

LA 4-ETIL-4-FENIL-BUTIROLACTONA, NUEVO FARMACO ANTICONVULSIVO, Y SUS RELACIONES CON EL METABOLISMO DEL GABA

Fernando Vega Díaz * +
Lourdes Vega Rasgado * ^a
Ricardo Yáñez Avila ** +

RESUMEN

Debido a que presentan actividad anticonvulsiva y a que algunos derivados se encuentran ya en pruebas clínicas, es importante determinar el efecto de: gama-butirolactona, 4-etil-4-fenil-butirolactona y gama-hidroxi-gama-etil-gama-fenil-butiramida, fármacos depresores del sistema nervioso central, sobre los niveles del GABA en cerebro de ratón y las enzimas ligadas directamente con su metabolismo, la transaminasa del GABA y la descarboxilasa del ácido-L-glutámico, para determinar el mecanismo de su acción.

Los resultados obtenidos con estos fármacos en las condiciones descritas indican que no afectan los niveles de GABA y no inhiben a la transaminasa del GABA ni a la descarboxilasa del ácido L-glutámico, lo que sugiere que el mecanismo de acción del efecto anticonvulsivo podría deberse a que estos fármacos actúen como agonistas GABAérgicos de los receptores tipo A pre o postsinápticos, o por interacciones con otros neurotransmisores.

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad muy antigua, existen informes que describen este padecimiento 2,000 años antes de Cristo. Los griegos la definían como una enfermedad sagrada de origen

sobrenatural. En la Edad Media se consideraba resultado de posesiones demoniacas. Sin embargo, Hipócrates (460 años a. de J.C.) ya la consideraba como una enfermedad debida a alteraciones cerebrales.

Aunque la epilepsia no se puede reportar con un alto índice de mortalidad, sí constituye un problema social de gran importancia. Se considera que sólo en los EE.UU. de Norteamérica el número de epilépticos es superior a 500,000.

La epilepsia es un padecimiento incapacitante, progresivo que dificulta la integración del enfermo a la sociedad y a labores productivas. Para

* Laboratorio de Neuroquímica, Depto. de Bioquímica, ENCB, IPN.

+ Becario de la DEDICT-COFAA y apoyado por DEPI, IPN.

** Departamento de Bioquímica y Sección de Graduados de la ESM, IPN.

^a Forma parte de la tesis profesional.

lograr una terapia racional de la enfermedad es necesario conocer su etiología a nivel molecular y con base en ella proponer alternativas farmacológicas.

El conocimiento de la función del ácido gamma-amino-butírico (GABA) en la regulación de la fisiología del sistema nervioso central (SNC) en los vertebrados, ha sido fundamental para entender el origen de las convulsiones epilépticas y para desarrollar nuevos fármacos anticonvulsivos. El GABA parece ser el neurotransmisor más abundante en el cerebro de los mamíferos. Se considera que del 20 al 50% de las sinapsis presentes en el SNC son GABAérgicas. La abundancia y ubiquidad de este neurotransmisor ha dificultado definir sus funciones específicas. Sin embargo, en los últimos años se ha relacionado con la epilepsia y otros trastornos neurológicos. Killam y Bain (1957)¹² observaron la relación que existía entre la disminución de la concentración cerebral del GABA y la aparición de convulsiones. De esta observación surgió la idea de desarrollar fármacos anticonvulsivos que incrementaran los niveles del GABA en el encéfalo, ya que la administración exógena del GABA no era eficaz porque su polaridad lo incapacitaba para atravesar la barrera hematoencefálica. Killam (1957)¹² demostró que la administración de tiosemicarbazida inducía convulsiones en los animales de experimentación debido a la disminución que se producía en los niveles del GABA, ya que inhibe a la descarboxilasa del ácido L-glutámico (DAG). Este efecto convulsígeno se debe a la inactivación del fosfato de piridoxal por la hidrazida. La inhibición de las enzimas dependientes de la vitamina B₆ por hidrazidas se demostró experimentalmente tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos experimentos se basaron en estudios previos de Roberts y Frankel,²³ quienes describieron la biosíntesis del GABA a partir de la descarboxilación del ácido L-glutámico. Posteriormente otros investigadores (Albers y Bessman, 1953)^{1,5} describieron la vía catabólica, que se inicia con la transaminasa del GABA (T-GABA) la cual lleva a cabo la transaminación del GABA con el ácido alfa-ceto-glutámico transformándose el GABA en semialdehído succínico, el que se oxida a ácido succínico por acción de una deshidrogenasa dependiente de NADP, y en esta forma ingresa al ciclo de Krebs donde

se oxida hasta CO₂ y H₂O.

El conocimiento del metabolismo del GABA fue de gran utilidad, pues permitió encontrar fármacos como la hidroxilamina y el ácido aminooxiacético (AAOA) capaces de inhibir a la T-GABA, aumentar los niveles de GABA y proteger de las convulsiones inducidas por ciertos agentes químicos.^{3,9,22,31} El valproato de sodio, empleado en el tratamiento de la epilepsia, también es un inhibidor de la T-GABA, lo mismo que la gabaculina y ambos protegen de las convulsiones inducidas por electrochoque.^{14,17,21}

En México, el doctor G. Carvajal del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del IPN, ha contribuido de manera importante al diseño de nuevos fármacos anticonvulsivos, como la gamma-hidroxi-gama-etil-gama-fenil-butiramida (HEPB), que bloquea las convulsiones inducidas por metrazol, tiosemicarbazida, bicuculina, 4-aminopiridina, ácido mercaptopropiónico y electrochoque; recientemente ha desarrollado otros análogos, siendo el más prometedor la hidroxi-etil-fenil propionamida (HEPP). Estos fármacos han pasado con éxito todas las etapas de evaluación preclínica y actualmente se encuentran en la 2a. etapa de evaluación clínica. Es probable que éste sea el primer fármaco desarrollado totalmente en México. Sin embargo, a pesar de sus evidentes propiedades anticonvulsivas, no se ha demostrado que aumenten los niveles de GABA,^{6,20,16,18} por lo que su mecanismo de acción aún está por aclararse.

También en el laboratorio de neuroquímica del Departamento de Bioquímica de la ENCB se ha participado en la búsqueda de nuevos fármacos con actividad anticonvulsiva^{26,27,30} y en artículos previos se reportaron las propiedades anticonvulsivas e hipnóticas de la 4-etil-4-fenil-butirrolactona (EFBL).^{28,29} Este compuesto posee características estructurales semejantes a la gama-butirrolactona (GBL) y la etil-fenil-pirrolidinona (EPP). Hace varios años se informó que la GBL y el ácido gama-hidroxi-butírico¹⁰ poseían propiedades depresoras del sistema nervioso central, consistente en sueño y anestesia,^{25,15,19} mientras que la EPP, que puede considerarse el GABA ciclizado con sustituyentes etilo y fenilo, posee propiedades anticonvulsivas,⁶ por lo que se creyó de interés introducir los radicales

etilo y fenilo a la GBL, con la posibilidad adicional de que su hidrólisis *in vivo* produciría el ácido gama-etil-gama-fenil-butírico, semejante al HEPB de Carvajal.

La GBL no presenta propiedades anticonvulsivas pero sí hipnóticas,¹⁵ mientras que la EFBL además de proteger de las convulsiones inducidas por el metrazol, tiosemicarbazida y bicuculina²⁸ resultó mejor hipnótico que la GBL y menos tóxica que el HEPB.²⁹ Por lo general, cuando un nuevo fármaco tiene propiedades anticonvulsivas se desea conocer su modo de acción, y lo primero que se estudia es su efecto sobre los niveles encefálicos del GABA y las enzimas que intervienen en su metabolismo. Por esta razón, en este trabajo se estudia el efecto de la EFBL y sus congéneres, la GBL y el HEPB sobre los niveles del GABA de cerebro de ratón a diferentes tiempos de administración y previa inhibición de la T-GABA con el AAOA y sobre la DAG y T-GABA *in vitro* como *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratones machos de la cepa CF-1 entre 20 y 25 gramos de peso y de 1-2 meses de edad, donados por el Instituto de Virología del Sector Salud. Antes de los experimentos los ratones se mantuvieron sin ninguna restricción alimentaria.

Fármacos

Los fármacos que se estudiaron fueron: gama-butirolactona (GBL) de la Casa Aldrich, EUA; gama-etil-gama-fenil-butirolactona (EFBL), sintetizada en el laboratorio de Neuroquímica del Depto. de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB); gama-hidroxi-gama-etil-gama-fenil-butiramida (HEPB), proporcionada por el doctor G. Carvajal del Depto. de Bioquímica de la ENCB del IPN; ácido amino-

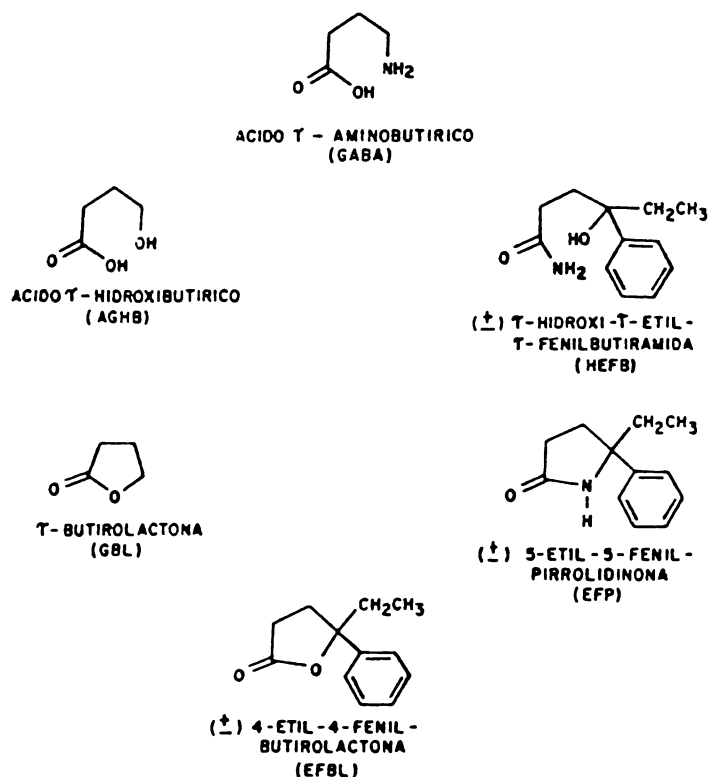


Figura 1. Estructura química del ácido γ -aminobutírico y algunos compuestos análogos.

oxiacético (AAOA), de la casa Sigma, EUA. Las lactonas GBL y EFBL se disolvieron en aceite de cacahuete; el HEPB y F-HEPB en agua caliente. Todos los fármacos se administraron por la vía intraperitoneal.

Determinación del gama aminobutírico

Procesamiento

Los ratones se sacrifican por decapitación los cerebros se extraen, pesan y homogeneizan en etanol al 80%; se centrifuga a 3,000 rpm y el residuo se lava con dos porciones de 1 ml de etanol al 75% y se vuelve a centrifugar. Los sobrenadantes se juntan, se les agregan 30 ml de cloroformo, se agita vigorosamente y se centrifuga a 5,000 rpm. La capa hidroalcohólica superior se extrae y se evapora a sequedad, añadiendo al residuo 1 ml de agua destilada; se toma una alícuota de 0.1 ml y se usa para la cuantificación enzimática del GABA.

Cuantificación enzimática del GABA

La determinación enzimática del GABA se lleva a cabo poniendo en las celdas 2.5 ml de regulador de pirofosfato de potasio 0.1 M pH 8.6; 0.15 ml de NADP 0.004 M pH 7.0, 0.2 unidades de GABASA (es el nombre comercial, SIGMA-G 7509, de una mezcla enzimática que transforma al GABA en semialdehído succínico y posteriormente a ácido succínico utilizando NADP como coenzima) y 0.1 ml de la muestra que contiene el GABA. Se lee la densidad óptica inicial a 340 nm y se agregan 0.15 ml de ácido alfa-cetoglutárico 0.02 M pH 7.9 y se continúa leyendo la densidad óptica hasta que ya no cambie, esta lectura es la densidad óptica final. Se calcula el contenido del GABA multiplicando la diferencia entre las densidades ópticas final e inicial por el volumen total de la mezcla de reacción (3 ml) y se divide entre el coeficiente de extinción molar del NADP.

Determinación del efecto de los fármacos sobre los niveles del GABA

Se hicieron seis grupos de cinco ratones cada uno, el primero actúa como testigo y a los otros se les inyecta: al grupo 2, EFBL a dosis de 300 mg/kg de peso; al grupo 3, EFBL a una dosis

de 600 mg/kg de peso; al grupo 4, HEPB a una dosis de 120 mg/kg de peso; al grupo 5, F-HEPB a una dosis de 100 mg/kg de peso y al grupo 6, AAOA a una dosis de 40 mg/kg de peso. Los ratones se sacrificaron por decapitación una hora después de administrar los fármacos, los cerebros se extrajeron, pesaron y homogeneizaron en etanol al 80% y se determinó el contenido de GABA por el método descrito.

Determinación en el tiempo del efecto de los fármacos sobre los niveles del GABA

A tres grupos de 24 ratones cada uno se administraron respectivamente dosis de 350 mg/kg de peso de GBL, 120 mg/kg de peso de HEPB y 300 mg/kg de peso de EFBL respectivamente. A las 1,2,4,6,12 y 24 horas después de la administración se sacrificaron cuatro ratones de cada grupo y se determinó el contenido de GABA en cerebro.

Determinación del efecto de los fármacos sobre los niveles de GABA, previa inhibición de la T-GABA con AAOA

Se hicieron siete grupos de cinco ratones cada uno, incluyendo el grupo testigo. A dos grupos se les administró 40 mg/kg de peso de AAOA y se sacrificaron una y dos horas después respectivamente, otro grupo recibió 120 mg/kg de peso de HEPB y se sacrificó una hora después, a otro grupo se le administró 40 mg/kg de peso de AAOA y una hora después 120 mg/kg de peso de HEPB y se sacrificó dos horas después de la primera administración del AAOA. Los últimos dos grupos recibieron 300 y 600 mg/kg de peso de EFBL.

Determinación del efecto de los fármacos sobre la actividad de la transaminasa del GABA

Se determinó el efecto de la GBL, EFBL, y HEPB sobre la actividad de la T-GABA, tanto *in vitro* como *in vivo*:

a) *In vitro*. Se empleó 1 ml del homogeneizado de cerebro de ratón al 20% en regulador de fosfatos 0.05 M pH 8.0 y se agregó 0.5 ml de solución de GABA y 0.5 ml de solución de ácido alfa cetoglutárico, ambos 0.5 M, pH 8.0 y 0.5 ml de regulador de fosfatos. La mezcla de reacción se incubó durante una hora a 37°C y la reacción

se detuvo con 2.0 ml de HC10₄ 0.6 M; se centrifugó en frío y se filtró. El ácido glutámico formado en la transaminación se determina espectrofotométricamente a 340 nm con NAD y deshidrogenasa glutámica (GDH), de acuerdo con el método de Vernt y Beermeyer.⁴ El efecto *in vitro* de los fármacos sobre la transaminasa del GABA (T-GABA) se determinó midiendo la actividad de la enzima sola y añadiendo al medio de reacción, concentraciones finales de GBL 10⁻² M y 10⁻³ M, EFBL 10⁻² M, 10⁻³ M y 10⁻⁴ M, y HEPB 10⁻² M y 10⁻³ M; el AAOA como fármaco de referencia a 1 × 10⁻⁴ M.

b) *In vivo*. Para la determinación del efecto *in vivo* de los fármacos se hicieron ocho grupos de cinco ratones cada uno. A estos grupos se les inyectó lo siguiente: grupo I, el disolvente de los fármacos; grupo II, EFBL a la dosis de 300 mg/kg de peso; grupo III, GBL a la dosis de 300 mg/kg de peso; grupo IV, HEPB a la dosis de 100 mg/kg de peso; grupo V, tiosemicarbazida a la dosis de 20 mg/kg de peso; grupo VI, tiosemicarbazida a la dosis de 20 mg/kg de peso y simultáneamente EFBL a una dosis de 300 mg/kg de peso; grupo VII tiosemicarbazida a la dosis de 20 mg/kg de peso y simultáneamente GBL a una dosis de 300 mg/kg de peso; grupo VIII tiosemicarbazida a una dosis de 20 mg/kg de peso y simultáneamente HEPB a una dosis de 100 mg/kg de peso.

Todos los grupos de ratones se sacrificaron una hora después de la administración de los fármacos, los cerebros se congelaron a -70°C antes de homogeneizarlos para hacer la determinación de la transaminasa del GABA (T-GABA).

Determinación del efecto de los fármacos sobre la actividad de la descarboxilasa del ácido L-glutámico (DAG)

El efecto de la GBL, EFBL y HEPB sobre la actividad de la descarboxilasa del L-glutámico de cerebro de ratón se determinó por el método gascométrico de Warburg, midiendo el desprendimiento de CO₂ cada 10 minutos durante una hora de incubación a 30°C y en atmósfera de nitrógeno:

a) *In vitro*. El medio de la reacción contenía 2 ml de homogeneizado de cerebro de ratón al 20% en regulador de fosfatos 0.5 M pH 6.5 y 0.2 ml de L-glutámico 0.1 M para el grupo con-

trol. La GBL se añadió al homogeneizado antes que el ácido L-glutámico a una concentración final de 10⁻³ M. La EFBL se añadió a tres concentraciones finales: 10⁻² M, 10⁻³ M y 10⁻⁴ M; el HEPB solamente a 1 × 10⁻³ M.

b) *In vivo*. Sólo se midió el efecto de la EFBL inyectando a cuatro grupos de cinco ratones cada uno, una dosis de 300 mg/kg de peso y que se sacrificaron a los 30 minutos los ratones del grupo 1, y así sucesivamente se sacrificaron los demás grupos a los 60, 90 y 120 minutos. Los cerebros, se congelaron pesaron y homogenizaron en regulador de fosfatos 0.5 M y se determinó la actividad de la DAG como se mencionó previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por muy gratificante que sea aportar un nuevo fármaco con propiedades anticonvulsivas o anticonvulsivantes, la satisfacción es incompleta mientras no se pueda explicar su mecanismo de acción y este es el caso de los productos estudiados en el presente trabajo, pues como se observa en la tabla 1 dosis de 300 y 600 mg/kg de peso de EFBL no modificaron los niveles encefálicos del GABA y tampoco el HEPB ni el F-HEPB (análogo fluorado) y sólo el AAOA casi triplicó el contenido del GABA en el cerebro de los ratones, pero este efecto ya es conocido por la capacidad del AAOA para inhibir a la transaminasa del GABA.

Pensando que una hora podría no ser suficiente para manifestar u observar algún cambio en los niveles del GABA, se hicieron determinaciones a mayores tiempos después de la administración de los fármacos y, como se observa en la tabla 2, no ocurrieron cambios de consideración con respecto a los ratones testigo. Las dosis que se emplearon de 120 mg/kg de peso del HEPB y 300 mg/kg de peso de la EFBL son las que se sabe de antemano que protegen de las convulsiones inducidas por el metrazol y la tiosemicarbazida.

No obstante, es posible que se incremente la biosíntesis o liberación del GABA sin que pueda detectarse debido a que el GABA se metabolice rápidamente después de ejercer su acción inhibitoria; si esto ocurriera sería factible detectar dicho aumento si previamente se inhibe a la T-

TABLA 1

Efecto de la gama-etil-gama-fenil-butirolactona (EFBL); gama-hidroxi-gama-etil-gama-fenil-butiramida (HEPB), y ácido amino-oxiacético (AAOA) sobre los niveles del ácido gama-aminobutírico (GABA) de cerebro de ratón, determinados enzimáticamente.

Fármacos	Dosis (mg/kg)	Tiempo de sacrificio (min.)	Concentración de GABA	
			μ -moles	% del control
Testigo	—	00	1.80	100.0
EFBL	300	60	1.78	98.9
EFBL	600	60	1.79	99.4
HEPB	120	60	1.72	95.6
F-HEPB	100	60	1.76	97.8
AAOA	40	60	5.35	297.2

TABLA 2

Efecto de la gama-butirolactona (GBL), gama-hidroxi-gama-etil-gama-fenil-butiramida (HEPB), y la gama-etil-gama-fenil-butirolactona (EFBL) a diferentes tiempos sobre los niveles del ácido gama aminobutírico (GABA) determinados enzimáticamente en cerebro de ratón.

Fármacos	Dosis (mg/kg)	μ -Moles de GABA/gr de cerebro						
		H O R A S						
		0	1	2	4	6	12	24
Testigo	—	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
GBL	350	—	1.78	1.80	1.82	1.79	1.81	1.80
HEPB	120	—	1.76	1.75	1.82	1.80	1.80	1.79
EFBL	300	—	1.82	1.78	1.75	1.79	1.79	1.80

GABA con AAOA que impediría su degradación, pero esto no ocurre como se ve en las tablas 3 y 4, pues la inhibición previa de la T-GABA con el AAOA seguida de la administración del HEPB (último grupo de la tabla 3) produjo un aumento del 27% de GABA; este resultado se obtiene si se compara el 297% de aumento del GABA por el AAOA a una hora, contra el 378% de aumento del GABA con AAOA y HEPB. Sin embargo este aumento sería ficticio, ya que cuando se sacrificaron los ratones que fueron tratados con AAOA y HEPB habían transcurrido dos horas después de la administración del AAOA y, por lo tanto, durante todo este tiempo habría actuado el AAOA y se produciría un incremento de 407% de GABA.

De tal manera que si ahora se comparan los 407% contra 378%, resulta que hubo 7% de disminución del GABA en lugar de haber aumentado (tabla 3).

Estos resultados sugieren que el AAOA y el HEPB no interaccionan al administrarse juntos. En lo que respecta al efecto de la EFBL previa inhibición de la T-GABA con AAOA, sucede algo similar que con el HEPB, pues como puede apreciarse en la tabla 4, si se compara el 307% de aumento en el GABA con AAOA a la hora, con el 408% del AAOA con EFBL, habría un 32% de aumento de GABA, pero si la comparación se hace con el AAOA a dos horas después de su administración, entonces prácticamente no existe ninguna diferencia, por lo que se puede

TABLA 3

Efecto de la gama-hidroxi-gama-etil-gama-fenil-butiramida (HEPB) sobre los niveles del ácido gama-aminobutírico (GABA) de cerebro de ratón, previa inhibición de la transaminasa del GABA con ácido amino-oxiacético (AAOA).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de sacrificio (min.)	Concentración de GABA	
			μ -moles/gr de cerebro	% del control
Testigo	—	00	1.80	100.0
AAOA	40	60	5.35	297.2
AAOA	40	120	7.33	407.2
HEPB	120	60	1.71	95.0
AAOA	40			
+				
HEPB	120	120	6.80	377.8

TABLA 4

Efecto de la gama-etil-gama-fenil-butirolactona (EFBL) sobre los niveles del ácido gama-amino-butírico (GABA) de cerebro de ratón, previa inhibición de la transaminasa del GABA con ácido amino-oxiacético (AAOA).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de sacrificio (min.)	Concentración de GABA	
			μ -moles/gr de cerebro	% del control
Testigo	—	00	1.79	100.0
AAOA	40	60	5.50	307.3
AAOA	40	120	7.34	410.0
EFBL	300	60	1.82	101.7
AAOA	40	60	1.80	100.5
+				
EFBL	300	120	7.33	409.5
AAOA	40			
+				
EFBL	600	120	7.31	408.4

concluir que ni el HEPB ni la EFBL aumentan los niveles del GABA a pesar de que los ratones se encuentran protegidos de las convulsiones.

En las tablas 5 y 6 se ve que ni la GBL, el HEPB o la EFBL inhiben a la T-GABA de cerebro de ratón a las dosis empleadas, y se corrobora que *in vitro* el AAOA inhibe a la T-GABA en un 95%. Estos resultados explican porque ni el HEPB ni la EFBL hayan cambiado los niveles del GABA.

Asimismo, puesto que estos fármacos no modificaron los niveles del GABA era lógico que no tuvieran efecto sobre la actividad de la descarboxilasa del ácido L-glutámico y como se ve en las tablas 7 y 8 no inhibieron a la DAG ni *in vitro* ni *in vivo* a las concentraciones y dosis que se usaron.

El hecho que ninguno de los fármacos estudiados, GBL, EFBL y HEPB, hayan afectado los niveles del GABA ni las enzimas que participan

en su metabolismo (T-GABA y DAG) y que presenten propiedades anticonvulsivas, significa que su modo de acción no es a través de este mecanismo, sino que tomando en cuenta que antagonizan las convulsiones inducidas por la bicuculina, existe la posibilidad de que actúen como agonistas, activando los receptores tipo A del GABA, ya sea pre o postsinápticos, pues tanto la EFBL como el HEPB guardan similitud estructural con el GABA. No obstante, no hay que descartar la posibilidad que puedan afectar a otros neurotransmisores como la dopamina, noradrenalina o serotonina, lo que debe ser motivo de otras investigaciones.

TABLA 5

Efecto *in vitro* de la gama-butirolactona (GBL), etil-fenil-butirolactona (EFBL) y la hidroxifenil-butiramida (HEPB), sobre la actividad de la transaminasa del gama-aminobutírico de cerebro de ratón.

Sustancias	DO	% Actividad
Control	0.181	100
GBL 10 ⁻² M	0.180	99
GBL 10 ⁻³ M	0.185	102
EFBL 10 ⁻² M	0.182	101
EFBL 10 ⁻³ M	0.181	100
EFBL 10 ⁻⁴ M	0.180	99
HEPB 10 ⁻² M	0.190	105
HEPB 10 ⁻³ M	0.187	103
AAOA* 10 ⁻⁴ M	0.010	5

* Acido aminooxiacético

TABLA 6

Efecto *in vivo* de la etil-fenil-butirolactona (EFBL), gama-butirolactona (GBL) y la hidroxifenil-butiramida (HEPB) sobre la actividad de la transaminasa del gama-aminobutírico de cerebro de ratón.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	DO	% Actividad
Control	—	0.186	100
Etil-fenil-butirolactona	300	0.188	101
Gama-butirolactona	300	0.183	98
Hidroxifenil-butiramida	100	0.171	92
Tiosemicarbazida	20	0.196	105
Tiosemicarbazida	20		
+		0.191	102
Etil-fenil-butirolactona	300		
Tiosemicarbazida	20		
+		0.190	102
Gama-butirolactona	300		
Tiosemicarbazida	20		
+		0.183	98
Hidroxifenil-butiramida	100		

TABLA 7

Efecto *in vitro* de la gama-butirolactona (GBL), etil-fenil-butirolactona (EFBL), y la hidroxietil-fenil-butiramida (HEPB), sobre la actividad de la descarboxilasa del glutámico de cerebro de ratón.

Sustancias	$\mu\text{l de CO}_2$	% Actividad
Control	98	100
GBL 10^{-3} M	100	102
EFBL 10^{-2} M	96	98
EFBL 10^{-3} M	101	103
EFBL 10^{-4} M	104	106
HEPB 10^{-3} M	97	99

El medio de incubación contiene 2 ml de homogeneizado de cerebro de ratón al 20% en regulador de fosfato 0.5 M pH y 0.2 ml de glutámico 0.1 M.

TABLA 8

Efecto *in vivo* de la etil-fenil-butirolactona (EFBL), sobre la actividad de la descarboxilasa del ácido L-glutámico de cerebro de ratón.

Tiempo de sacrificio	$\mu\text{l de CO}_2$	% Actividad
Control	108	100
30 min	103	95.0
60 min	99	92.0
90 min	101	94.0
120 min	110	102

La sustancia se administró a dosis de 300 mg/kg de peso y los ratones se sacrificaron en los tiempos indicados. Medio de incubación: 2.0 ml del homogeneizado de cerebro al 20% en regulador de fosfato 0.5 M pH 6.5; 0.2 ml de ácido L-glutámico 0.5 M pH 6.2 y 0.2 ml de regulador. Se hicieron lecturas cada 10 min. durante 60 min. a 37°C.

SUMMARY

Thinking that GBL, EFBL and HEPB drugs present depressive properties of central nervous system, and they possess anticonvulsant properties against metrazol, thiosemicarbazide and bicuculline, we study the effect of these drugs in the mouse brain GABA levels by a direct way and with a previous inhibition of the T-GABA with amino-oxyacetic acid. In the same way, we studied the *in vitro* and *in vivo* effect on the DAG and T-GABA.

According with our results, these drugs did not affect the GABA levels, and they did not inhibit the enzymes either, so that we suggest that their anticonvulsive effect is due to their agonist action, activating to the GABA receptors type A, pre or postsynaptic or perhaps by interaction with another neurotransmitters.

BIBLIOGRAFIA

1. Albers, R.W. y Salvador, R.A., 1958. "Succinic semialdehyde oxidation by a soluble dehydrogenase from brain". *Science*, **128**: 359-361.
2. Awapara, J.; Landua, A.J.; Fuertes, R. and Seales, B.J., 1950. "Free gamma-aminobutyric acid in brain". *J. Biol. Chem.* **187**: 35-39.
3. Baxter, C.F. y E. Roberts, 1959. "Elevation of gamma-aminobutyric acid with hydroxylamine". *Proc. Exp. Biol. Med.*, **101**: 811-827.
4. Bernt, E. y U. Bergmeyer, 1963. "L-glutamic determination with glutamic dehydrogenase", en: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. Ed.) Acad. Press., N.Y. 384 pp.
5. Bessman, S.P.; Rossen, J. and Layine, E.L., 1953. "Gamma-aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain". *J. Biol. Chem.*, **201**: 385-391.
6. Carvajal, G.; Russek, M.; Tapia, R. y Massieu, G., 1964. "Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of gamma-aminobutyric acid-ketoglutaric acid transaminase". *Bio Chem. Pharmacol.*, **13**: 1059-1069.
7. Cooper, J.R.; Bloom, F.E. y Roth, R.H., 1991. "The Biochemical basis of neuropharmacology", 6th. Oxford University Press., N.Y. pp. 133-189.
8. Curtis, D.R. y Johnston, G.A.R., 1970. "Amino acid transmitter". en: *Handbook of Neurochemistry*, vol. 4 (A. Lajtha, ed.), Plenum Press, N.Y. pp. 115-134.

9. Da Vanzo, J.P.; M.E. Craig y M.A. Cronian, 1961. "Anticonvulsant properties of amino-oxyacetic acid". *Am. J. Physiol.*, **201**: 833-841.
10. Fishbein, W.N. and Bessman, S.P., 1964. "Gamma-hidroxy-butyrate in mammalian brain. Reversible oxidation by lactic dehydrogenase", *J. Biol. Chem.*, **239**: 357-361.
11. Kerr, D.I.B. y Ong, J., 1992. "GABA agonist and antagonist", en: *Med. Research Review*. Ed. G.D. Stevens, vol. 12, John Wiley & Sons Inc., N.Y. pp. 593-636.
12. 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. Ther.*, **119**: 255-262.
13. Krosgaar-Larsen, P., 1991. "GABA agonist and CNS receptor", en: *Advances in CNS Drug receptor interactions*, vol. I. Ed. J.G. Cannon, JAI Press Inc., London. pp. 23-73.
14. Krosgaar-Larsen, P.; Johnston, G.A.R.; Lodge, D.F. y Curtis, D.R., 1977. "A new class of GABA agonist". *Nature*, **268**: 53-55.
15. Laborit, H. Jouvany, J.M.; Gerard, J. and Fabiani, F., 1960. "Résumé d'une étude expérimentale et clinique sur un substrat métabolique à l'action central inhibitrice le 4-hydroxybutyrate de Na". *Press. Med.* **68**: 1867-1869.
16. Martínez de Muñoz, D., 1980. "Anticonvulsant action of gamma-hydroxy-gamma-ethyl-gamaphenyl-butyramide in mice treated with 4-aminopyridine", en: *Advances in Epileptology*; XIth Epilepsy International Symposium; R. Cangel, F. Angelery y J.K. Penry (dirs), Raven Press, N.Y. pp. 463-466.
17. Meldrum, B.S., 1978. "Gamma-aminobutyric acid and the search for new anticonvulsant drugs", *The Lancet*, vol. pp. 304-306.
18. Meza-Toledo, S.E.; Zenteno-García, M.T.; Juárez-Carvajal, E.; Martínez-Muños, D. y Carvajal-Sandóval, G., 1990. "A new homologous series of Anticonvulsants: Phenyl Alcohol Amides". *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. **40(II)**, **12**: 1289-1291.
19. Mitoma, C. and Meubahuer, S.E., 1968. "Gamma hydroxybutyric acid and sleep". *Experientia*, **24**: 12-13.
20. Pérez de la Mora, M. y Tapia, R., 1973. "Anticonvulsant effects of 5-ethyl-5-phenyl-2-pyrrolidinone and its possible relationship to gamma-aminobutyric-acid dependent inhibitory mechanism", *Biochem. Pharmacol.*, **22**: 2635-2639.
21. Rando, R.R. y Bangerter, F.W., 1976. "The irreversible inhibition of mouse brain gamma-aminobutyric-acid (GABA) -alfa-ketoglutaric-acid transaminase by gabaculine", *J. Am. Chem. Soc.*, **98**: 6762-6764.
22. Roa, P.D.; J.K. Tews y E. Stone, 1964. "A neurochemical study of thiosemicarbazide seizures and their inhibition by amino-oxyacetic-acid". *Biochem. Pharmacol.*, **13**: 477-487.
23. Roberts, E. y Frankel, S., 1951. "Glutamic decarboxylase in brain". *J. Biol. Chem.*, **188**: 789-795.
24. Roberts, E. y Frankel, S., 1950. "Aminobutyric acid in brain; its formation from glutamic acid", *J. Biol. Chem.*, **187**: 55-63.
25. Rubin, B.A. and Giarman, N.J., 1947. "The therapy of experimental influence in mice with antibiotic lactone and related compounds". *J. Biol. Med.*, **19**: 1017-1022.
26. Vega-Díaz, F.; Vega, R.F. y C. Wong, R., 1987. "Efecto del ácido gamma-amino-oxibutírico sobre las convulsiones y la transaminasa del ácido gama-aminobutírico". *Acta médica (ESM)*, **23**: 49-57.
27. Vega-Díaz, F.; J. Martínez, P. y Vega, R.F., 1991. "Síntesis y efecto de la aminobutirol hidrazida y su hidrazona de fosfato de piridoxal sobre convulsiones inducidas por la tiosemicarbazida". *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Méx.*, **36**: 139-150.
28. Vega-Díaz, F. y F. Vega-R., 1991. "4-etil-4-fenil-butirolactona, nuevo anticonvulsionante". *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Méx.*, **34**: 23-26.
29. Vega-Díaz, F.; S. García, y F. Vega R., 1992. "Propiedades hipnóticas de la 4-etil-4-fenil-butirolactona". *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Méx.*, **37**: 155-170.
30. Vega-Díaz, F.; Vega, R.F. y Yáñez, A.R., 1993. "Efecto de varios fármacos sobre las convulsiones y la transaminasa del ácido gama aminobutírico (GABA)". *Acta Médica (ESM)* **29**: 25-34.
31. 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.