

EFFECTO PROTECTOR DE LA 5-ETIL,5-FENIL,2-PIRROLIDINONA Y DE LA 3,5,5-TRIMETILOXAZOLIDINA, 2,4-DIONA, CONTRA DOS CONVULSIVANTES: TIOSEMICARBAZIDA Y LA ADMINISTRACION SIMULTANEA DE FOSFATO DE PIRIDOXAL Y γ -HIDRAZIDA DEL ACIDO GLUTAMICO

RICARDO TAPIA I.,
HERMINIA PASANTES, MIGUEL PEREZ DE LA MORA,
BERTA G. ORTEGA y GUILLERMO MASSIEU H.*
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biología,
Universidad Nacional Autónoma de México

La intervención de los aminoácidos libres en la regulación de la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso central se ha considerado últimamente como una de sus funciones importantes en dicho tejido. El aminoácido más estudiado en este aspecto es el AGAB**^{21, 22, 23} al cual diversos autores atribuyen un papel moderador de dicha excitabilidad.^{16, 24} El mecanismo de destrucción del AGAB es su transaminación a semialdehído succínico por la correspondiente aminotransferasa.⁴ Los inhibidores de esta enzima *in vivo*, como la hidroxilamina o el ácido aminooxiacético exhiben notables propiedades anticonvulsivantes,^{6, 8, 23} aunque otros, como la HAG y la hidrazina no tienen estas propiedades.^{19, 27} Las sustancias mencionadas actúan muy probablemente a través de la captura de FP, cofactor de la ATAB, por copulación con el grupo carbonilo de su molécula, y todas ellas elevan marcadamente el nivel de AGAB total, analizado en el cerebro completo.^{3, 17, 19, 30}

En un trabajo anterior⁵ los autores diseñaron compuestos cíclicos como la EFP, poco polares, que al penetrar y abrirse en el tejido encefálico pueden teóricamente funcionar como análogos estructurales del AGAB, inhibir la ATAB y en consecuencia elevar la concentración del aminoácido y manifestar propiedades anticonvulsivantes. Efectivamente, la EFP mostró un notable efecto protector contra poderosos agentes convulsivantes, como

el electrochoque, el metrazol y la TSC, pero no afectó los niveles del AGAB analizado en el cerebro completo de ratón.⁵

De los antecedentes anteriores se puede concluir que no siempre una sustancia que eleve los niveles de AGAB cerebral por inhibición de la ATAB, es necesariamente un anticonvulsivante. Por otro lado, sustancias poco efectivas como inhibidores *in vivo* de la enzima mencionada, que no aumentan los niveles encefálicos de AGAB, como la EFP, pueden ser anticonvulsivantes efectivos. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que este compuesto incremente los niveles del aminoácido en ciertas regiones fundamentales de las neuronas, como son las vesículas de las terminaciones, e influir directamente en la transmisión nerviosa,^{7, 25} sin que esta acción se refleje en un aumento del AGAB encefálico total.

Con el fin de contribuir a resolver el problema de si las variaciones en los niveles de AGAB encefálico modifican o no la excitabilidad del tejido, en este trabajo se estudió si la acción de dos agentes convulsivantes, que actúan según todas las probabilidades por inhibición de la DAG (disminuyendo por lo tanto el nivel de AGAB), como son la TSC¹⁵ y la acción combinada de HAG y FP,¹⁸ era contrarrestada por dos anticonvulsivantes: la EFP y la TMD. Esta última droga tiene una acción anticonvulsivante contra el metrazol¹¹ tan notable como el EFP, aunque el mecanismo de su acción se desconoce. Se buscó además correlacionar los efectos de las sustancias mencionadas con los niveles de AGAB y otros aminoácidos libres del encefalo.

* Dirección actual: Instituto Politécnico Nacional.

** Las abreviaturas utilizadas en este trabajo son: EFP, 5-etil, 5-fenil, 2-pirrolidinona; TMD, 3, 5, 5-trimetiloxazolidina, 2, 4-diona; TSC, tiosemicarbazida; HAG, γ -hidrazida del ácido glutámico; FP, fosfato de piridoxal; AGAB, ácido γ -aminobutírico; ATAB, amino-transferasa γ -aminobutírica; DAG, descarboxilasa del ácido glutámico.

MATERIAL Y METODOS

En los experimentos se usaron ratones de la colonia local del Instituto de Biología, que pesaron entre 25 y 30 g. Todas las sustancias empleadas, excepto la EFP, fueron adquiridas comercialmente (la HAG de Calbiochem, la TSC de Eastman Kodak y la TMD de Abbot). La TMD se obtuvo a partir de cápsulas con excipiente, de nombre comercial Tridione, mediante precipitación del excipiente con éter etílico, filtración, evaporación del solvente y cristalización en frío en pentano o ciclohexano. El punto de fusión de la TMD así obtenida coincidió con el reportado para dicha sustancia en la literatura.²⁰ La EFP fue sintetizada en el laboratorio del Dr. Guillermo Carvajal.

Los animales se dividieron en cada experimento en varios grupos, de modo que se tuvieran al menos cuatro: *a*) grupo testigo (inyectado con solución salina 0.9%); *b*) tratado sólo con el convulsivante; *c*) tratado sólo con el anticonvulsivante; *d*) tratado con el convulsivante y el anticonvulsivante. Cuando fue necesario, según el número de drogas usadas, se incluyeron otros grupos. Todas las sustancias se administraron por vía intraperitoneal, a las dosis anotadas en la tabla 1. La TMD y la EFP se administraron inmediatamente después del tratamiento con HAG + FP, y 0.5 hr después de la inyección de TSC cuando la dosis de esta droga fue de 20 mg/kg. La TMD se administró inmediatamente después de la TSC cuando ésta se inyectó en dosis mayor (148 mg/kg). Los ratones que no murieron en convulsiones fueron sacrificados por decapitación, a los tiempos máximos indicados en las tablas de resultados correspondientes.

Inmediatamente después de la muerte de los animales en convulsiones o de su sacrificio, se extrajo rápidamente el encéfalo y se congeló en aire líquido o una mezcla de acetona-hielo seco. Después de homogeneización en alcohol al 80% en homogeneizadores tipo Potter-Elvehjem, las suspensiones de tejido resultantes se trataron según el mé-

TABLA 1

RELACION DE DOSIS EMPLEADAS ENTRE CONVULSIVANTES Y ANTICONVULSIVANTES

Convulsivantes			Anticonvulsivantes
TSC	20 mg/kg	} {	TMD 500 mg/kg
	148 mg/kg		
TSC	20 mg/kg	} {	EFP 80 mg/kg
HAG	80 mg/kg	} {	EFP 80 mg/kg
+ FP	50 mg/kg		
			TMD 500 mg/kg

todo de Awapara,¹ para obtener extractos acuosos libres de proteínas y lípidos. Una alícuota del extracto se corrió por duplicado en cromatografía bidimensional descendente en papel (solventes: fenol al 80% y butanol-ácido acético-agua, 4:1:1) para la separación de los aminoácidos libres. La cuantificación de cada aminoácido a partir de los cromatogramas, se realizó de acuerdo con el método colorimétrico de Naftalin.²⁰ Todo el proceso de determinación de aminoácidos libres en cerebro ha sido descrito con detalle en anteriores trabajos.^{5, 17}

RESULTADOS

En las figuras 1 y 2 se resumen y se comparan los efectos anticonvulsivantes obtenidos por la administración de EFP y de TMD, expresados como la relación del número de animales muertos en convulsiones entre el número total de animales tratados, y como el porcentaje de animales que murieron en convulsiones, antes de un tiempo determinado, escogido arbitrariamente. Como puede observarse, tanto la EFP como la TMD suprimieron totalmente la fase tónica de las convulsiones producidas por 20 mg/kg de TSC y disminuyeron casi totalmente el número de

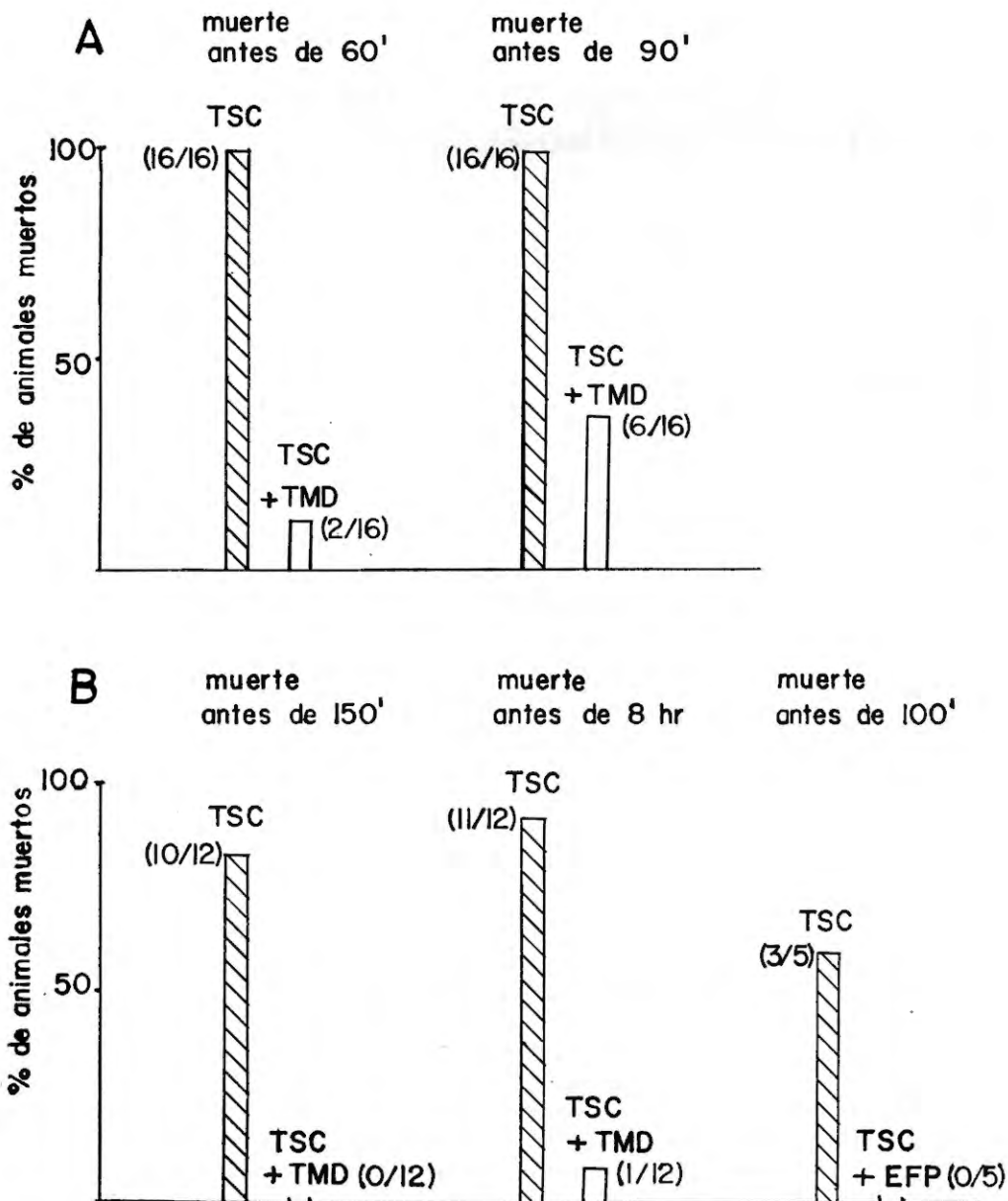


FIG. 1. Acción protectora de la TMD y de la EFP contra los efectos convulsivos de la TSC. Las columnas sombreada y blanca indican muertes con o sin convulsiones tónicas, respectivamente. Las relaciones anotadas entre paréntesis representan número de animales muertos/número total de animales tratados.

A: dosis de TSC, 148 mg/kg; dosis de TMD, 500 mg/kg.

B: dosis de TSC, 20 mg/kg; dosis de TMD, 500 mg/kg; dosis de EFP, 80 mg/kg.

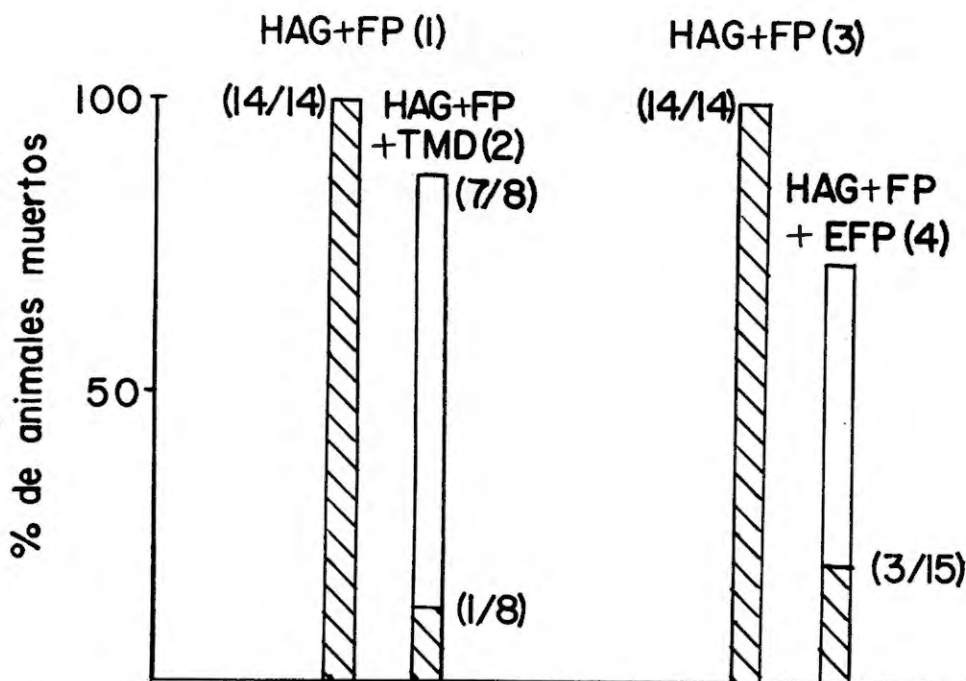


Fig. 2. Acción protectora de la TMD y de la EFP contra los efectos convulsivantes de la administración simultánea de HAG y FP. Las columnas sombreada y blanca indican muertes con o sin convulsiones tónicas, respectivamente.

Las relaciones anotadas entre paréntesis representan número de animales muertos/número total de animales tratados.

Tiempos promedio de supervivencia de cada grupo de animales:

(1): 34.1'	(28' — 37')	(3): 38.2'	(36' — 55')
(2): 44.9'	(38' — 45')	(4): 47.5'	(40' — 54')

muerres (fig. 1B). En el caso de la TMD el efecto fue aún muy notable cuando se aumentó varias veces la dosis de TSC (fig. 1A). En cuanto a los animales tratados con HAG + FP el efecto anticonvulsivante de ambas drogas fue mucho menor que contra la TSC, y se redujo simplemente a suprimir la fase tónica del estado convulsivo, sin que se observara disminución en el número total de muertes, aunque sí un ligero aumento en el tiempo de supervivencia de los animales que recibieron el anticonvulsivante (fig. 2).

En lo que se refiere a los aminoácidos libres (tablas 2 a 6), los animales que recibieron solamente el convulsivante mostraron el notable descenso de AGAB descrito ante-

riormente, tanto en el caso de la TSC¹⁵ como con HAG + FP.¹⁵ Es de hacerse notar que el efecto de la TSC sobre el nivel de AGAB fue mucho más intenso cuando se empleó la dosis mayor (148 mg/kg) de la droga, y que este hecho coincidió con la aparición de las convulsiones en un período de tiempo menor. La combinación HAG + FP inhibe más notablemente y más rápidamente que la TSC la actividad de la DAG,¹⁸ y consecuentemente el nivel de AGAB fue mucho menor, y las convulsiones aparecieron también en un tiempo mucho menor.

Mientras que la TMD aparentemente impidió el descenso de AGAB producido por 20 mg/kg de TSC (tabla 3), la EFP no afec-

TABLA 2

ALGUNOS AMINOACIDOS LIBRES DEL ENCEFALO DE RATONES TESTIGO Y DE RATONES TRATADOS CON TSC
(148 mg/kg), TMD (500 mg/kg) Y TSC + TMD

Aminoácido, mg/100 g	G R U P O S		
	TSC	TSC + TMD	TMD
<i>Animales muertos antes de 90 minutos</i>			
Ac. aspártico	67.7 ± 2.70 (16)	60.6 ± 3.91 (12)	70.4 ± 2.34 (12)
Ac. glutámico	272.8 ± 8.60 (16)	266.7 ± 4.75 (12)	268.9 ± 6.20 (12)
Glutamina	75.8 ± 2.50 (16)	83.1 ± 3.56 (12)	67.9 ± 2.44 (12)
AGAB	26.3 ± 1.51 (16)	19.4 ± 1.01 (12)	45.5 ± 2.82 (12)
<i>Animales muertos entre 120 y 150 minutos</i>			
Ac. aspártico	*	64.3 ± 2.80 (4)	64.1 ± 4.95 (4)
Ac. glutámico	*	275.0 ± 6.60 (4)	277.0 ± 17.0 (4)
Glutamina	*	80.5 ± 6.60 (4)	71.3 ± 1.85 (4)
AGAB	*	12.7 ± 1.10 (4)	48.7 ± 5.20 (4)
			72.1 ± 3.01 (12)
			267.6 ± 9.00 (12)
			73.1 ± 3.25 (12)
			45.3 ± 7.31 (12)
			67.8 ± 7.57 (4)
			282.0 ± 5.50 (4)
			71.8 ± 4.26 (4)
			38.8 ± 5.40 (4)

Los datos son promedios ± error "standard". Entre paréntesis se señala el número de animales en cada grupo.

* Ningún animal tratado con TSC sola sobrevivió más de 90 minutos.

TABLA 3

ALGUNOS AMINOACIDOS LIBRES EN EL ENCEFALO DE RATONES TESTIGO Y DE RATONES TRATADOS CON TSC (20 mg/kg), TMD (500 mg/kg) Y TSC + TMD

Aminoácido, mg/100 g	GRUPOS		
	TSC	TMD+TSC	NaCl 0.9%
<i>Animales muertos antes de 150 minutos</i>			
Ac. glutámico	272.8 ± 8.88 (5)	266.4 ± 3.38 (5)	282.8 ± 12.60 (5)
Glutamina	63.6 ± 7.00 (4)	52.0 ± 4.58 (4)	48.6 ± 1.48 (4)
AGAB	15.7 ± 1.58 (5)	24.9 ± 2.06 (5)	23.3 ± 1.10 (5)

Los datos son promedios ± error "standard". Entre paréntesis se señala el número de animales en cada grupo.

TABLA 4

ALGUNOS AMINOACIDOS LIBRES DEL ENCEFALO DE RATONES TESTIGO Y DE RATONES TRATADOS CON TSC (20 mg/kg) Y EFP (80 mg/kg)

Aminoácido, mg/100 g	GRUPOS		
	TSC	TSC+EFP	NaCl 0.9%
<i>Animales muertos antes de 150 minutos</i>			
Ac. aspártico	63.4 ± 2.78 (5)	59.5 ± 1.82 (5)	71.1 ± 2.25 (4)
Ac. glutámico	255.0 ± 7.49 (5)	252.0 ± 3.12 (5)	246.0 ± 5.59 (4)
Glutamina	86.1 ± 4.45 (5)	86.1 ± 3.68 (5)	72.8 ± 3.56 (4)
AGAB	27.9 ± 2.97 (5)	27.2 ± 1.40 (5)	33.8 ± 2.35 (4)

Los datos son promedios ± error "standard". Entre paréntesis se señala el número de animales en cada grupo.

TABLA 5

ALGUNOS AMINOACIDOS LIBRES EN EL ENCEFALO DE RATONES TESTIGO Y DE RATONES TRATADOS CON HAG + FP (80 mg/kg), (50 mg/kg) Y TMD (500 mg/kg)

Aminoácido, mg/100 g	GRUPOS			NaCl 0.9%
	HAG+FP	HAG+FP+TMD		
<i>Animales muertos antes de 90 minutos</i>				
Ac. aspártico	64.1 ± 2.24 (8)	58.5 ± 1.47 (8)		68.1 ± 3.11 (8)
Ac. glutámico	259.0 ± 2.30 (8)	249.0 ± 2.86 (8)		252.0 ± 3.41 (8)
Glutamina	73.1 ± 2.18 (8)	83.5 ± 1.61 (8)		67.1 ± 2.23 (8)
ACAB	11.5 ± 0.89 (8)	10.4 ± 0.37 (8)		31.1 ± 8.32 (8)

Los datos son promedios ± error "standard". Entre paréntesis se señala el número de animales en cada grupo.

TABLA 6

ALGUNOS AMINOACIDOS LIBRES DEL ENCEFALO DE RATONES TESTIGO Y DE RATONES TRATADOS CON HAG + FP (80 mg/kg), (50 mg/kg) y EFP (80 mg/kg)

Aminoácido, mg/100 g	GRUPOS			NaCl 0.9%
	HAG+FP	HAG+FP+EFP	EFP+FP	
<i>Animales muertos antes de 70 minutos</i>				
Ac. aspártico	67.0 ± 1.10 (12)	60.3 ± 1.55 (15)	71.8 ± 1.46 (9)	65.9 ± 1.8 (6)
Ac. glutámico	234.0 ± 1.93 (12)	224.0 ± 3.85 (13)	216.0 ± 8.80 (11)	242.0 ± 10.0 (6)
Glutamina	79.6 ± 2.84 (11)	84.0 ± 3.04 (13)	80.5 ± 1.65 (9)	73.8 ± 1.7 (6)
ACAB	10.7 ± 1.20 (10)	10.0 ± 1.33 (10)	23.7 ± 1.77 (8)	28.5 ± 3.3 (3)

Los datos son promedios ± error "standard". Entre paréntesis se señala el número de animales en cada grupo.

tó dicha disminución (tabla 4). Es de interés el hecho de que aunque los ratones que recibieron la dosis elevada de TSC y además TMD sobrevivieron más de 90 minutos, la concentración de AGAB en el encéfalo de estos animales fue menor aún que la de los que murieron en convulsiones tratados sólo con TSC (tabla 2). En cuanto a los ratones que recibieron HAG + FP como convulsivante, la concentración de AGAB en el cerebro fue igualmente baja en los animales tratados sólo con HAG + FP que en los que recibieron además EFP o TMD (tablas 5 y 6).

Por último, es importante señalar que ni la TMD ni la EFP⁵ alteraron las concentraciones de ninguno de los aminoácidos analizados en este trabajo, a las dosis empleadas de 500 mg/kg y 80 mg/kg, respectivamente, y que en ninguna de las condiciones experimentales se observó alteración significativa de los niveles encefálicos de ácido aspártico, ácido glutámico o glutamina.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo confirmaron y ampliaron los datos previamente obtenidos de que el tratamiento con EFP no afecta el nivel de AGAB total en el encéfalo. Este hecho parece indicar que este derivado de la pirrolidinona no altera en forma importante el metabolismo del aminoácido *in vivo*. No se puede excluir, sin embargo, la posibilidad de que la EFP modifique dicho metabolismo, y las concentraciones de AGAB, en zonas específicas del tejido encefálico.

El hecho de que la acción anticonvulsivante de la EFP sea menor cuando los niveles de AGAB en el cerebro son muy bajos, como en el caso de los ratones tratados con HAG + FP, parece indicar que, si bien un nivel alto de AGAB total no necesariamente se acompaña de disminución de la excitabilidad,^{2, 27} una muy baja concentración del aminoácido sí redunda en marcada hiperexcitabilidad. Si la disminución de AGAB encefálico no es muy intensa, como sucede en los animales tratados con TSC, el cambio en la

excitabilidad cerebral es menor y la acción anticonvulsivante de la EFP es más efectiva.

El aparente bloqueo producido por la TMD de la disminución de AGAB encefálico provocada por la TSC a dosis baja no parece significativo en cuanto a su relación con el efecto anticonvulsivante de la TMD, ya que dicho efecto se manifestó claramente, aun cuando el AGAB estaba muy disminuido por la administración de una dosis mucho mayor de TSC (fig. 1A y tabla 2). Así, la respuesta a la TMD de los animales tratados previamente con TSC o HAG + FP, muy similar a la obtenida con EFP en igualdad de condiciones, lleva también a la conclusión de que el efecto del anticonvulsivante mencionado no es a través de una acción directa sobre los niveles de AGAB encefálico o sobre su metabolismo. Sin embargo, basándose en los datos del presente trabajo no es posible descartar la posibilidad de que la actividad de alguna de las enzimas que intervienen en el metabolismo del aminoácido se encuentra alterada. De existir esta alteración, podría ser localizada en zonas específicas de las neuronas (terminaciones nerviosas) y no reflejarse de una manera cuantitativamente importante en el encéfalo completo.

De acuerdo con Elliott,^{9, 10} existe la posibilidad de que la relación entre la forma libre y la forma unida de AGAB, sea el verdadero indicador del estado de excitabilidad del tejido encefálico. Sin embargo, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio, indican que la EFP no modifica las concentraciones de ninguna de las dos formas de AGAB, analizadas en el encéfalo completo.²⁸ Existe también la posibilidad de que la EFP y la TMD afecten el metabolismo del ácido β -hidroxi- γ -aminobutírico, el cual, según varios autores,^{12, 13} es la sustancia directamente involucrada en la transmisión nerviosa en el encéfalo. Esta idea no ha sido generalmente aceptada, pese a que la sustancia en cuestión exhibe notables propiedades anticonvulsivantes.¹⁴

Es también difícil de interpretar el hecho de que la EFP y la TMD hayan suprimido las convulsiones tónicas pero no la muerte de los

animales, cuando éstos recibieron HAG + FP como convulsivante.

RESUMEN

Se investigó la acción anticonvulsivante de la 5-etil, 5-fenil, 2-pirrolidinona (EFP) y de la 3,5,5-trimetiloxazolidina, 2,4-diona (TMD) contra dos convulsivantes que disminuyen la concentración de ácido γ -aminobutírico (AGAB) en el encéfalo completo de ratón. Dicha concentración se analizó en los animales tratados con las sustancias mencionadas, con objeto de contribuir a aclarar si el nivel de AGAB encefálico tiene relación con la excitabilidad del sistema nervioso central. Con fines comparativos, se estudiaron también las concentraciones de ácido glutámico, ácido aspártico y glutamina en el tejido mencionado.

Los resultados pueden resumirse en la forma siguiente:

1) Se observó un notable efecto anticonvulsivante de la EFP y de la TMD contra la tiosemicarbazida (TSC). Este efecto no parece tener relación con el nivel de AGAB total en el encéfalo, el cual se encontró igual o mayormente disminuido en los animales tratados con el anticonvulsivante y TSC, que en los que recibieron solamente TSC.

2) Tanto la EFP como la TMD suprimieron la fase tónica de las convulsiones provocadas por la administración simultánea de γ -hidrazida del ácido glutámico (HAG) y fosfato de piridoxal (FP), pero no la muerte de los animales. En forma similar a lo que ocurrió con la TSC, el nivel de AGAB en el cerebro fue igualmente menor que en los testigos cuando se inyectó sólo HAG + FP que cuando, además, se inyectó el anticonvulsivante.

3) La administración de TMD sola no produjo ningún cambio sobre la concentración de los aminoácidos estudiados.

4) Los niveles encefálicos de ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina, prácticamente no sufrieron cambios en ninguna de las condiciones experimentales de este trabajo.

Según los resultados obtenidos, aparentemente el mecanismo de la acción anticonvulsivante de la EFP y de la TMD es similar, y no se puede explicar en función de la concentración total de AGAB en el cerebro, en las condiciones experimentales ensayadas.

SUMMARY

The anticonvulsant action of 5-ethyl, 5-phenyl, 2-pyrrolidinone (EPP) and of, 3, 5, 5-trimethyl-oxazolidine, 2, 4-dione (TMD) against two convulsant agents which produce a decrease in the total concentration of γ -aminobutyric acid (GABA) in mice brain was studied. This concentration was analysed in animals treated with the mentioned substances, in order to help to clarify the relationship, if any, between GABA levels in brain and the excitability of the central nervous system. With comparative purposes the concentrations of aspartic acid, glutamic acid and glutamine in the mentioned tissue were also studied.

The results obtained can be summarized as follows:

1) The GABA level in brain of mice treated with EPP or TMD and thiosemicarbazide (TSC) was either equally or more diminished than in animals treated only with TSC, although a remarkable anticonvulsant effect of both anticonvulsants was observed.

2) Both EPP and TMD suppressed the tonic convulsions induced by simultaneous administration of glutamic acid- γ -hydrazide (GAH) and pyridoxal phosphate (PALP), but they did not prevent the death of the animals. As in the case of TSC, the GABA level in brain of mice treated only with GAH plus PALP was equally diminished than in animals treated also with EPP or TMD.

3) TMD administrated to control animals did not affect the brain concentrations of the amino acids studied.

4) Aspartic acid, glutamic acid and glutamine levels in brain practically did not change in any of the experimental conditions of this work.

According to the results obtained, the mechanism of the anticonvulsant action of EPP and TMD is apparently similar, and it can not be accounted for an alteration in total brain GABA concentration.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AWAPARA, J. 1948. Application of paper chromatography to the estimation of the amino acids in tissues. *Arch. Biochem.* 19, 172.
2. BAXTER, C. F. and E. ROBERTS. 1960. Demonstration of thiosemicarbazide induce convulsions in rats with elevated brain levels of γ -amino butyric acid. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 104, 426.
3. BAXTER, C. F. and E. ROBERTS. 1960. The elevation of gamma-aminobutyric acid in rat brain with hydroxylamine. In: *Inhibition in the Nervous System and gamma-aminobutyric Acid.* (Ed. by Roberts E.), p. 358.
4. BESSMAN, S. P., J. ROSSEN and E. C. LAYNE. 1953. γ -Aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain. *J. Biol. Chem* 201, 385.
5. CARVAJAL, G., M. RUSSEK, R. TAPIA and G. MASSIEU, 1964. Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of γ -aminobutyric- α -ketoglutaric acid transaminase. *Biochem. Pharmacol.* 13, 1059.
6. DA VANZO, J. P., M. E. GREIG and M. A. CRONIN. 1961. Anticonvulsant properties of amino-oxyacetic acid. *Am. J. Physiol.* 201, 833.
7. DE ROBERTIS E., G. RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, L. SALGANICOFF, A. PELLEGRINO DE IRALDI and L. M. ZIEHER. 1963. Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings. *J. Neurochem.* 10, 225.
8. EIDELBERG E., C. F. BAXTER, E. ROBERTS and C. A. SALDIAS. 1960. Anticonvulsant properties of hydroxylamine and elevation of cerebral γ -aminobutyric acid. In: *Inhibition in the Nervous System and γ -aminobutyric Acid.* (Ed. by Roberts E.) Pergamon Press Oxford, p. 365.
9. ELLIOTT, K. A. C. 1960. In: *Inhibition in the Nervous System and γ -aminobutyric Acid.* (Ed. by Roberts E.) Pergamon Press, Oxford, p. 260.
10. ELLIOTT, K. A. C. 1960. In: *The Neurochemistry of Nucleotides and Amino Acids.* (Ed. by Brady R. O. and Tower D. B.) John Wiley & Sons, Inc. New York, p. 153.
11. EVERETT, G. M. and R. K. RICHARDS. 1944. Comparative anticonvulsive action of 3,5,5-trimethyl-oxazolidine-2, 4-dione (Trimetadione, Tri-dione), Dilantine and phenobarbital. *J. Pharmacol. & Exper. Therap.* 81, 402.
12. HAYASHI, T. 1960. Comparison of inhibitory action of γ -aminobutyric acid and β -hydroxy- γ -amino butyric acid on the motor system of higher animals. In: *Inhibition in the Nervous System and γ -aminobutyric Acid.* (Ed by Roberts E.) Pergamon Press, Oxford, p. 515.
13. HAYASHI, T. and K. NAGAI. 1956. Action of omega-aminoacids on the motor cortex of higher animals, specially gamma-amino-beta-hydroxy-butyric acid as the real inhibitory principle in brain. *Abstr. Commun. XX Internat. Physiol. Congr.*, p. 410.
14. HAYASHI, T. and K. NAGAI. 1961. Complete cure of natural epilepsy of dogs by β -hydroxy- γ -aminobutyric acid introduced into their ventricles. In: *Nervous Inhibition* (Ed. by Florey E). Pergamon Press, Oxford, p. 389.
15. KILLAM, K. F. and J. BAIN. 1957. Convulsant hydrazides I. *In vitro* and *in vivo* inhibition of enzymes catalyzed by vitamine B₆. *J. Pharmacol & Exper. Therap.* 119, 255.
16. LOVELL, R. A. and K. A. C. ELLIOTT. 1963. The γ -aminobutyric acid and Factor I content of brain. *J. Neurochem.* 10, 479.
17. MASSIEU, G. H., R. TAPIA I. and B. G. ORTEGA. 1962. Free amino acids in brain of mice treated with L-glutamic acid- γ -hydrazide. *Biochem. Pharmacol.* 11, 976.
18. MASSIEU, G., H. R. TAPIA I., H. O. PASANTES and B. G. ORTEGA. 1964. Convulsant effect of L-glutamic acid- γ -hydrazide by simultaneous treatment with pyridoxal phosphate. *Biochem. Pharmacol.* 13, 118.
19. MAYNERT, E. W. and H. K. KAJI. 1962. On the relationship of brain γ -aminobutyric acid to convulsions. *J. Pharmacol. & Exper. Therap.* 137, 114.
20. NAFTALIN, N. A. 1948. Quantitative chromatographic estimation of amino acids. *Nature* 161, 763.
21. ROBERTS, E. 1960. Biochemical Maturation of the Central Nervous System. En: *The Central Nervous System and Behaviour.* J. Macy Jr. Foundation, New York, p. 127.
22. ROBERTS, E. Editor. 1960. *Inhibition in the Nervous System and Gamma-aminobutyric Acid.* Pergamon Press, Oxford.
23. ROBERTS, E., C. F. BAXTER and E. EIDELBERG. 1960. Some aspects of cerebral metabolism and physiology of γ -aminobutyric acid. In: *Function and Structure of the Cerebral Cortex.* (Schadé, J. P. Ed.), Elsevier Press, Amsterdam, p. 392.
24. ROBERTS, E., J. WEIN and G. D. SIMONSEN. 1964. γ -aminobutyric acid (GABA), vitamin B₆ and neuronal function. A speculative Synthesis. In: *Vitamins and Hormones.* Academic Press New York, p. 504.
25. SALGANICOFF, L. and E. DE ROBERTIS. 1965. Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and γ -aminobutyric acid cycles in rat brain. *J. Neurochem.* 12, 287.
26. SPIELMAN, M. A. 1944. Some analgesic agents derived from oxazolidine, 2, 4-dione. *J. Amer. Chem. Soc.* 66, 1244.
27. TAPIA I., R., G. MASSIEU H. H. PASANTES y B. G. ORTEGA, 1963. Modificaciones del patrón de aminoácidos libres en el encéfalo

- de animales tratados con γ -hidrazida del ácido L-glutámico y dosis convulsivantes de algunas drogas. II Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, p. 1 del Libro de la Reunión.
28. TAPIA I. R. y M. PEREZ DE LA MORA. Resultados no publicados.
29. TOWER, D. B. 1957. Glutamic acid and γ aminobutyric acid in seizures. *Clin. Chim. Acta*, 2, 397.
30. WALLACH, D. P. 1960. The inhibition of γ aminobutyric- α -ketoglutaric transaminase *in vitro* and *in vivo* by amino-oxy-acetic acid. *Biochem Pharmacol.* 5, 323.