

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Bioensayo en ratones *BIOU:NMRI* de una Familia de Fármacos pertenecientes al Grupo de las Hidantoínas

Paredes Daniel¹, Contreras Ricardo¹, De Jesús Rosa².

¹Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

²Bioterio. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

Resumen

En el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes se sintetizaron un grupo de diez compuestos cuyo principio activo son las hidantoínas y tiohidantoínas, los cuales se caracterizaron mediante espectrometría de masas a diversos niveles de energía. Como las hidantoínas presentan el potencial farmacológico para el tratamiento de enfermedades neurológicas crónicas tales como la epilepsia, se desarrolló un modelo experimental usando 18 ratones NMRI: BIOU, machos con un peso de 30 ± 2 g administrándoles 225 mg/Kg de peso manifestaron episodios epilépticos se usaron tres ratones por dosis. Posteriormente usando la dosis de pilocarpina de 225 mg/Kg, se probó el efecto profiláctico de los diez compuestos sintetizados considerando los signos de los episodios epilépticos tales como: movimientos erráticos, piloerección, presencia defecación y micción, y muerte. En esta fase se usaron 33 ratones con características similares al grupo anterior. Los resultados de esta fase permitió seleccionar 2 de los compuestos probados: 5,5-difenilhidantoína y 5,5-difenil-2-tiohidantoína, bajo el criterio de que al aplicar la pilocarpina se observó efecto profiláctico. Se desarrolló una segunda fase usando un número de 22 ratones con las mismas características, se aplicó el mismo esquema y se corroboró el efecto profiláctico de los compuestos, no se observaron los episodios epilépticos o se observaron de forma leve en períodos de corta duración. Los animales se dejaron vivos durante 8 días con la finalidad de observar efectos adversos en un corto tiempo (toxicidad sub aguda), luego de la administración de los compuestos HTA-4 y el HTA-11, observándose que no hubo manifestación de daños o efectos secundarios, los animales consumieron alimento y agua normalmente, su pelaje presentó apariencia normal y en la necropsia no se observaron daños anatomopatológicos. Se continuarán con los bioensayos de toxicidad necesarios para buscar alternativas para mejorar la condición de los enfermos de epilepsia.

Palabras claves: hidantoínas, toxicidad, epilepsia, ratones, biomodelos.

Abstract

Bioassays in BIOU: NMRI mice of a drug family belonging to the Group of the Hydantoins

Ten compounds with hydantoins and tiohydantoins active substances were synthesized and characterized by means of RMN-1Hy RMN-13C, UV – visible spectroscopy (UV/vis) y mass spectrometry in the Crystallography Laboratory of The Los Andes University, Venezuela. The pharmacological potential of the hydantoins compounds is the neurologic diseases treatment, a model experimental epileptic mouse was created using 225 mg/Kg dose pilocarpine, at this proposit were used 18 male mice NMRI:BIOU of 30 ± 2 g they presented epilepsy disorders. After, using dosis of pilocarpina of 225 mg/Kg, the prophylactic effect the synthesized compounds was proved on the epileptic episodes in the mouse were profilactic proved effect on the epileptic episodes, signes as: erratic movements, piloerección, defecation, micturition, and death were monitored. A number of 33 mice were used with similar characteristics of group previous. The compounds 5,5-difenilhidantoina (HTA-4) and 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA-11) they were selected using the criterium of prophylaxis. With 22 mice the prophylaxis effect was verified, a scheme similar was applied and they didn't presented the epileptic episodes or they presented time short. During eight days (subagude toxicity) after compounds administration the animals were observed and they consumed food and water normally, the coat was of appearance normal and the organs without lesions in the necropsy. We will continue doing toxicity agude and chronicle with these compounds as goal epilepsy illness persons alternatives.

Key words: hydantoins, toxicity, epilepsy, mouse, biomodels.

Introducción

Existe necesidad de caracterizar en detalle cualquier posible fármaco principalmente con la finalidad de determinar que éste no ocasione efectos secundarios en quienes lo consumen (1), o que estos sean mínimos. Este es el objetivo de realizar estudios biológicos (*in vitro* e *in vivo*) minuciosos, que permitan comprobar la efectividad e inocuidad de cada compuesto que se comercialice para el consumo de la población.

La organización Mundial de la Salud (OMS) y la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) definen a la epilepsia como una afección neurológica crónica, recurrente y repetitiva, de fenómenos paroxísticos ocasionados por descargas de neuronas cerebrales de forma desordenada y excesiva. La epilepsia es un síndrome de desórdenes cerebrales del sistema nervioso central. En el mundo 450 millones de personas (0,5 al 2% de la población mundial), están afectadas con desórdenes mentales y neurológicos, de los cuales 60 millones padecen epilepsia, esta enfermedad es más común en niños y aún no existe una droga ideal para el tratamiento de la misma, es por ello que es necesaria la investigación y el desarrollo de nuevas drogas que permitan disminuir las complicaciones que produce esta enfermedad (2).

Las hidantoínas (imidazolidin-2,4-dionas) son derivados de la α -aminoácido y presentan interesantes aplicaciones biológicas entre las que se encuentran el potencial farmacológico para el tratamiento de enfermedades neurológicas crónicas tales como la epilepsia (3, 4, 5), y la fenitoína (difenhidantoína) es probablemente uno de los fármacos más eficaces para tratar este tipo de enfermedades neurológicas, ésta no afecta el umbral del estímulo (no "inhibe" el comienzo de las descargas epilépticas), sino que limita la propagación de la actividad convulsiva. Este fármaco es capaz de bloquear la Potenciación Postetánica del foco (PPT) del mismo modo que la carbamacepina.

Los estudios preclínicos en animales tienen por objeto demostrar la eficacia y seguridad de un posible fármaco, antes de su introducción en voluntarios humanos (Fase I). Este tipo de modelos evalúan la actividad y toxicidad de nuevos candidatos, lo que permite descartarlos rápidamente si no manifiestan los efectos deseados. Además,

proveen información inicial sobre la farmacocinética del compuesto y respecto al posible mecanismo por el cual actúan.

Para facilitar el estudio de la epilepsia, desde las causas hasta sus consecuencias, se han desarrollado modelos experimentales basados principalmente en mimetizar las crisis epilépticas observadas en el humano. Sin embargo, debe resaltarse que en numerosos casos, el término de crisis epiléptica se aplica aun cuando la alteración de la actividad cerebral anormal que las origina es aguda y no persistente ni espontánea, esto es, a pesar de no ser propiamente epilepsia.

La pilocarpina es un fármaco (6,7), que produce ataques convulsivos en los seres vivos dependiendo de la concentración en que se administre. Este medicamento es usado en la farmacología experimental para contar con modelos experimentales de epilepsia, el tipo de actividad epiléptica generada es mediante crisis parciales complejas secundariamente generalizadas (status epilepticus), se usa en protocolos de agudo a crónico y se usa en animales adultos y en desarrollo (8).

En este trabajo se propuso estudiar mediante un ensayo biológico agudo, un grupo de compuestos de la familia de las Hidantoínas y las Tiohidantoínas como agentes anticonvulsionantes en roedores *BIOU: NMRI*. Estos ensayos se realizaron bajo la supervisión de la Comisión de Bioética del Bioterio de la Universidad de Los Andes, además, dicho Comité de Bioética otorgó el Aval Institucional donde aprobó el uso de animales de laboratorio para realizar este tipo de ensayos.

En el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes se obtuvieron las hidantoinas y tiohidantoinas a estudiar las cuales fueron obtenidas siguiendo los pasos descritos en diversos trabajos (9, 10,11), a las cuales se les realizó espectrometría de masas (12, 13) para su caracterización.

Metodología

1.- Para el análisis de los compuestos sintetizados (Tabla 1), se usó la técnica de espectrometría de masas para caracterizar en detalle las diferentes fragmentaciones de los compuestos. La energía con la que se realizaron los análisis usando la técnica de espectrometría de masas fue de 40, 50, 60 y 70 eV mediante el bombardeo de electrones usando un cromatógrafo de gases marca *Hewlett-Packard HP 6890 Series (GC System)* acoplado a un Espectrómetro de Masas marca *Hewlett-Packard HP 5973 massselective detector*.

2.- Para el bioensayo se usaron un total 73 ratones machos de la línea no consanguínea B10U:NMRI de 30 ± 2 g. Todos los ratones fueron alimentados con alimento comercial (ratarina - marca protinal), al cual se le da tratamiento calórico de $121^{\circ}\text{C}/1$ min. , agua esterilizada a 121° C por 15 minutos ambos suministrados a voluntad, usando como material de cama cáscara de arroz esterilizada a 121° C por 15 minutos y alojados en cajas tipo T₂: L= 26 cm, A= 20 cm, h= 13 cm. Los ratones se mantuvieron en un ambiente bajo barreras sanitarias, categorizados microbiológicamente como convencionales limpios.

Dieciocho (18) de los ratones se usaron para estandarizar la dosis de pilocarpina que producía convulsión, identificar los signos de la convulsión y el tiempo en que duraba la misma, se usaron 3 ratones por dosis. Para este ensayo de la estandarización de la dosis de pilocarpina (marca BDH *Laboratory Reagents* 99 % de pureza. Número de producto: 29558) se usaron las siguientes dosis: 50, 100, 150, 200, 225 y 250 mg/Kg y se valoraron los siguientes parámetros: la piloerección, movimientos, pérdida del control de los esfínteres, fase ictal (actividad epiléptica ictal), (14) y muerte. Las dosis fueron administradas intraperitonealmente.

Determinado el tiempo de aparición de la convulsión luego de colocada la pilocarpina se decidió aplicar el tratamiento a los 5 minutos previo a la aplicación de ésta, con la finalidad de observar el efecto profiláctico, efecto "anticonvulsivante", post aplicación de la pilocarpina, la administración de estos fue vía intraperitoneal.

Se usaron treinta y tres (33) ratones para realizar la prueba de determinar el efecto profiláctico de los 10 compuestos sintetizados en el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes por el Prof. Gerzón Delgado, más un fármaco comercial usado como control positivo (Tabla 1).

La dosis administrada de los compuestos en estudio fue de 20 mg/Kg, el criterio usado para la administración de esta dosis fue que: la hidantoína se utiliza por vía oral y parenteral como anticonvulsivo. Se prescribe en el tratamiento profiláctico de las convulsiones tónicas – clónicas y crisis parciales con sintomatología compleja (crisis psicómora), en los pacientes en los que se administra por primera vez, por primera vez, se recomiendan una dosis única de 15 a 20 mg/kg, algunos especialistas recomiendan una dosis adicional de 5 a 10 mg/kg i.v. si la dosis inicial no termina con las convulsiones, por la información antes aportada por la dirección web se procedió a realizar una relación estequiométrica en donde se obtuvieron los moles teóricos del fármaco comercial (control), y de este modo se pudo obtener los gramos necesarios para alcanzar esta concentración dependiendo del peso de cada ratón usado. Después de administrado el compuesto a probar como profiláctico, en un intervalo de cinco (5) minutos después, se administró la pilocarpina, asumiendo que era el tiempo necesario para que el organismo del ratón metabolizara el compuesto aplicado. Se registraron los siguientes parámetros: sobrevida de los ratones, piloerección, movimientos, pérdida del control de esfínteres, fase ictial.

Luego de realizada la parte anterior, se usaron veintidós (22) ratones para realizar un ensayo comprobatorio de los compuestos que dieron mejores resultados en la parte anterior de la experiencia, para este ensayo comprobatorio, se emplearon solo 2 de los compuestos a los que se estaban probando su efecto profiláctico, los cuales fueron: HTA 4 y HTA 11, y se mantuvo el fármaco comercial HTA 2 como control. Los animales se dejaron vivos durante 8 días y luego fueron sacrificados por exceso de anestesia.

Resultados

Todos los compuestos fueron analizados por espectroscopia de masas, sin embargo la presentación de los resultados se restringirán a los compuestos que presentaron características profilácticas como fueron los HTA - 4 y HTA- 11, comparados con el espectro de fragmentación presentado por HTA - 2, que fue el fármaco usado como control en la experiencia. En la Figura 1a, se puede observar el patrón de fragmentación de la HTA-2, con el espectro de 60 eV de este fármaco, cabe destacar que este es el compuesto que se comercializa con el nombre de *Fenitoína*© y se emplea comúnmente para el control de ataques epilépticos. Se realizó la caracterización de este compuesto farmacológico con la finalidad de tener un patrón de referencia y así comparar estos resultados con los resultados obtenidos con las otras hidantoínas en estudio.

En primer lugar se puede observar en la Figura 1a, que el compuesto tiene dos sustituyentes fenílicos que posee este compuesto en su anillo hidantoínico. Se puede apreciar igualmente que un ion molecular a 252 m/z y un pico base ubicado en 180 m/z, este último pico es el más estable debido a que la carga radical que se encuentra sobre el nitrógeno, él se puede estabilizar por resonancia con los anillos bencílicos que se encuentran en posición β al nitrógeno. Las fragmentaciones sucesivas de este compuesto se llevan a cabo perdiendo moléculas neutras o radicales que no son detectadas por el espectrómetro de masas sin embargo éstas se obtienen por diferencia y sobre la base de la teoría en espectrometría de masas, que dice que: siempre que se pueda justificar un pico por la pérdida de una molécula neutra (H_2O , NO , CO , CO_2 , C_2H_2 , H_2CO , otros), el analista debe hacerlo. Estas pérdidas secuenciales se les atribuyen a: i) $CHO \rightarrow 29$ m/z; ii) $CHNO \rightarrow 43$ m/z; iii) $C_6H_4 \rightarrow 76$ m/z; iv) $HCN \rightarrow 27$ m/z y v) $C_2H_2 \rightarrow 26$ m/z.

En la Figura 1b, se puede observar igualmente el patrón de fragmentación de la HTA-4 a 60 eV de este analito, el cual posee un grupo metilo en posición 4 en uno de los anillos fenílicos, el cual forma parte de la estructura de esta hidantoína. La adición de grupos sustituyentes en estos compuestos anticonvulsivantes tiene la finalidad de obtener una mejor respuesta al momento de ser usado como compuesto para ayudar a controlar los

ataques epilépticos. Similar a lo observado en los espectros del compuesto HTA-2, en los espectros de masas de la HTA-4 disminuye la abundancia de los fragmentos a medida que van disminuyendo las energías de ionización. Por otro lado, la complejidad de la fragmentación de este compuesto es similar al del HTA-2 aunque en esta oportunidad está presente un metilo en el anillo fenílico lo que hace que su proceso de fragmentación aumente. Se puede observar en la Figura 1b, en primer lugar el ion molecular en 266 m/z y el pico base de este espectro de masas en 180 m/z (similar al pico base de la HTA-2) este último pico mencionado es el más estable debido a que el radical se encuentra ubicado sobre el nitrógeno, que puede estabilizar por resonancia con los anillos bencílicos que se encuentran en posición β . Las fragmentaciones sucesivas de este compuesto siguen las reglas establecidas en la espectrometría de masas; estas pérdidas secuenciales se atribuyen a: i) CHO \rightarrow 29 m/z; ii) CH₂ \rightarrow 14 m/z; iii) CHNO \rightarrow 43 m/z; iv) CH₂ \rightarrow 14 m/z; v) C₆H₄ \rightarrow 76 m/z; vi) HCN \rightarrow 27 m/z y vii) C₂H₂ \rightarrow 26 m/z.

El patrón de fragmentación de la molécula de HTA -11 fue similar al de la HTA-2. Este compuesto tiene un sustituyente sulfurado en la posición beta al nitrógeno-1 principal del anillo hidantoínico, esto con la finalidad de observar una reacción positiva en los ensayos biológicos, sin embargo, no se tiene registro del empleo del sustituyente sulfurado en las hidantoínas, y por esto fue probado *in vivo* para observar las reacciones producidas en los roedores. Se observaron seis pérdidas de masas en los espectros: i) CHO \rightarrow 29 m/z, ii) N \rightarrow 14 m/z, iii) CSH \rightarrow 45 m/z, iv) C₆H₅ \rightarrow 76 m/z, v) HCN \rightarrow 27 m/z y vi) C₂H₂ \rightarrow 26 m/z. En la Figura se observa que el pico del ion molecular es el mismo el pico base lo que indica que la estabilidad de este fragmento es la más elevada dada su estabilidad en comparación a los otros fragmentos aquí generados. En relación a las diferentes energías de ionización se puede mencionar que ocurrieron de forma similar a las hidantoínas ya estudiadas, a medida que se disminuyó la energía de ionización, disminuyeron las abundancias relativas de los fragmentos en el detector del espectrómetro de masas, aun siendo esta última molécula la más grande y pesada de todos los compuestos aquí estudiados, se pudo observar que incluso a 40 eV se logró la fragmentación completa de dicho analito.

En relación a los parámetros evaluados en los animales para la estandarización de la dosis de pilocarpina, se presentan en la Tabla 2, en esta se puede observar que para las tres primeras dosis empleadas (50, 100 y 150) mg/Kg, se observaron un efecto leve en la aparición de los ataques convulsivos. Aparecieron los síntomas típicos del estrés epiléptico tales como piloerección y movimientos erráticos; sin embargo, no hubo pérdida del control de los esfínteres (salvo en la dosis de 150 mg/Kg), sin embargo, la fase *ictial* de la epilepsia no se manifestó considerablemente.

En la tabla se puede observar que los ataques convulsivos, se comenzaron a observar a partir de una dosis de 200 mg/Kg en los roedores, teniendo como evidencia la aparición de los síntomas típicos tales como piloerección, movimientos erráticos y pérdida del control de los esfínteres. En la dosis de 225 mg/Kg, se mantuvieron los parámetros observados en la dosis de 200, sin embargo, se observó en los animales una fase ictial fuerte. En la dosis de 250 mg/Kg, los animales se murieron a los pocos minutos de la administración de la pilocarpina, por lo que se decidió usar la dosis de 225 mg/Kg para probar el efecto profiláctico de los compuestos de hidantoínas a usar.

Los animales que se usaron para probar el efecto de la profilaxis de los compuestos sintetizados en el laboratorio de la Universidad, luego de transcurridos los 5 minutos de administrados los mismos, se les colocó la pilocarpina, los resultados de la prueba son presentados en la Tabla 3.

La prueba realizada permitió descartar ocho de los diez compuestos sintetizados en el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes, estos fueron descartados porque los animales presentaron manifestaciones adversas: vómitos sanguinolentos o ataques epilépticos fuertes y murieron. Se obtuvieron respuestas positivas de los compuestos HTA-4 y HTA-11, los animales vivieron por estos resultados en la prueba comprobatoria de los compuestos HTA- 4 y HTA-11.

Para la prueba comprobatoria se consideró el estado de físico para cada uno de los roedores con los que se experimentó considerándola MUY BUENA y MALA, caracterizada por la presencia de piloerección, movimientos erráticos, pérdida de control de esfínteres,

una prolongada fase ictial y hasta muerte, realizando el porcentaje de la condición física. Porcentaje del 100% ningún animal presentó malas condiciones, 0% todos los animales presentaron malas condiciones.

Al realizar la eutanasia de los animales se encontró que ninguno de los roedores usados en las pruebas realizadas presentó daños anatomopatológicos.

Discusión

La utilización de un modelo animal para la experimentación ha permitido la solución de muchos problemas de salud, la aplicación de las 3 R's en el desarrollo de la experimentación animal (Reemplazo, Reducción, Refinamiento), (15), permite desarrollar tratamientos o medicación para los problemas de salud de los seres humanos.

En los ensayos biológicos, especialmente en los que están involucrados animales de laboratorio, es necesario el planteamiento de una prueba piloto en la que se determina la viabilidad del experimento. La prueba piloto realizada permitió determinar la dosis del compuesto pilocarpina a usar en los animales de la experiencia para conocer la dosis que provocaba la convulsión en estos.

La administración de los diez compuestos sintetizados en el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes por el Prof. Gerzón Delgado, conllevó a descartar 8 de los compuestos y comprobar el efecto de dos de estos compuestos: HTA-2 y HTA-4, los resultados se consideraron positivos ya que los ataques epilépticos, los temblores, vómitos, saltos y la pérdida del control de los esfínteres disminuyeron, indicando que los mismos pueden ejercer normalmente su acción a través de una serie de mecanismos celulares en el cerebro, ya sea por medio de la activación o inactivación de receptores y canales iónicos que desencadenan lo que se conoce como "cascadas enzimáticas", que son las que al final activan las moléculas GABA en el caso de los anticonvulsivantes (16). Por los resultados obtenidos (Tabla 4), los compuestos que no tuvieron un efecto positivo en los roedores como es el caso de las tiohidantoinas, no tenían en su estructura anillos aromáticos, los cuales se considera que favorecen el reconocimiento

de la membrana de las células del cerebro atravesándola y produciendo el efecto anticonvulsivante.

El compuesto HTA-4 [5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina], tiene cierta similitud estructural con el HTA-2 (fenitoína), solo que éste tiene un sustituyente metílico en la posición 4 en uno de sus fenilos, lo que posiblemente permitió que los ataques epilépticos tardaran en aparecer, además de ser leves en comparación al fármaco comercial; esta modificación del esqueleto molecular puede producir una mejor reacción dentro del sistema de los individuos a los cuales les fue suministrado dicho compuesto, en virtud de que posiblemente los receptores que se encuentran a nivel extracelular reconocieron mejor estas moléculas las cuales funcionan como antiepilépticos.

Acciones similares puede haber ocurrido con el compuesto HTA-11 el cual hace que los síntomas de la epilepsia en los roedores sean menores que la HTA-4, en cuya estructura molecular la presencia del átomo de azufre en el esqueleto hidantoinico puede influir en el reconocimiento de este compuesto por los receptores que se encuentran a nivel extracelular lo que trae como consecuencia la disminución de los efectos de la epilepsia en los roedores.

No se puede concluir que la HTA-4 y la HTA-11 no producen daños o efectos secundarios no deseados a largo plazo, debido que aún no se realizaron los estudios de toxicidad crónica, ni toxicidad aguda, sin embargo en el estudio subagudo realizado, en los cuales los animales se mantuvieron 8 días vivos, se pudo observar que los mismos consumieron el alimento y el agua normalmente, su pelaje presentó apariencia normal y a nivel anatomopatológico no se observaron patologías, por lo que existe la posibilidad de que no produzcan efectos adversos a los individuos, necesariamente se continuará con las pruebas necesarias *in vivo* para tener la certeza de poder usar estos compuestos en seres humanos, buscando alternativas a la condición de epilepsia refractaria (17, 18).

Conclusiones

Se pudo determinar que de 10 compuestos con posibles propiedades anticonvulsivantes sintetizados en el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes pertenecientes al Grupo de las Hidantoínas, sólo dos 5,5-difenilhidantoina y 5,5-difenil-2-tiohidantoina, presentaron efecto protector en el bioensayo realizado con ratones BIOU:NMRI.

Tabla 1: Familia de compuestos en estudio.

N°	Nombre	Formula molecular	Masa molecular [g/mol]	Punto de fusión [°C]	Número de CAS
HTA 1*	Hidantoina	C ₃ H ₄ N ₂ O ₂	100,08	218-220	461-72-3
HTA 2**	5,5-difenilhidantoina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,27	293-295	57-41-0
HTA 3*	Acido-5-hidantoinacético	C ₅ H ₆ N ₂ O ₄	158,11	214-215	5427-26-9
HTA 4*	5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂	266,29	225-226	51169-17-6
HTA 5*	5-metilhidantoina	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114,10	148-152	616-03-05
HTA 6*	1-metilhidantoina	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	114,10	156-157	616-04-6
HTA 7*	5-metil-5-fenilhidantoina	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	190,20	199-201	6843-49-8
HTA 8*	5,5,-dimetilhidantoina	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128,13	174-177	201-051-3
HTA 9*	1,5,5-trimetilhidantoina	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	142,16	161-164	6851-81-6
HTA 10*	2-tiohidantoina	C ₃ H ₄ N ₂ OS	116,14	231	503-87-7
HTA 11*	5,5-difenil-2-tiohidantoina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ OS	268,34	239	21083-47-6

*Sintetizados en el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes por el Prof. Gerzón Delgado. ** Fármaco comercial.

Tabla 2: Parámetros evaluados

Dosis [mg/Kg]	Roedores	Piloerección	Movimientos	Pérdida de control de los esfínteres	Fase ictial	Muerte
50	Roedor # 1	Leve	Erráticos	No	No	No
	Roedor # 2	Leve	Erráticos	No	No	No
	Roedor # 3	Leve	Erráticos	No	No	No
100	Roedor # 4	Leve	Erráticos	No	No	No
	Roedor # 5	Leve	Erráticos	No	No	No
	Roedor # 6	Leve	Erráticos	No	No	No
150	Roedor # 7	Moderado	Erráticos	Si	Leve	No
	Roedor # 8	Moderado	Erráticos	Si	Leve	No
	Roedor # 9	Leve	Erráticos	Si	Leve	No
200	Roedor # 10	Fuerte	Sin control	Si	Moderado	No
	Roedor # 11	Fuerte	Sin control	Si	Moderado	No
	Roedor # 12	Fuerte	Sin control	Si	Moderado	No
225	Roedor # 13	Fuerte	Sin control	Si	Fuerte	No
	Roedor # 14	Fuerte	Sin control	Si	Fuerte	No
	Roedor # 15	Fuerte	Sin control	Si	Fuerte	No
250	Roedor # 16	Fuerte	Sin control	Si	Fuerte	Si
	Roedor # 17	Fuerte	Sin control	Si	Fuerte	Si
	Roedor # 18	Fuerte	Sin control	Si	Fuerte	Si

Tabla 3: Reacción de los roedores a los compuestos en estudio

Comp.	Ratón	Piloerección	Movimientos	Pérdida de control de los esfínteres	Fase icticial	Muerte
HTA-1*	R1	p**	S/C	p**	p**	M
	R2	p**	S/C	p**	p**	M
	R3	p**	S/C	p**	p**	M
HTA-2**	R1	p**	E	NP	NP	V
	R2	p*	E	NP	NP	V
	R3	p**	E	NP	NP	V
HTA-3*	R1	p*	S/C	p**	p**	M
	R2	p**	S/C	p**	p**	M
	R3	p**	S/C	p**	p**	M
HTA-4*	R1	p*	E	NP	NP	V
	R2	p*	E	NP	NP	M
	R3	p*	E	NP	NP	V
HTA-5*	R1	p**	S/C	p**	p**	M
	R2	p**	S/C	p**	p**	M
	R3	p**	S/C	p**	p**	M
HTA-6*	R1	p**	S/C	p**	p**	M
	R2	p**	S/C	p**	p**	M
	R3	p**	S/C	p**	p**	M
HTA-7*	R1	p*	E	p*	p**	M
	R2	p*	E	p*	p**	M
	R3	p*	E	p*	p**	M
HTA-8*	R1	p**	S/C	p**	p**	M
	R2	p**	S/C	p**	p**	M
	R3	p**	S/C	p**	p**	M
HTA-9*	R1	p**	S/C	p**	p**	M
	R2	p**	S/C	p**	p**	M
	R3	p**	S/C	p**	p**	M
HTA-10*	R1	p**	S/C	p**	p**	M
	R2	p**	S/C	p**	p**	M
	R3	p**	S/C	p**	p**	M
HTA-11*	R1	p*	E	NP	P	V
	R2	p*	E	NP	NP	V
	R3	p*	E	NP	NP	V

NP: No presentaron manifestaciones. **P:** Presentaron algunas manifestaciones de forma leve, es decir, con un tiempo no mayor de 5 minutos. **P*:** presentaron todas las manifestaciones con un tiempo no mayor de 5 minutos. **P**:** Presentaron todas las manifestaciones con un tiempo mayor de 5 minutos. **E:** Erráticos. **S/C:** Sin Control. **M:** Murieron. **V:** Vivieron. * - compuestos sintetizados en el laboratorio. ** - fármaco comercial

Tabla 4. Porcentaje (%) de la condición física de los animales usados en la prueba comprobatoria.

compuesto	MUY BUENA (%)	MALA (%)
HTA-2 **	47	47
HTA-4*	28	24
HTA-11*	25	29

*Sintetizados en el laboratorio de Cristalografía de la Universidad de Los Andes por el Prof. Gerzón Delgado. ** Fármaco comercial.

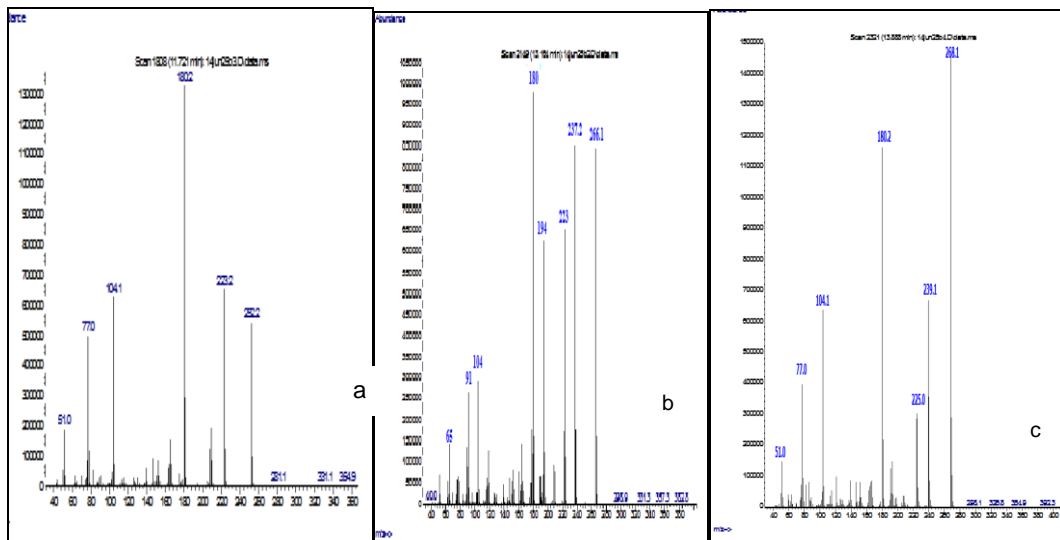


Figura 11: **a.** Análisis de masas de la HTA-2 a 60 eV. **b.** Análisis de masas de la HTA-4 a 60 eV. **c** Análisis de masas de la HTA-11 a 60 eV

Referencias

1. Martínez E. Fundamentos de toxicología ambiental. Toxicología Ambiental. (Colombia) Universidad Nacional, abierta y a distancia. 2011. p160.
2. Organización Mundial de la Salud: Epilepsia. Nota descriptiva N° 999, octubre del 2012. Consultado: 06 de enero 2016. Disponible en: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>.
3. Samaja G. Noveles heterociclos con actividad anticonvulsivante derivados del Myo-inositol y Ácido Valproico. Tesis doctoral. 2011. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Ciencias Biológicas, Argentina. p212.
4. Cook M, Lhatoo S. Epilepsy and Epileptic Seizures. Inglaterra. 2013. p1443.
5. Gutiérrez F, García G. Estado epiléptico convulsivo en el adulto. Evidencia Médica e Investigación en Salud. 2010. 3(1): 26-36.
6. Zavala C, López M. Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *eNeurobiología*. 2011. 2(4): 1-16.
7. Sampieri A, Rivera L, Zavala C. Modelos experimentales de la epilepsia del lóbulo temporal. *Acta Pediátrica de México*. 2014. 32 (5): 311-312.
8. Medel-Matus J, Medel-Matus R, Bermúdez-Ocaña D, Martínez-Quiroz J. El status epilepticus no modifica la memoria de trabajo en ratas de 21 días. 2012. *eNeurobiología*. 4(7):1-8.
9. Seijas E, Delgado G, Mora A, Bahsas A, Uzcategui J. Síntesis y caracterización de los derivados N-carbamoilo e Hidantoina de la L-prolin. *Avances en Química*. Mérida-Venezuela. 2006. 1 (6): 3-7.
10. de Oliveira S, da Silva J, Hernandes M, de Lima M, Galdino S, da Rocha P. Estrutura, reatividade e propiedades biológicas de hidantoínas. *Quimica Nova*. 31(3): 614-622.

11. Medina M. Síntesis y determinación de la estructura cristalina y molecular de derivados N-Carbamilo e Hidantoina de L-alanina. Tesis de Licenciatura, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, 2008. p24.
12. Chen H. End-Group analysis of blue light-emitting polymers using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2002. 74 (24): 6252–6258.
13. González R, Fernández J, Plaza P, Garrido A, Martínez J. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. 2007. *Revista Española de Salud Pública*. 81(5): 461-474.
14. Herrera-Vázquez O, Rojas, A. T., & Fleury, A. (2016). Neuroinflamación y epilepsia. 2016. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas*. 19(1): 24-31.
15. Mármol F. Ethical and legal considerations on the use of animals with experimental purpose. 2004. *Medicina Clínica*. 123(10):185-188.
16. Gutiérrez L. Regulación del receptor GABA A inducida por su activación en corteza cerebral de rata. Tesis Doctoral. 2013. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina. p 86.
17. Nariño D, Quintero R. Definición, clasificación y semiología del estado epiléptico. Conceptos actuales. 2011. *Acta Neurológica Colombiana*. 27(1): 2-10.
18. Zambrano T, Támara E, Ballestas J. Resistencia farmacológica en epilepsia. 2007. *Acta Neurológica Colombiana*. 23: 278-285.

Recibido: 23/10/16

Aceptado: 03/11/16