

EFECTO DEL ACIDO GAMMA AMINO-OXIBUTIRICO SOBRE LAS CONVULSIONES Y LA TRANSAMINASA DEL ACIDO GAMMA AMINOBUTIRICO

Fernando Vega Díaz**
Fernando Vega Rasgado*
Carlos Wong Ramírez**

INTRODUCCIÓN

En 1950 Roberts y Awapara independientemente descubrieron el ácido gamma aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso central de organismos vertebrados.^{1,2} Evidencias neurofisiológicas, farmacológicas y bioquímicas han permitido establecer que el GABA es un neurotransmisor inhibitorio importante en la regulación de la excitabilidad neuronal.^{3,4,5}

Según los estudios metabólicos realizados por Roberts y Frankel, el GABA se forma por la descarboxilación del ácido l-glutámico, catalizada por la descarboxilasa de este aminoácido (GAD) y luego se transamina con el ácido alfa-cetoglutarático por medio de la transaminasa del GABA (T-GABA), para dar semialdehído succínico y l-glutámico.^{6,7} El semialdehído succínico se oxida a ácido succínico que ingresa al ciclo de Krebs.⁸ Tanto la GAD como la T-GABA son enzimas dependientes de fosfato de piridoxal.^{6,8}

La participación del GABA en el mecanismo de las convulsiones fue observada, entre otros, por Killam y Bain en 1957, cuando administraron a ratas dosis convulsivamente de tiosemicarbazida (TS). La aparición de las convulsiones coincidía con la disminución en los niveles cerebrales del GABA por inhibición de la GAD⁹; este hallazgo condujo a tratar de buscar sustancias que aumentaran los niveles del GABA por inhibición de la

T-GABA y su posible efecto anticonvulsivo. Baxter y Roberts encontraron que la hidroxilamina, a dosis no letales, aumentó el GABA en varias áreas del cerebro de ratas¹⁰ por inhibición selectiva de la T-GABA, y además protegió de las convulsiones inducidas por electrochoque y metrazol.¹¹

Poco tiempo después, Wallach en 1960 reportó que el ácido amino-oxiacético (AAOA) también era un inhibidor poderoso *in vitro* de la GAD y de la T-GABA, pero *in vivo* y bajas dosis, inhibía preferencialmente a la T-GABA, aumentando de 4-6 veces los niveles cerebrales del GABA,¹² antagonizando las convulsiones inducidas por metrazol, tiosemicarbazida y la sulfoximina de la metionina,^{13,14} pero si el AAOA se administra a dosis altas, produce convulsiones por inhibición de la GAD.¹⁵

La hidroxilamina y el ácido amino-oxiacético tienen en común ser atrapadores de grupos carbonilo, por lo que se cree que su efecto inhibitorio sobre las enzimas se deba a que reaccionan con el fosfato de piridoxal.¹⁶ Dada la importancia de estos hallazgos, se continuó la búsqueda de otras drogas que actuaran sobre las enzimas del metabolismo del GABA, encontrándose que el ácido beta-amino-oxipropiónico (AAOP) homólogo inmediato superior del AAOA, inhibía a la T-GABA *in vitro* con mayor intensidad que el AAOA y sin embargo, no poseía ningún efecto anticonvulsivo, ni aumentaba los niveles del GABA en el cerebro, probablemente por no atravesar la barrera hematoencefálica por su polaridad, pues la presencia de un metileno adicional, impide su ciclización,

* Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

** Becarios de la DEDICT-COFAA y apoyado por la DEPI del I.P.N.

como se piensa que ocurre con el AAOA.¹⁷

No obstante las apreciaciones anteriores, nos pareció de interés estudiar cuál sería el efecto del ácido gamma-amino-oxibutírico (AAOB), *in vitro* e *in vivo*, sobre la GAD y la T-GABA, así como su actividad farmacológica en las convulsiones in-

ducidas por la tiosemicarbazida, el metrazol y la estricnina. El ácido amino-oxibutírico, además de ser homólogo inmediato superior del ácido beta amino-oxipropiónico, se le puede considerar como un análogo estructural del GABA, como puede apreciarse en la figura 1.

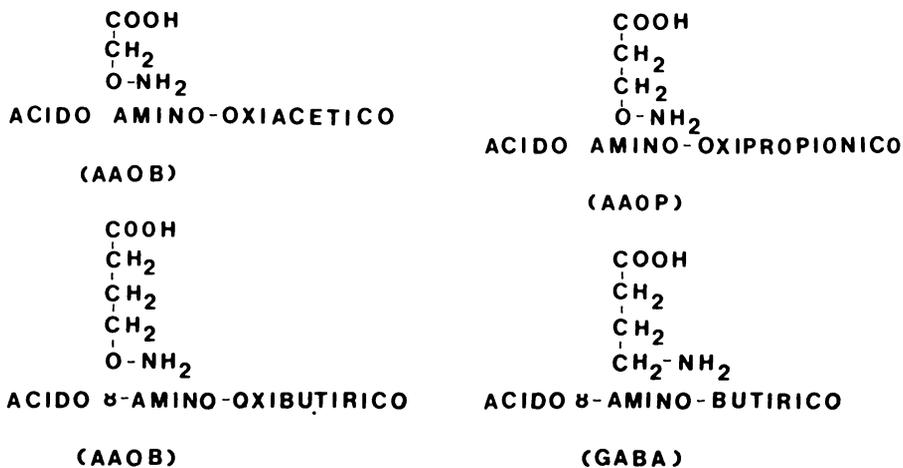


FIG. 1. Relaciones estructurales entre el ácido alfa-amino-butírico y amino-oxi-análogos.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención del ácido gamma-amino-oxibutírico

Este compuesto se obtuvo mediante el método de Gilson y cols.¹⁸ y consiste en hacer reaccionar gamma-butirolactona con la oxima de la benzofenona, para dar el ácido N-difenilmetiliden-amino-oxibutírico, el cual se hidroliza con HCl al 18%, obteniéndose el ácido gamma-amino-oxibutírico en forma de clorhidrato, con un punto de fusión de 138-139°C, que corresponde a este compuesto.

- a) *Animales*. Se usaron ratones machos de la cepa CF-1 de 1-2 meses de edad y 22-27 gramos de peso.
- b) *Convulsivantes*. Como agentes convulsivantes se emplearon: tiosemicarbazida a dosis de 20 mg/kg de peso; metrazol a 90 mg/kg de peso y estricnina a 2.0 mg/kg de peso. Las dos primeras sustancias se disolvieron en solución salina al 0.9% y la estricnina en HCl 0.001 M. La administración se hizo por vía intraperitoneal (IP).

- c) *Gamma-amino-oxibutírico*. Esta sustancia se administró disuelta en solución salina al 0.9% por vía IP de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Diferentes dosis de AAOB. A 5 grupos de 10 ratones cada uno, se les inyectó dosis de 50-100-150-200 y 400 mg/kg de peso respectivamente del AAOB, y se observó el efecto durante 24 horas. Se hicieron 2 determinaciones.

AAOB a diferentes dosis y tiosemicarbazida. Se hicieron 6 grupos de 10 ratones cada uno y 5 de los cuales recibieron dosis de 50-100-150-200 y 400 mg/kg de peso del AAOB respectivamente, e inmediatamente tiosemicarbazida a 20 mg/kg de peso. El 6o. grupo sirvió de testigo y se les inyectó solución salina al 0.9% y tiosemicarbazida. Se observó la mortalidad y la protección ejercida por el AAOB.

Dosis fija de AAOB y tiosemicarbazida a diferentes tiempos. Se formaron 5 grupos de 10 ratones cada uno y a todos se les pone dosis de 100 mg/kg de peso de AAOB. Al primer grupo se le inyecta inmediatamente tiosemicarbazida y se considera como tiempo 0 (cero) y a los demás a dife-

rentes intervalos de tiempo, es decir, a 0.5; 1.0; 2.0 y 3.0 horas después del AAOB. Un grupo adicional recibió primero la tiosemicarbazida y 0.5 horas después el AAOB; a los testigos se les inyectó solución salina al 0.9% y tiosemicarbazida.

AAOB a diferentes dosis y metrazol. A los 5 grupos de 10 ratones cada uno se les administró diferentes dosis del AAOB, o sea, 20-50-100 y 200 mg/kg de peso respectivamente y 15 minutos después se les aplicó metrazol a dosis de 90 mg/kg de peso a cada uno de los grupos. Al grupo testigo se le administró solución salina al 0.9% y metrazol.

Dosis fija del AAOB y metrazol a diferentes tiempos. Se hicieron 5 grupos de 10 ratones cada uno, a los cuales se les administró 100 mg/kg de peso de AAOB y a cada grupo se les inyecta metrazol a 90 mg/kg de peso a intervalos de 30, 60, 90, 180 y 360 minutos respectivamente.

AAOB a diferentes dosis y estriquina. Se administraron dosis de 50-100 y 200 mg/kg de peso de AAOB a 3 grupos de 10 ratones cada uno y a los 15 minutos se les inyectó estriquina a dosis de 2.0 mg/kg de peso. Un grupo testigo recibió solución salina al 0.9% y estriquina.

Determinaciones enzimáticas

Las determinaciones consistieron en medir la actividad enzimática en los homogeneizados de cerebro de ratón de la transaminasa del GABA y de la descarboxilasa del ácido glutámico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Transaminasa del GABA: método general

Se emplea 1.0 ml del homogeneizado de cerebro de ratón al 20% en regulador de fosfatos 0.05 M y pH 8.0 al cual se le agregan 0.5 ml de GABA y 0.5 ml de alfa-cetoglutarico, ambos 0.5 M y se completa el volumen a 2.5 ml con el regulador de fosfatos. La mezcla de reacción se incubaba a 37°C por 30 min., al cabo de los cuales se le agrega 2.0 ml de HClO₄ 0.6 M para detener la reacción; se centrifuga en frío a 2000 rpm y se filtra. El glutámico formado por transaminación se determina espectrofotométricamente a 340 nm con NAD⁺ y deshidrogenasa glutámica (GDH), de acuerdo con el método de Bernt y Beergmyer.¹⁸

- a) *In vitro.* Siguiendo el método descrito se determinó el efecto *in vitro* del AAOB sobre la actividad de la T-GABA, añadiendo al medio de transaminación concentraciones finales de 1.0×10^{-5} M; 1.0×10^{-4} M y 1.0×10^{-3} M de AAOB. Esta actividad se compara con la de los testigos sin AAOB.
- b) *In vivo.* Para la determinación del efecto *in vivo* del AAOB sobre la actividad de la T-GABA, se inyectó AAOB a dosis de 100 mg/kg de peso a 4 grupos de 5 ratones cada uno, los cuales se van sacrificando por decapitación a los 30, 60 y 180 minutos y el último grupo 24 horas después. Los cerebros se extraen, se congelan en hielo seco-acetona y homogenizan en frío para centrifugar, continuando con el método descrito. La actividad de la T-GABA se compara con la obtenida de ratones inyectados con solución salina al 0.9% en lugar de AAOB.

Descarboxilasa del l-glutámico

El efecto del AAOB sobre la actividad *in vitro* e *in vivo* de la GAD, se determinó por la técnica gasométrica de Warburg, midiendo el desprendimiento de CO₂ cada 10 minutos, durante 1 hora de incubación a 37°C y en atmósfera de nitrógeno.

- a) *In vitro.* La actividad *in vitro* de la GAD se hizo con homogeneizados de cerebros de ratón al 20% en regulador de fosfatos 0.06 M y pH 6.3 y glutámico 0.1 M para el grupo control. A los grupos problema se les añadió concentraciones finales de 1.0×10^{-5} M; 1.0×10^{-4} M y 1.0×10^{-3} de AAOB antes que el sustrato.
- b) *In vivo.* La actividad de la GAD *in vivo* se determinó inyectando a un grupo de ratones AAOB con una dosis de 100 mg/kg de peso y a intervalos de 30, 60, 120 y 180 minutos se fueron sacrificando por decapitación y los cerebros extraídos en frío se homogenizan y centrifugan en regulador de fosfatos 0.06 M de pH 6.3. A los sobrenadantes se les determina la actividad de la GAD con glutámico 0.1 M como sustrato y se compara con la de los ratones testigos que se les inyectó solución salina al 0.9% en lugar del AAOB.

Determinación del GABA

Los niveles del GABA se determinaron 30 mi-

nutos después de haberse inyectado una dosis de 100 mg/kg de peso de AAOB, homogeneizando los cerebros con etanol al 75% y extrayendo los lípidos con cloroformo, se concentra la fase acuosa, la cual se aplica en papel cromatográfico y se separa el GABA en butanol: acético: agua en proporción de 4:1:5, revelándose con ninhidrina al 0.5% en acetona. Finalmente las manchas se eluyen con etanol al 75% y se leen a 512 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios previos han consignado que el ácido amino-oxiacético (AAOA) a bajas dosis, tiene efecto anticonvulsivo contra la tiosemicarbazida,²⁰ el metrazol y la estricnina,²¹ pero a dosis altas origina convulsiones²² y ambos efectos se relacionan con los niveles cerebrales del GABA por inhibición de la T-GABA o de la GAD. En el caso del ácido beta-amino-oxipropiónico (AAOP), aunque *in vitro* inhibe a la T-GABA, no es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica, ni tiene efecto anticonvulsivo.

En lo que respecta al ácido gamma amino-oxibutírico (AAOB), en la figura 2 se observa que la administración de dosis crecientes del AAOB produce convulsiones y muerte y que el fosfato de piridoxal, a dosis de 50 mg/kg de peso, protegió de la mortalidad, pero no de las convulsiones, a los animales que recibieron una dosis de 400 mg/kg de peso del AAOB. Cabe señalar que este efecto es similar al producido por el AAOA.

También se puede apreciar en la figura 3 que el AAOB, a partir de 50 mg/kg de peso, protegió de la mortalidad convulsiva inducida por la tiosemicarbazida cuando se administran en forma simul-

tánea, aunque la mayor protección se obtuvo con 100 mg/kg del AAOB. El tiempo de administración entre el AAOB y la tiosemicarbazida juega un papel importante en el efecto anticonvulsivo, ya que, como se muestra en la figura 4, mientras más tiempo pasa entre la administración del AAOB y la tiosemicarbazida, el efecto tiende a disminuir y al cabo de 3 horas ya no existe ninguna protección.

De acuerdo con estos resultados, todo parece indicar que el AAOB, a diferencia con el AAOP, sí penetra la barrera hematoencefálica como queda de manifiesto por la aparición de las convulsiones y su efecto sobre la mortalidad convulsiva inducida por la tiosemicarbazida; sin embargo, es menos potente que el AAOA en una relación de 2:1, probablemente por penetrar menos al cerebro. Los valores de los pK obtenidos por Garret para el AAOA y el AAOP le permitieron sugerir que el AAOA forma una estructura cíclica de 5 átomos de carbono mediante puentes de hidrógeno, que le resta polaridad a la molécula y facilita su penetración, lo cual no ocurriría con el AAOP por presentar un grupo metileno adicional.²³ En el caso del AAOB existiría el mismo impedimento, al menos que, siendo la molécula más flexible, permitiera su ciclización; sin embargo ofreceremos otras posibilidades. Los resultados del AAOB sobre las convulsiones inducidas por el metrazol y la estricnina no se presentan debido a que no hubo ninguna protección y solamente se observa un aumento en el periodo de latencia con el metrazol como se ve en la tabla 1. Otros autores han informado un efecto similar con el AAOA y el metrazol.²⁴

TABLA 1. Efecto del ácido gamma amino-oxibutírico sobre el tiempo de aparición de convulsiones y muertes inducidas por el metrazol.

Tratamiento	Dosis: mg/kg	Tiempo aparición convulsiones: seg.	% convulsiones	% muertes
Metrazol	85	75	100	40
Amino-oxibutírico + Metrazol	100 85	225	100	30

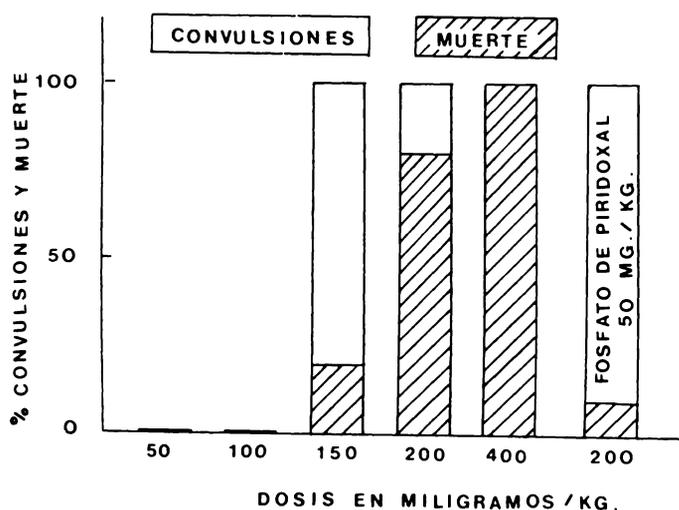


Fig. 2. Efecto de diferentes dosis del ácido α -amino-oxibutírico.

Fig. 3. Efecto de diferentes dosis de ácido α -amino-oxibutírico sobre la mortalidad inducida por tiosemicarbazida.

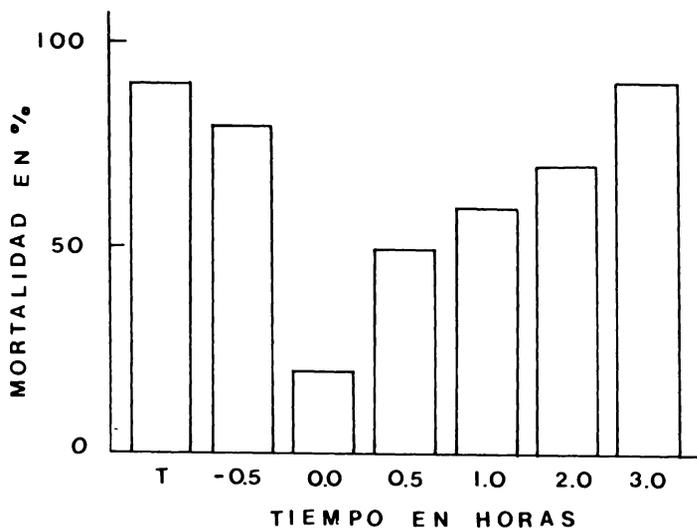
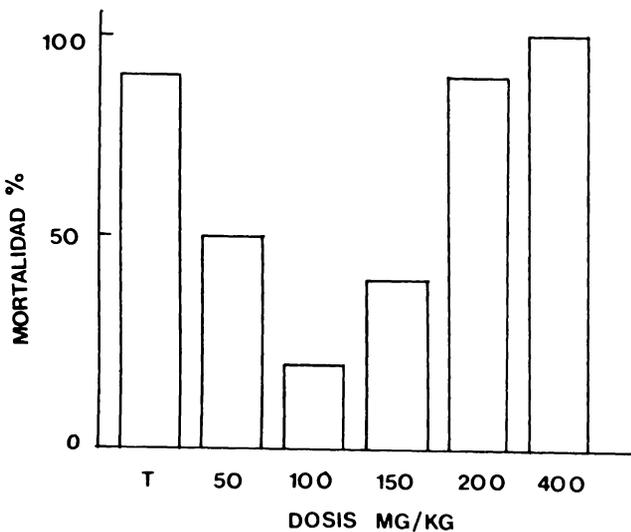
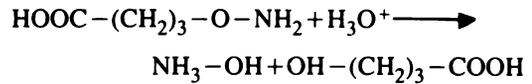


Fig. 4. Efecto del ácido α -amino-oxibutírico sobre la mortalidad inducida por la tiosemicarbazida administrada a diferentes tiempos.

Desde el punto de vista enzimático, el AAOB inhibió *in vitro* e *in vivo* a la transaminasa del GABA (T-GABA) y, como se muestra en la figura 5, concentraciones finales de 1×10^{-3} y 1×10^{-4} M de AAOB, inhibió *in vitro* a la T-GABA en 100 y 50% respectivamente y dejó de inhibir a 1×10^{-5} M. *In vivo* la administración intraperitoneal de 100 mg/kg de AAOB inhibió a la T-GABA hasta un 100% 30 minutos después de administrado, y aunque recupera 25% de su actividad a los 60 minutos, la inhibición se mantiene durante 3 horas y comienza a desaparecer como se observa en la figura 6. Este comportamiento coincide con el efecto anticonvulsivo del AAOB frente a la tiosemicarbazida, que fue de 3 horas (figura 4) y además, con un incremento del 50% en los niveles del GABA paralelamente a la inhibición de la T-GABA.

Es posible que el modo de acción del AAOB sea semejante al del AAOA, es decir, como atrapador del grupo carbonilo del fosfato de piridoxal, sin embargo, el requerimiento de altas dosis pudiera deberse a su menor penetración al cerebro con respecto al AAOA, o bien que el AAOB sufra la beta-oxidación de Knoop de los ácidos grasos y se convierta en AAOA, lo cual daría la mitad de la dosis administrada del AAOB, es decir, 100 mg/kg de peso del AAOB equivaldría a 50 mg/kg de peso del AAOA. Este razonamiento es compatible con los resultados obtenidos, pero requiere comprobación experimental.

Por último, cabría la posibilidad de que el AAOB produzca hidroxilamina y gamma hidroxibutírico, de acuerdo con la siguiente reacción:



habiéndose reportado que la gamma hidroxibutírico y su lactona poseen propiedades depresoras del sistema nervioso central,^{25,26} y la hidroxilamina, conocido inhibidor de la T-GABA.

En la figura 7 se muestra que el AAOB, *in vitro*, fue capaz de inhibir a la GAD de los homogeneizados de cerebro de ratón en forma considerable, o sea, 100 y 80% con 1×10^{-3} y 1×10^{-4} M respectivamente de AAOB; sin embargo *in vivo*, a la dosis anticonvulsiva empleada de 100 mg/kg, el AAOB no inhibió a la GAD en ninguno de los intervalos de tiempo que se estudiaron, según se aprecia en la figura 8. Este resultado concuerda con el que se ha reportado para el AAOA, el cual, a dosis anticonvulsiva, no afecta la actividad de la GAD de cerebro de ratón.²⁷

En conclusión, independientemente del mecanismo por el cual el AAOB ejerza su efecto anticonvulsivo e inhibidor de la T-GABA y de la GAD, introducimos una nueva sustancia que puede ser de utilidad en la comprensión de los mecanismos que gobiernan la neurotransmisión mediada por el GABA.

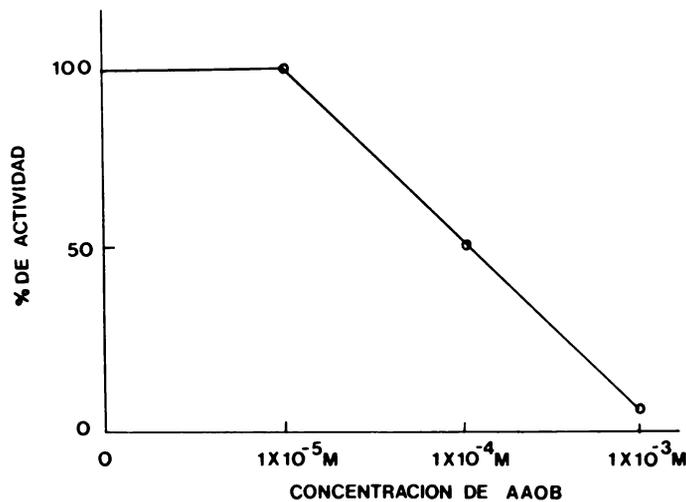


Fig. 5. Efecto *in vitro* del ácido α -amino-oxibutírico (AAOB) sobre la actividad de la transaminasa del GABA de cerebro de ratón.

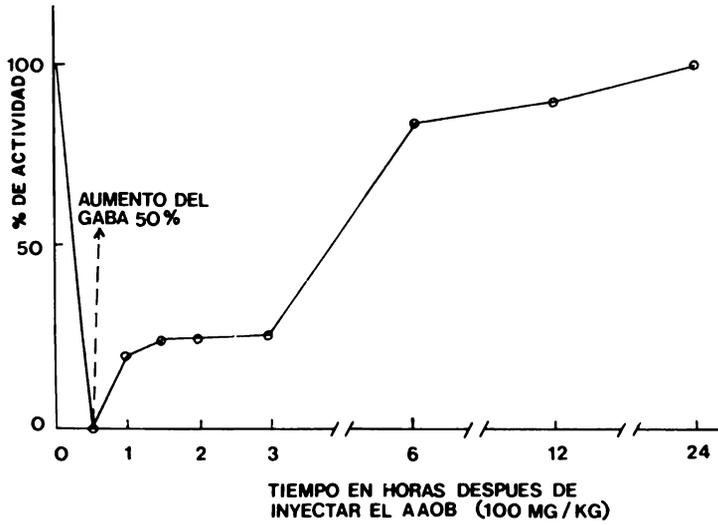


Fig. 6. Efecto *in vitro* del ácido α -amino-oxibutírico (AAOB) sobre la actividad de la transaminasa del GABA de cerebro de ratón.

Fig. 7. Efecto *in vitro* del ácido α -amino-oxibutírico (AAOB) sobre la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) de cerebro de ratón.

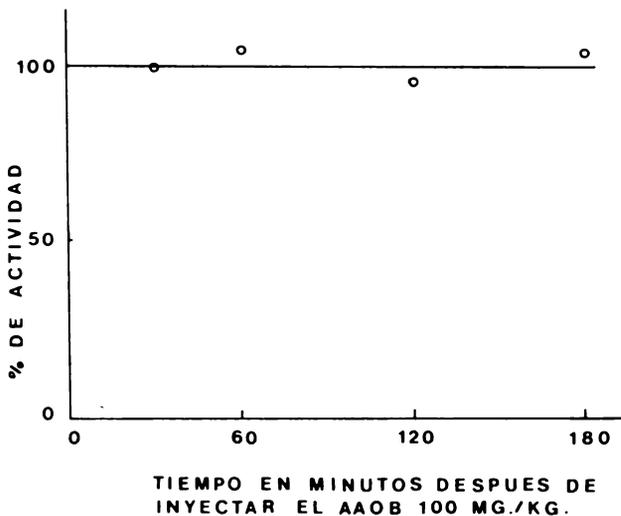
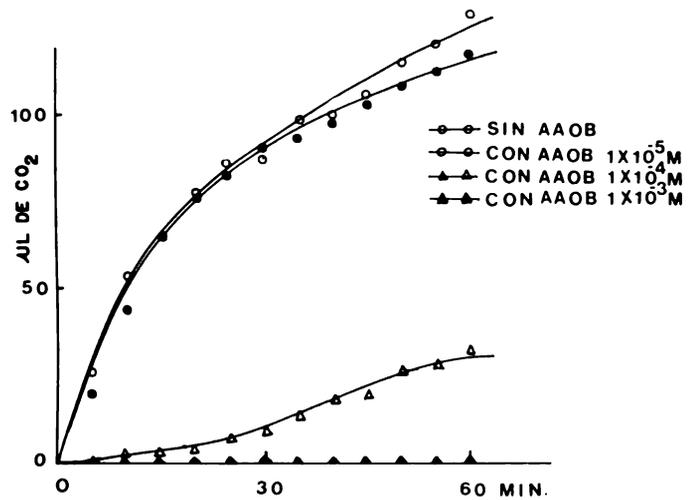


Fig. 8. Efecto *in vitro* del ácido α -amino-oxibutírico (AAOB) sobre la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico de cerebro de ratón.

RESUMEN

La hidroxilamina y el ácido amino-oxiacético tienen propiedades anticonvulsivas derivadas de su capacidad de aumentar los niveles cerebrales del ácido gamma aminobutírico (GABA), por inhibición de la transaminasa de este aminoácido (T-GABA). La hidroxilamina y el ácido amino-oxiacético (AAOA) son atrapadores de grupos carbonilo, por lo que se cree que su efecto se debe a que reaccionan con el fosfato de piridoxal, que es la coenzima de la T-GABA y de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). El ácido beta-amino-oxipropiónico (AAOP), homólogo inmediato superior del AAOA, inhibe a la T-GABA *in vitro*, pero no *in vivo* y por lo tanto no posee propiedades anticonvulsivas por no aumentar los niveles cerebrales de GABA, se piensa que el AAOP no penetra la barrera hematoencefálica debido a su polaridad. Sin embargo, en este trabajo se informa que el ácido gamma amino-oxibutírico (AAOB) homólogo inmediato superior del AAOP, sí penetra dicha barrera, ya que a bajas dosis protege de la mortalidad convulsiva inducida por la tiosemicarbazida y a dosis altas origina convulsiones.

Asimismo, el AAOB inhibió a la T-GABA tanto *in vitro* como *in vivo* y a la GAD solamente *in vitro*. Es posible que actúe de manera similar al AAOA, directa o indirectamente, a través de alguna transformación metabólica. Se ofrecen dos alternativas.

SUMMARY

The hydroxylamine and the amino-oxycetic acid have an anticonvulsive action derived from their capacity to increase the cerebral gamma aminobutyric acid (GABA) level, by inhibiting the transaminase of this aminoacid (T-GABA). The hydroxylamine and the amino-oxycetic acid (AAOA) are trappers of carbonyl groups, thereby it is believed that their effect is due to the fact of reacting with the pyridoxal phosphate which is the coenzyme of the T-GABA and of the glutamic acid decarboxylase (GAD). The B-amino-propionic acid (AAOP), the immediate superior homologous of AAOP, inhibits the T-GABA *in vitro* but not *in vivo* and therefore does

not have anticonvulsive action because it does not increase GABA cerebral levels; it is thought that AAOP does not pass the hematoencephalic barrier due to its polarity. Nevertheless, it is informed in this work that the gamma amino-oxibutyric acid (AAOB) the immediate superior homologous of AAOP does penetrate such barrier, since at a low dose protects from thiosemicarbazide induced convulsive mortality, and at a high dose causes convulsions.

However, the AAOB inhibited the T-GABA *in vitro* as *in vivo* and the GAD only *in vitro*. It is possible that it acts in a similar manner to AAOA, directly or indirectly, through some metabolic transformation. Two alternatives are offered.

BIBLIOGRAFIA

1. Awapara, J., Landua, A.J., Fuertes, R. y Seale, B., 1950. "Free-gamma. Aminobutyric acid in brain". *J. Biol. Chem.*, 187, 35-39.
2. Roberts, E. y Frankel, S., 1950. "Aminobutyric acid in brain; Its formation from glutamic acid". *J. Biol. Chem.*, 187, 55-63.
3. Johnston, G.A.R., 1978 "Neuropharmacology of Amino Acid Inhibitory Transmitter". En: *Ann. Rev. Pharmacol.*, Vol. 18, 269-289, Palo Alto, Calif.
4. Curtis, D.R. y Johnstons, G.A.R., 1970. "Amino acid transmitter". En: *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 4 (A. Lajtha, ed.) p. 115-134, Plenum Press, N.Y.
5. Tapia, R., 1975. "Biochemical Pharmacology of GABA in CNS". En: *Handbook of Psychopharmacology* (L.L. Iversen: S.D. Iversen y S.N. Snyder, ed.), Plenum Press, N.Y., Vol. 4, p. 1-58.
6. Roberts, E. y Frankel, 1951 "Glutamic decarboxylase in brain". *J. Biol. Chem.*, 190, 505-512.
7. Bessman, S.P.; Rossen, J. y Layne, E.C., 1953. "Gamma-aminobutyric acid glutamic acid transamination in brain". *J. Biol. Chem.* 201, 385-391.
8. Albers, R.W. y Salvador, R.A., 1958. "Succinic semialdehyde oxidation by a soluble dehydrogenase from brain". *Science*, 128, 359-361.
9. Killam, K.F. y Bain, J.A., 1957. "Convulsant hydrazides *in vitro* and *in vivo* inhibition of vitamin B₆ enzymes by convulsant hydrazides". *J. Pharmacol. Exp.*, 119, 255-262.
10. Baxter, C.F. y Roberts, E., 1959. "Elevation of gamma-aminobutyric acid in brain with hydroxylamine". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 101, 811-827.

11. Baxter, C.F. y Roberts, E., 1961. "Elevation of gamma-aminobutyric acid in brain. Selective inhibition of gamma aminobutyric alpha-ketoglutaric acid transaminase". *J. Biol. Chem.*, 236, 3287-3294.
12. Wallach, D.P., 1960. "The inhibition of gamma-aminobutyric-alfa-keto-glutaric transaminase *in vitro* and *in vivo* by amino-oxyacetic acid". *Biochem. Pharmacol.*, 5, 166-167.
13. Da Vanzo, J.P., Craig, M.E., Cronian, M.A., 1961. "Anticonvulsant properties of amino-oxyacetic acid". *Am. J. Physiol.*, 201, 833-841.
14. Roa, P.D., Tews, J.K. y Stone, E., 1964. "A neurochemical study of thiosemicarbazide seizures and their inhibition by amino-oxyacetic acid". *Biochem. Pharmacol.*, 13, 477-487.
15. Tapia, R., Pasantes, H., Pérez de la Mora, Ortega, B.G. y Massieu, G., 1967. "Free amino acids and glutamate decarboxylase activity in brain of mice during drug-induced convulsions". *Biochem. Pharmacol.*, 16, 483-496.
16. Baxter, C.F., 1969. "Changes in Gamma-Aminobutyric acid shunt enzymes and substrates after administration of carbonyl reagent and vitamin B₆ *in vivo*. An apparent discrepancy in assay technique". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 166, 267-280.
17. Roberts, E., Wein, J., y Smolsen, D.G., 1964. "Gamma. Aminobutyric acid (GABA), Vitamin B₆ and Neuronal Function. A speculative synthesis". En: *Vitamins and Hormones* (Harris, R. y Col. Ed.), Acad. Press, N.Y. Vol. 22, p. 503.
18. Gilson, C., Knobler, Y. y Sheradsky, T., 1967. "Synthesis of W-Aminooxy acids by oxygen-alkyl fission of lactones". *Tetrahedron.*, 22, 4441.
19. Bernt, E. y Bergmeyer, U., 1963. "L-Glutamate determination with glutamic dehydrogenase". En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. Ed.) Acad. Press., N.Y., p. 384.
20. Murakami, Y., Abe, M., y Murakami, K., 1976. "Anticonvulsant activity of amino-oxyacetic acid on convulsions induced by thiosemicarbazide". *J. Neurochem.*, 26, 655-656.
21. Wood, J.D., y Peesker, S.J., 1973. "The role of GABA metabolism in the convulsant and anticonvulsant actions of aminooxyacetic acid". *J. Neurochem.* 20, 379-387.
22. Wallach, D.P., 1961. "Studies on the GABA pathway I. The inhibition of gamma-aminobutyric-alfa-ketoglutaric acid transaminase *in vitro* and *in vivo* by U-7524 (amino-oxyacetic acid)". *Biochem. Pharmacol.* 5, 323-331.
23. Garret, E.R., 1962. "Characterization and mode of degradation of the neurophysiologically important transaminase inhibitors, the alfa-Aminooxyalkonic acid". *J. Phar. Sci.*, 51, 572.
24. Wood, J.D., Peesker, S.J., 1975. "The anticonvulsant action of GABA elevating agents: A re-evaluation". *J. Neurochem.*, 25, 277-82.
25. Laborit, H., Jovany, J.M., Gerard, J., Fabiani, F., 1960. "Résumé d' une étude expérimentale et clinique. Sur un substrat métabolique a action centrale inhibitrice. Le 4-idroxybutyrate de Na". *Presse Med.*, 68, 1867-1869.
26. Mitoma, C. y Neubauer, S.E., 1968. "Gamma hydroxybutyric acid and Sleep". *Experientia.*, 24, 12-13.
27. Kuriyama, K., Roberts, E. y Rubinstein, M.K., 1966. "Elevation of gamma-aminobutyric acid in brain with amino-oxyacetic acid and susceptibility to convulsive seizures in mice: A quantitative re-evaluation". *Biochem. Pharmacol.*, 15, 221-236.