2,0752	36,9781	5,61197	1,26	1,57	1,6
12	29	50	-35	0,29	30	0	0,29	60	260	2,0752	36,9781	5,61197	1,26	1,57	1,6
13	30	50	-40	0,30	30	0	0,30	60	400	0,9394	36,0041	2,77579	0,62	1,19	1,2
14	30	50	-40	0,30	30	0	0,30	60	400	0,9394	36,0041	2,77579	0,62	1,19	1,2
15	30	50	-40	0,30	30	0	0,30	60	400	1,6065	38,3234	4,19196	0,94	1,17	1,2
16	30	50	-40	0,30	30	0	0,30	60	400	1,6065	38,3234	4,19196	0,94	1,17	1,2
17	29	-	-	0,29	30	0	0,29	30	150	0,9723	36,6804	2,65073	0,59	1,97	2,0
18	32	-	-	0,32	30	0	0,32	30	250	0,9723	36,6804	2,65073	0,59	1,97	2,0
19	30	-	-	0,30	30	0	0,3	30	400	1,4533	38,9972	3,72668	0,83	1,66	1,7
20	30	-	-	0,30	30	0	0,3	30	400	1,3635	35,4856	3,85931	0,86	1,72	1,7
21	32	-	-	0,32	30	0	0,32	30	200	1,6295	34,7970	4,68288	1,05	1,31	1,3
22	32	-	-	0,32	30	0	0,32	30	200	1,6078	34,0041	4,72825	1,06	1,32	1,3
23	35	50	-15	0,35	30	0	0,35	30	300	1,4602	35,9215	4,06497	0,91	2,27	2,3
24	35	50	-15	0,35	30	0	0,35	30	300	1,4602	35,9215	4,06497	0,91	2,27	2,3
25	35	50	-15	0,35	30	0	0,35	30	300	1,6678	23,4333	7,11722	1,59	2,66	2,7
26	35	50	-15	0,35	30	0	0,35	30	300	1,6678	23,4333	7,11722	1,59	2,66	2,7
27	32	50	-20	0,32	30	0	0,32	30	300	2,4406	33,9105	7,19719	1,61	2,69	2,7
28	32	50	-20	0,32	30	0	0,32	30	300	2,4406	33,9105	7,19719	1,61	2,69	2,7
29	31	50	-25	0,31	30	0	0,31	30	400	2,8672	37,7143	7,60243	1,70	2,13	2,1
30	31	50	-25	0,31	30	0	0,31	30	400	2,8672	37,7143	7,60243	1,70	2,13	2,1
31	34	50	-30	0,34	30	0	0,34	30	300	3,542	32,6483	10,84894	2,43	4,05	4,1
32	34	50	-30	0,34	30	0	0,34	30	300	3,5398	32,6643	10,83691	2,43	4,05	4,1
33	31	-	-	0,31	30	0	0,31	10	300	2,7822	35,0973	7,92711	1,78	2,96	3,0
34	31	-	-	0,31	30	0	0,31	10	300	2,7822	35,0973	7,92711	1,78	2,96	3,0
35	32	-	-	0,32	30	0	0,32	10	250	1,9344	37,4725	5,16219	1,15	2,31	2,3
36	32	-	-	0,32	30	0	0,32	10	250	1,9344	37,4725	5,16219	1,15	2,31	2,3
37	33	-	-	0,33	30	0	0,33	10	270	2,6358	39,3162	6,75365	1,51	2,80	2,8
38	33	-	-	0,33	30	0	0,33	10	270	2,4495	36,2294	6,76108	1,51	2,80	2,8
39	29	-	-	0,29	30	0	0,29	10	400	2,3625	34,4316	6,86143	1,54	1,92	1,9
40	29	-	-	0,29	30	0	0,29	10	400	2,3625	34,4316	6,86143	1,54	1,92	1,9
41	29	50	-15	0,29	30	0	0,29	10	170	2,0474	37,6800	5,43365	1,22	3,58	3,6
42	29	50	-15	0,29	30	0	0,29	10	170	1,8183	32,8078	5,54228	1,24	3,65	3,6
43	30	50	-15	0,30	30	0	0,30	10	370	3,5984	38,9995	9,22678	2,07	2,79	2,8
44	30	50	-15	0,30	30	0	0,30	10	370	3,5984	38,9995	9,22678	2,07	2,79	2,8
45	32	50	-15	0,32	30	0	0,32	10	180	2,2388	38,8062	5,76918	1,29	3,59	3,6
46	32	50	-15	0,32	30	0	0,32	10	180	2,2388	38,8062	5,76918	1,29	3,59	3,6
47	33	50	-15	0,33	30	0	0,33	10	250	2,444	36,5359	6,68931	1,50	3,00	3,0
48	33	50	-15	0,33	30	0	0,33	10	250	2,444	36,5359	6,68931	1,50	3,00	3,0

TABLA 12. VALORACIÓN DE QND EN RATONES EN EL PROTOCOLO DE QND Y QND MÁS AZA

Curva de calibración y valoración de Quinidina en plasma de raton 05/07/2021

Curva de calibración en plasma							
Nivel	Pesada (ml)	corregid	Area QND	Area STI	Rel. area:c	cc (µg/ml)	Bias
0,5	9,9	0,5	0,3723	21,132	1,76178	0,47	-0,2
0,5	9,9	0,5	0,3723	21,132	1,76178	0,47	-0,2
1	9,9	0,9	1,6947	42,7406	3,96508	0,95	1,2
1	9,9	0,9	1,0852	27,728	3,91373	0,94	0,0
2	9,9	1,9	3,5344	41,3923	8,53879	1,96	3,8
2	9,9	1,9	3,3206	38,9169	8,53254	1,96	3,8
3	9,9	2,8	5,3033	44,8459	11,82561	2,68	-5,3
3	9,9	2,8	5,3033	44,8459	11,82561	2,68	-5,3
4	9,9	3,8	6,603	38,6137	17,10015	3,84	1,7
4	9,9	3,8	6,6223	38,6847	17,11865	3,84	1,9
5	9,9	4,7	8,5258	40,3513	21,12894	4,72	0,2
5	9,9	4,7	8,5258	40,3513	21,12894	4,72	0,2
QC	2		3,9721	43,4472	9,14236	2,091887	10,9



Análisis de las muestras de plasma

Rato n	Peso (gr)	Dss Acet	t inyecci	Vol. Admin	Dss QND	t inyecci	Vol. Admin	t extracci	Vol. Muestra	Area QND	Area STI	Rel. areas	cc (µg/ml)	cc corregid	cc promedio en sangre (µg/ml)
1	24	-	-	-	30	0	0,24	60	250	0,5061 0,5311	48,4628 48,5055	1,04431 1,09493	0,31 0,32	0,63 0,63	0,6
2	24	-	-	-	30	0	0,24	60	500	1,0094 1,01	37,0366 36,9344	2,72541 2,73458	0,68 0,68	0,68 0,68	0,7
3	24	-	-	-	30	0	0,24	60	250	0,6549 0,6305	47,0744 47,1370	1,39120 1,33759	0,39 0,38	0,78 0,76	0,8
4	23	-	-	-	30	0	0,23	60	250	0,6347 0,3207	45,2271 23,0551	1,40336214 1,39101544	0,39 0,39	0,78 0,78	0,8
5	25	-	-	-	30	0	0,25	60	250	0,7812 0,7812	44,1644 44,1644	1,7688455 1,7688455	0,47 0,47	0,94 0,94	0,9

6	26	100	-35	0,26	30	0	0,26	60	250	1,2229 0,9772	48,7886 39,8553	2,50653 2,45187	0,63 0,62	1,27 1,24	1,3
7	23	100	-40	0,23	30	0	0,23	60	200	1,1507 0,862	51,4165 39,9125	2,23800 2,15972	0,58 0,56	1,44 1,40	1,4
8	23	100	-45	0,23	30	0	0,23	60	250	0,8005 0,4232	44,6358 25,3551	1,79340 1,66909	0,48 0,45	0,96 0,90	0,9
9	25	100	-50	0,25	30	0	0,25	30	250	0,7272 0,1676	42,4937 10,7211	1,71131 1,56327	0,46 0,43	0,92 0,85	0,9
10	25	100	-55	0,25	30	0	0,25	30	250	0,7791 0,79	43,9778 43,1038	1,77158 1,83279	0,47 0,49	0,95 0,97	1,0
11	26	-	-	-	30	0	0,26	30	250	1,1601 1,2146	37,2068 37,1976	3,11798 3,26526	0,77 0,80	1,54 1,60	1,6
12	27	-	-	-	30	0	0,27	30	250	2,3954 2,3938	43,6402 43,6403	5,48898 5,48530	1,29 1,29	2,58 2,58	2,6
13	24	-	-	-	30	0	0,24	30	120	1,1541 0,8848	44,3554 33,4908	2,60194 2,64192	0,66 0,66	2,73 2,77	2,7
14	??	-	-	-	30	0	#####	30	250	1,5571 1,574	44,5356 44,5350	3,49630 3,53430	0,85 0,86	1,70 1,72	1,7
15	??	-	-	-	30	0	#####	30	50	0,2495 0,2547	44,7794 44,6948	0,55718 0,56986	0,21 0,21	2,06 2,09	2,1
16	24	100	-30	0,24	30	0	0,24	30	200	1,6285 1,632	43,7476 43,7967	3,72249 3,72631	0,90 0,90	2,25 2,26	2,3
17	26	100	-35	0,26	30	0	0,26	30	200	1,4229 0,3987	42,5545 6,8241	3,34371 5,84253	0,82 1,37	2,05 3,42	2,7
18	29	100	-40	0,29	30	0	0,29	30	250	3,1047 3,1034	46,6239 46,6854	6,65903 6,64747	1,55 1,54	3,09 3,09	3,1
19	26	100	-45	0,26	30	0	0,26	30	250	1,3195 0,9713	40,7125 30,4059	3,24102 3,19445	0,80 0,79	1,59 1,57	1,6
20	20	100	-50	0,2	30	0	0,20	30	250	0,1 0,1	35,5962 35,5962	0,28093 0,28093	0,15 0,15	0,29 0,29	0,3

Interacción quinidina-topiramato: de la clínica a la preclínica

21	26	—	—	—	30	0	0,26	15	200	1,397	41,3175	3,38113	0,83	2,07	2,1		
										1,3826	41,2743	3,34378	0,82	2,05			
22	23	—	—	—	30	0	0,23	15	150	1,4245	46,5313	3,06138	0,76	2,52	2,5		
										0,1618	5,5562	2,91206	0,72	2,41			
23	26	—	—	—	30	0	0,26	15	150	0,0864	31,0630	0,27814	0,14	0,48	0,4		
										0,0466	31,0389	0,15013	0,12	0,39			
24	25	—	—	—	30	0	0,25	15	250	2,3734	42,0845	5,63961	1,32	2,65	2,6		
										2,3303	41,4534	5,62149	1,32	2,64			
25	??	—	—	—	30	0	#####	15	120	0,0978	42,7832	0,22859	0,13	0,56	0,6		
										0,1058	42,9165	0,24653	0,14	0,58			
26	28	52	-15	0,28	30	0	0,28	15	120	0,6234	43,1910	1,44336	0,40	1,67	1,7		
										0,6426	43,0757	1,49179	0,41	1,71			
27	27	53	-15	0,27	30	0	0,27	15	200	1,9677	30,9721	6,35314	1,48	3,70	3,7		
										1,9677	30,9721	6,35314	1,48	3,70			
28	28	54	-15	0,28	30	0	0,28	15	200	1,632	32,8834	4,96299	1,17	2,93	2,8		
										1,3613	30,0063	4,53671	1,08	2,70			
29	27	55	-15	0,27	30	0	0,27	15	120	1,1617	46,7673	2,48400	0,63	2,62	2,6		
										1,1392	45,1031	2,52577	0,64	2,66			
30	23	56	-15	0,23	30	0	0,23	15	150	1,7644	36,7063	4,80680	1,14	3,80	3,8		
										1,7644	36,7063	4,80680	1,14	3,80			