

DEPARTAMENTO DE TERAPÊUTICA CLÍNICA

Diretor : Prof. Dr. Euclides O. Martins

**AMNÉSIA RETROGRADA EM CAMUNDONGOS —
CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS CEREBRAIS DE
ACETILCOLINA**

(RETROGRADE AMNESIA — CORRELATION WITH
ACETHYLCHOLINE BRAIN LEVEL)

JOAO PALERMO NETO
Prof. Assistente

FERNANDO VARELA DE CARVALHO
Prof. Catedrático

REYNALDO MILITO KARPINSKAS * MARIA DE FATIMA MACHADO MENDES **

INTRODUÇÃO

A capacidade que os animais têm de armazenar experiências e de utilizá-las em conotações estruturais e dinâmicas indutoras de modificação do comportamento, penetra no estudo de capítulos da biologia e da psicobiologia (ou psico-biologia) principalmente os ligados à aprendizagem e à memória. Quando são abordados estes capítulos, não se pode deixar de lembrar as transformações que o funcionamento de um organismo sofre em seu sistema nervoso, por seu emprêgo em uma experiência.

Apesar dos esforços de muitos autores em tentativas de determinar alterações neuronais relativamente permanentes provocadas por experiências comportamentais — cite-se por exemplo BENNETT & col. (1964) — ainda não se tem apurado, qualitativa e quantitativamente, as modificações neurofisiológicas que uma determinada experiência provoca. Está se tornando cada vez mais claro, graças aos resultados de pesquisas recentes, que o traço de uma experiência não é deixado de lado na memória. Durante ou imediatamente após a experiência êle parece ser o responsável pela memória temporária, dando origem a outros processos, que demandam certo intervalo de tempo, e que o consolidarão numa outra forma de memória: a memória permanente (McGAUGH, 1966).

* Assistente social do Hospital do Servidor Público Estadual FMO.

** Aluna do 3.º ano da Faculdade de Medicina Veterinária da USP.

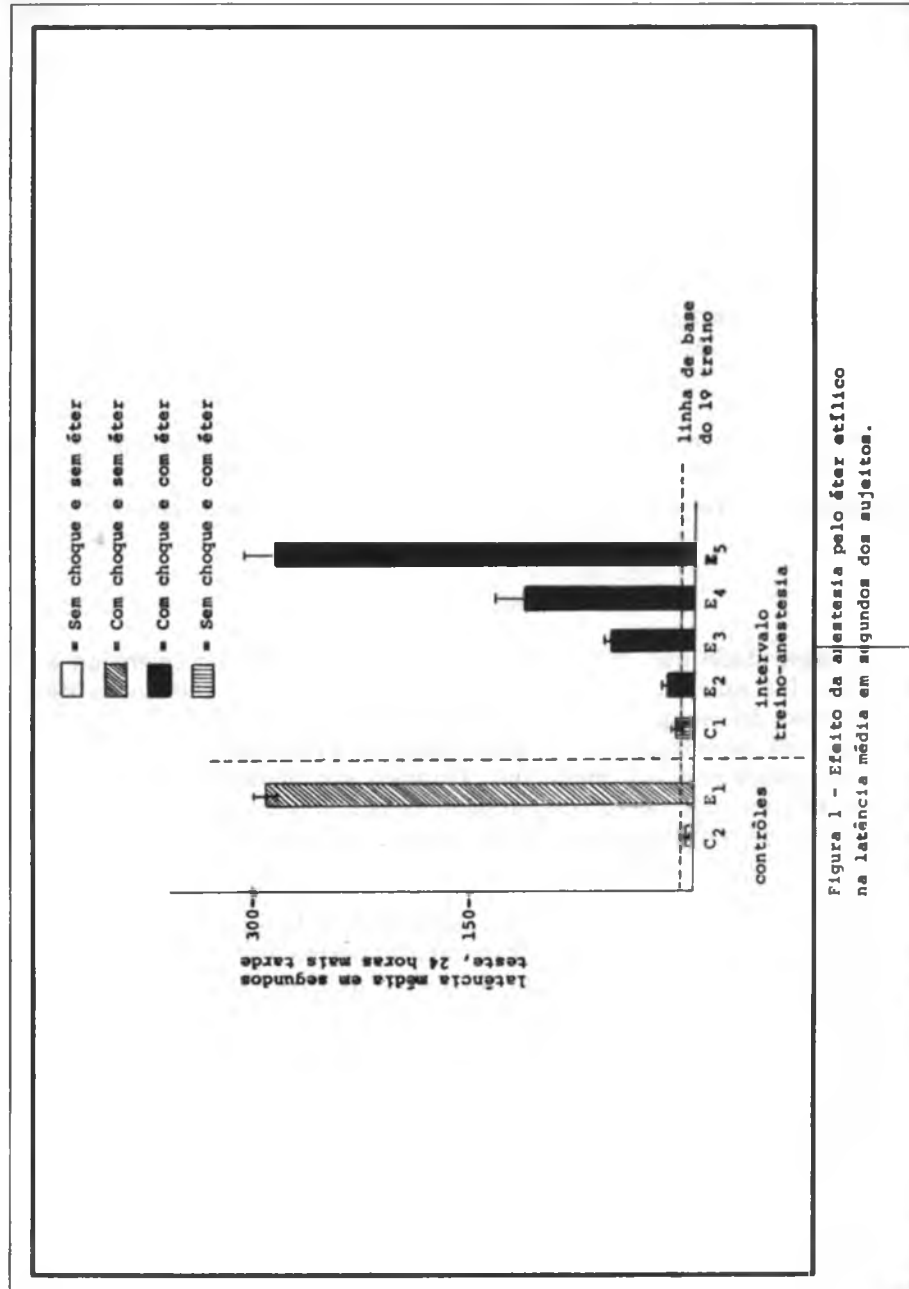


Figura 1 - Efeito da anestesia pelo éter etílico na latência média em segundos dos sujeitos.

GRÁFICO 1 — FIGURA I

Os estudos sôbre a amnésia fornecem subsídios muito valiosos para a compreensão dos processos “obrigatórios” à consolidação da memória.

Sabe-se que pacientes humanos que sofreram traumas na cabeça tendem a ter dificuldades em recordar eventos que ocorreram logo após ou pouco antes da injúria, embora as “velhas” memórias estejam totalmente intactas (RUSSEL, 1959). Esta perda seletiva da memória, chamada amnésia retrograda, foi também observada em pacientes humanos que tiveram tratamentos pelo eletrochoque (MEYER, GROSS, 1943).

Investigações recentes sôbre amnésia retrograda, em espécies infra-humanas, têm sugerido que os agentes anestésicos, bem como eletrochoque têm efeitos que interferem na retenção da memória recentemente adquirida (TABER & BANUAZIZI, 1966; LEUKEL & QUINTON, 1964; HERIOT & COLEMAN, 1962; ABT & col. 1961; OSBORN, 1967).

Por outro lado, diversos experimentos conduzidos por diferentes grupos (TOBIAS & col. 1946; RICHTER & GROSSLAND, 1949; ELLIOTT & col. 1950; WADJA, 1951 e GROSSLAND & MERRICH, 1954), têm sugerido que a quantidade de acetilcolina (Ach) no cérebro aumenta durante a anestesia.

O propósito do presente estudo é investigar o efeito da anestesia pelo éter sôbre a memória em camundongo e uma possível correlação dêste fato com os teores cerebrais de Ach.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados oitenta e quatro camundongos de mesma idade e sexo, provenientes de uma mesma prole obtida por cruzamentos sucessivos ao longo de cinco anos, com acesso “ad libitum” à comida e à água.

O aparelhamento usado foi o descrito por TABER & BANUAZIZI (1966). Consistia de um compartimento quadrado com paredes negras, tendo o chão de barras metálicas conectadas a um estimulador. Cada estímulo elétrico apresentava 15 pulsos por segundo e um m.A. Um compartimento bem restrito era ligado a esta “caixa de choque” por uma porta em guilhotina.

Os animais foram divididos em sete grupos, a saber: E1, E2, E3, E4, E5, C1 e C2. Durante a aquisição (primeiro treino), cada camundongo era colocado individualmente no ambiente restrito; aguardava-se o tempo de dois segundos e abria-se a porta em guilhotina. Devido à atividade exploratória normal, o animal passava

para o compartimento maior, quando recebia (com exceção daqueles dos grupos C1 e C2) um estímulo elétrico. Este era o treino, único para a aquisição de esquiva passiva, procedimento essencial usado por IRWIN & col. (1964). Depois do treino, os animais eram tratados conforme o esquema apresentado na tabela I.

TABELA I
ESQUEMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Grupos	Condição	Tratamento pelo éter
E1	com choque	—————
E2	com choque	0 min após o treino
E3	com choque	5 min após o treino
E4	com choque	15 min após o treino
E5	com choque	60 min após o treino
C1	—————	0 min após o treino
C2	—————	—————

O tratamento era feito colocando-se os animais individualmente em um recipiente saturado com vapores de éter até a obtenção da anestesia, quando eram retirados. Obedeceu-se a um esquema de intervalos após o treino: 0 (zero) minutos para os grupos E2 e C1; 5 minutos para o grupo E3; 15 minutos para o grupo E4 e 60 minutos para o grupo E5. Observa-se pelo exposto e pelo exame da tabela I que, com o fito de garantir a apuração de possíveis efeitos da anestesia na resposta incondicionada, a dois grupos de sujeitos (C1 e C2) permitiu-se responder, sem que se aplicasse o choque por ocasião da saída do ambiente restrito. Os componentes do grupo C1 foram anestesiados imediatamente após a resposta, enquanto os do grupo C2, bem como os do grupo E1 não sofreram anestesia, ou seja, foram colocados em recipiente idêntico àquele utilizado para a anestesia, porém, sem o éter.

Terminado o tratamento, cada grupo foi subdividido ao acaso, ficando metade dos animais para o teste de retenção, sendo a outra metade sacrificada por decapitação para a extração da Ach cerebral, através do método de CROSSLAND (1951).

O teste de retenção foi efetuado 24 horas após a aquisição. Os animais eram colocados novamente na caixa restrita do aparelho, individualmente; repetia-se o procedimento descrito, com exceção do choque. A latência, em cruzar a porta em guilhotina, era medida com cronômetro. Trezentos segundos foram considerados como latência máxima.

Os extratos de cérebro total, foram ensaiados no músculo reto abdominal de sapo. A potência da Ach extraída do cérebro foi estimada contra aquela de solução padrão, através do cálculo da potência relativa da Ach extraída para respostas obtidas com doses simples e duplas da Ach padrão e extraída, segundo BURN (1950).

RESULTADOS

A tabela II mostra os resultados, ilustrados pela figura 1. Por elas observa-se que os animais que tomaram choque ao cruzar a porta durante o treino, mostraram um marcado aumento do tempo médio de latência no teste feito 24 horas mais tarde $p < 0,001$ (contrôle sem choque = C2 e com choque = E1). Em contraste, os sujeitos anestesiados após o treino (grupos E2, E3, E4 e E5) mostraram latências diminuídas em comparação aos que tomaram choque e não foram tratados (E1), indicando interferência do anestésico na retenção. Foi observado ainda que a latência média diminui progressivamente com a diminuição do intervalo de tempo-treino-tratamento chegando a ser até 19 vezes menor para os tratados imediatamente após o treino (grupo E2). Por outro lado, não se observou diferença significativa entre os grupos C1 e C2, o que indica a ausência de efeito do éter na resposta incondicionada.

Tabela II — Latência em segundos dos sujeitos com e sem tratamento pela anestesia, na fase de teste, 24 horas após o primeiro treino.

sujeitos grupos	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm SD$
E1	300	20	300	300	282	300	297 ± 7
E2	10	300	15	14	14	17	$15 \pm 3^*$
E3	48	60	64	52	61	63	$58 \pm 6^*$
E4	114	120	135	115 [†]	130	100	$119 \pm 17^*$
E5	300	300	290	300	300	250	290 ± 20
C1	9	10	5	11	6	7	$8 \pm 2^*$
C2	4	6	3	4	3	4	$4 \pm 1^*$

* — significante ao nível de $p < 0,001$

A tabela III mostra as alterações no conteúdo de Ach em extratos de cérebro total de sujeitos dos diferentes grupos. Pode-se observar claramente que a anestesia pelo éter eleva os níveis do medidor químico $p < 0,001$ (E2, E3, E4, E5 e C1) em comparação aos não tratados E1 e C2 e que este aumento é proporcional ao intervalo de tempo entre o treino e o tratamento. Por outro lado, os níveis de Ach nos sujeitos que tomaram choque e não foram tratados (E1) são significativamente menores ($p < 0,005$) que aqueles que não receberam choque e não foram tratados (C2).

Tabela III — Conteúdo de Ach em ng/g em cérebro de camundongos submetidos a anestesia pelo éter etílico a diferentes intervalos de tempo, após o treino.

Sujeitos Grupos	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm SD$
E1	179	182	178	175	176	178	176 ± 3
E2	277	280	272	270	283	272	$276 \pm 5^{***}$
E3	238	235	232	234	240	241	$237 \pm 3^{***}$
E4	215	212	209	210	220	216	$214 \pm 4^{***}$
E5	203	192	210	201	203	207	$206 \pm 6^{***}$
C1	275	279	270	271	269	274	$273 \pm 4^{***}$
C2	190	185	179	192	183	186	$186 \pm 5^{**}$

*** — significante ao nível de $p < 0,001$

** — significante ao nível de $p < 0,005$

A figura 2 ilustra o aumento dos níveis de Ach e a latência média dos sujeitos, podendo-se ver por ela que aos maiores níveis correspondem as menores latências na fase do teste.

DISCUSSÃO

Os resultados estão de acordo com observações gerais de que a retenção de performances pode ser prejudicada e mesmo impedida pelos anestésicos e, de que, o grau de interferência varia inversamente com o intervalo de tempo — treino x tratamento pelo agente anestésico (TABER & BANUAZIZI, 1966; LEUKEL & QUINTON, 1964; ABT & col. 1961; McGAUGH, 1966 e OSBORN, 1967). O fato de que os não tratados e que receberam choque (grupo E1)

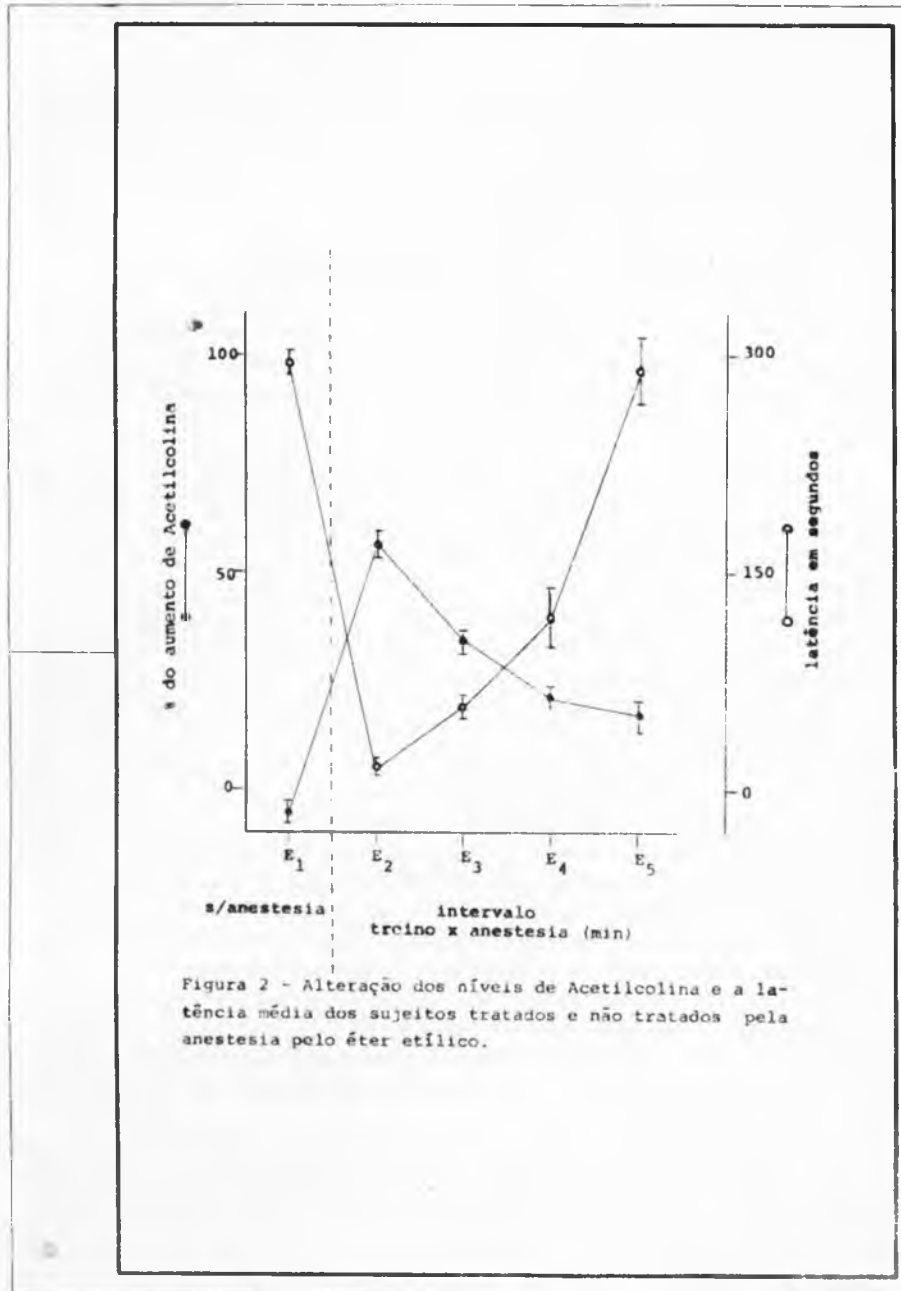


Figura 2 - Alteração dos níveis de Acetilcolina e a latência média dos sujeitos tratados e não tratados pela anestesia pelo éter etílico.

FIGURA I ILUSTRADA

tiveram a latência de suas respostas aumentadas, se comparados aos animais não tratados e não chocados (C1) sugere que a esqui-va certamente ocorreu.

LEUKEL & QUINTON (1964) através de estudos da resposta de esqui-va ativa, sugeriram a possibilidade de que a exposição ao agente anestésico teria efeito de natureza aversiva impedindo a performance, ao invés de impedir a consolidação da memória. No entanto, de acôrdo com princípios de condicionamento geralmente aceitos, a influência de uma punição seria de aumentar o tempo de latência (KANIM, 1959). A possibilidade de que o éter tenha propriedades aversivas nos animais, no sentido de aumentar a latência, não ocorreu (grupo C1). Pelo contrário, como pode ser visto pela figura 1, o efeito do éter administrado a intervalos curtos após o treino, foi o de diminuir a latência o que vem confirmar dados de TABER & BANUAZIZI (1966).

Os resultados do presente experimento sugerem que a anestesia pelo éter etílico impede totalmnte a retenção da resposta condicionada de esqui-va se fôr administrado até 5 minutos após o treino. Interfere em menor grau se fôr administrado até 15 minutos após, e, não altera significativamente a retenção se fôr administrado 60 minutos após o treino, no que concorda com os resultados de ABT & col. (1961). Convém destacar que o tempo decorrido entre o treino e a administração da droga, parece importante, uma vez que RUSSEL & NATHAN (1964) ao examinar mais de 1 000 casos de pacientes humanos com traumatismos cranianos, verificaram que 69% dos acidentados não se lembravam dos fatos ocorridos nos 30 minutos que precederam o acidente. Estes dados mostram um dos aspectos fisiológicos concernentes à consolidação da memória. Ela ocorre no cérebro durante um certo espaço de tempo após o estímulo próprio e é passível de sofrer influências por agentes químicos. Este fato é confirmado ainda por experiências que mostram que a administração de estri- cnicina (McGAUGH & THOMSON, 1962; McGAUGH & col. 1962) picrotoxina (BREEN & McGAUGH, 1961) e anfetamina (ROSMAN, 1964) em animais de laboratório, aumenta a capacidade de memorização a uma dada tarefa em relação aos animais contrôles. Todavia, se forem injetados até cerca de 30 minutos após o treino diário, os animais aprendem da mesma maneira que os contrôles.

Por outro lado, nossos resultados com relação aos níveis de acetilcolina (Ach) concordam com os obtidos por TOBIAS & col. 1946; RICHTER & CROSSLAND, 1949; ELLIOTT & col. 1950; WADJA, 1951 e CROSSLAND & MERRICH, 1954, uma vez que o agente anestésico aumenta os níveis do mediador químico (tabela III — grupos E2, E3, E4, E5 e C1). Este aumento do conteúdo de Ach

durante a anestesia parece não ser devido a inibição da acetilcolinesterase, ou a um aumento da síntese de Ach, porque nem o agente anestésico por nós usado e nem outros anestésicos diferentes usados por outros autores, apresentam potência anti-colinesterásica (BERNHEIN & BERNHEIN, 1936), assim como também em experimentos "in vitro" não aumentam a síntese de Ach (CROSSLAND & MERRICH, 1954). Uma menor liberação de Ach dos neurônios colinérgicos, conseqüente da depressão da atividade cerebral que acompanha a anestesia, parece ser, segundo CROSSLAND & MERRICH (1954) a mais razoável explicação para as observações experimentais do aumento dos níveis do mediador. Esta hipótese é apoiada pelas observações de que a concentração de Ach cai durante condições que aumentam a atividade cerebral (RICHTER & CROSSLAND, 1949) bem como pode, através da perfusão, ser verificado que em Ringer-Locke eserinizado, a quantidade de Ach é diminuída pela anestesia (McINTOSH & OSBORIN, 1953).

Os resultados ora obtidos permitem ainda a observação de que o aumento de Ach é inversamente proporcional ao intervalo de tempo entre o treino e a anestesia (grupos E2, E3, E4 e E5 — tabela III e figura II) e que por si só, o choque tem a propriedade de diminuir os níveis do mediador (grupo E1 — tabela III). Estas observações permitem sugerir a possibilidade de que ocorre um aumento do número de cadeias neuronais colocadas em atividade pelo choque, cujos neurônios estariam implicados no fato de ser memorizado, e que teriam a Ach como mediador químico. Esta hipótese encontra apoio nas observações de ECCLES (1966) que com o uso de microelétrodos implantados no corpo das células piramidais do córtex, registrou descargas por estímulos de natureza diversa e de intensidade crescente, demonstrando que a frequência das descargas aumentava na razão direta da intensidade do estímulo, portanto, o mesmo código de frequência aparece como reação básica dos neurônios do córtex aos estímulos mais diversos. RINALDI & HIMWICH (1955^{a, b}) e LONGO (1956) mostraram também que a injeção de alguns microgramos de Ach no coelho curarizado é capaz de reverter o EEG ao estado de vigília, simulando um estímulo, sendo esta reversão potenciada por anticolinesterásicos (DFP) e inibida pela atropinização.

Se fôr verdadeira esta hipótese, haverá concordância com a teoria dos "circuitos reverberatórios" estabelecida por HEBB (1949), segundo a qual para se estabelecer a memória, os neurônios interessados num dado fato a ser memorizado deveriam ser estimulados por um treino ou experiência específica. Assim sendo, quanto mais impulsos "firings" estes neurônios emitissem, mais rapidamente a memória se estabeleceria. Após um certo tempo, esta rede neuronal, ainda segundo HEBB (1949), ficaria "permeável" graças a uma

modificação química específica para aquele estímulo e a memória se tornaria permanente. Neste ponto, as opiniões dos autores divergem, alguns sugerindo a participação do RNA (HYDEN & EGYHAZI, 1962/1964; McCONNEL, 1966; CORNING & JOHN, 1961; CHAMBERLAIN & col. 1963; MATTHIES & col. 1971); outros, de polipeptídeos (ROSENBLAT, 1966) que seriam sintetizados ao longo dos neurônios interessados num dado evento a ser memorizado, tornando a rede neuronal permeável.

Outros achados indicam que a consolidação da memória em peixes e camundongos é impedida pela injeção intracranial de inibidores da síntese protéica, como a puromicina (FLEXNER & col. 1963; AGRANOFF & col. 1965; BARONDES & COHEN, 1966).

Ficaria desta forma explicada a diminuição do teor de Ach durante o espaço de tempo existente entre o choque e a anestesia, uma vez que aquele mediador químico teria sido gasto no estabelecimento dos arcos reflexos.

Investigações em muitos laboratórios têm mostrado que a amnésia retrograda pode ser produzida também pela aplicação de cloreto de potássio (RAY & EMLEY, 1964; PEARLMAN & JARVIK, 1961; BURES & BURESOVA, 1963 e 1971) ao cortex cerebral, o que produz uma depressão da atividade elétrica que se desenrola através do cortex do hemisfério tratado, e resulta em temporária inibição do funcionamento do cortex afetado. RAY & EMLEY (1964) treinaram ratos para discriminação visual após depressão cortical unilateral com KCl, não encontrando evidência de memória quando testados com o hemifério oposto deprimido; isto indicaria que o armazenamento da memória no treino estava inteiramente restrito ao hemifério não tratado.

Nossa hipótese é reforçada pelos resultados de trabalhos que pretendem demonstrar que agentes anticolinérgicos como a escopolamina têm a capacidade de impedir ou dificultar a retenção da memória (BURESOVA & col. 1964; MEYERS, 1965; PAZZAGLI & PEPEU, 1964; BOHDANECKY & JARVIK, 1967; OLIVERIO & col. 1966; OLIVERIO, 1967 e 1968).

Dada a complexidade dos aspectos envolvidos na consolidação da memória, não se pode saber se êstes efeitos discutidos acima, têm em comum as mesmas bases fisiológicas, ou se a amnésia retrograda e o teor de Ach, são mecanismos totalmente independentes.

SUMMARY

In this paper the authors studied the influence of ether anesthesia on both memory and brain acetylcholine content. The results suggest that the anesthetic agent prevents the conditioned avoidance response if administered up to 5 minutes after training. The brain acetylcholine content appeared to be inversely parallel to the time elapsed between anesthetic state and sacrifice of the animals. Results suggest that probably exist a relationship between memory and brain acetylcholine content.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABT, J. P.; ESMANN, W. B. & JARVIK, M. E. — Ether-induced retrograde amnesia for one-trial conditioning in mice *Science*, New York, 133 (3463): 1477-78, 1961.
2. AGRANOFF, B. W.; DAVIS, R. E. & BRUIK, J. J. — Memory fixation in the goldfish. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, Washington, 54: 778, 1965.
3. BARONDES, S. H. & COHEN, H. D. — Puromycin effect on successive phases of memory storage. *Science*, New York, 151(3710): 594-595, 1966.
4. BENNETT, E. L.; DIAMOUND, M. C.; KRECH, D. & ROSENZWEIG, M. R. — Chemical and anatomical plasticity of brain. *Science*, New York, 146(3644): 610-619, 1964.
5. BERNHEIN, F. & BERNHEIN, M. C. C. — Action of drugs on the cholinesterase of the brain. *J. Pharmacol.*, Baltimore, 57: 427, 1936.
6. BOHDANECKY, Z. & JARVIK, M. E. — Impairment of one trial passive avoidance in learning mice by scopolamine, scopolamine methylbromide and physostigmine. *Int. J. Neuropharmacol.*, Basel, 6: 217, 1967.
7. BREEN, R. A. & McGAUGH, J. L. — Facilitation on maze learning with posttrial injection of picrotoxin. *J. comp. physiol. Psychol.*, Washington, 54: 458, 1961.
8. BURN, J. H. — Biological standartization. University Press. London, Oxford, 1950.
9. BURES, J. & BURESOVA, O. — Spreading depression and retrograde amnesia. *J. comp. physiol.*, Washington, 56: 268, 1963.
10. BURES, J. & BURESOVA, O. — The effect of prolonged cortical spreading depression on consolidation of visual engrans in rats. *Psychopharmacologia*, Berlim, 20: 5675, 1971.
11. BURESOVA, O.; BURES, J.; BOHDANECKY, Z. & WEISS, T. — Effect of atropine on learning, extinction, retention and retrieval in rats. *Psychopharmacologia*, Berlim, 5: 225, 1964.
12. CHAMBERLAIN, T. J.; ROTHSCHILD, G. H. & GERARD, R. W. — Drugs affecting RNA and learning. *Proc. nat. Acad. Sci.*, Washington, 49: 918, 1963.

13. CORNING, W. C. & JOHN, E. R. — Effect of ribonuclease on retention of conditioned response in regenerated planarians. *Science, New York*, 134(3487): 1363-65, 1961.
14. CROSSLAND, J. — The use of liquid air in the extraction of acetylcholine. *J. Physiol., London*, 114: 318, 1951.
15. CROSSLAND, J. & MERRICH, A. — The effect of anaesthesia on the acetylcholine content of brain. *J. Physiol., London*, 125: 56., 1954.
16. ECCLES, J. C. — The ionic mechanisms of excitatory and inhibitory synaptic action. *Ann. N. Y. Acad. Sci., New York*, 137: 1966.
17. ELLIOTT, K. A. C.; SWANK, R. L. & HENDENRSON, N. — Effects of anaesthetics and convulsants on the acetylcholine content of brain. *Am. J. Physiol., Boston*, 162: 469, 1950.
18. FLEXNER, J. B.; FLEXNER, L. B. & STELLAR, E. — Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science, New York*, 141(3575): 57-59, 1963.
19. HEBB, D. O. — In the organization of behavior .New York, John Wiley and Sons, 1949.
20. HERIOT, J. T. & COLEMAN, P. D. — The effect of electroconvulsive-shock on retention o a modified "one trial" conditioned avoidance. *J. comp. physiol., Washington*, 55: 1062, 1962.
21. HYDEN, H. & EGYAZI, E. — Nuclear RNA changes of nerves cells during a learning experiment in rats. *Proc. nat. Acad. Sci. USA, Washington*, 48: 1386, 1962.
22. HYDEN, H. & EGYHAZI, E. — Changes in RNA content and base composition in cortical neurons of rats in a learning experiment involving transfer of handedness. *Proc. nat. Acad. Sci. USA, Washington*, 51: 1030, 1964.
23. IRWIN, S.; KALSNER, S. & CURTIS, A. — Direct demonstration of consolidation of one-trial learning. *Fed. Proc., Washington*, 23: 102, 1964.
24. KANIM, L. J. — The delay of punishment gradient. *J. comp. physiol. Psychol., Washington*, 52: 434, 1959.
25. LEUKEL, F. A. & QUINTON, E. — Carbon dioxid effects on acquisition of avoidance behaviour. *J. comp. physiol. Psychol., Washington*, 57: 267, 1964.
26. LONGO, V. G. — Effects of scopolamine and atropine on EEG and behavioral reactions due to hypothalamic stimulation. *J. Pharmac. exp. Ther., Baltimore*, 166: 198, 1956.
27. MacINTOSH, F. C. & OSBORIN, P. E. — Release of acetylcholine from intact cerebral cortex. *Int. Physiol. Congr., 19, Leningrado, 1953, Abstracts*.
28. MATTHIES, H.; FAHSE, Ch. & LIETZ, W. — Die wirkung von RNS-Präkursoren and die Erhaltung des langzeitgedächtnisses (The effect of RNA-precursors of the maintenance of Long-Term memory). *Psychopharmacologia, Berlim* 20: 10, 1971.
29. McCONNEL, J. V. — Comparative physiology: learning invertebrates. *Ann. Rev. Physiol., Palo Alto, Californai*, 28: 107, 1966.

30. McGAUGH, J. L. & THOMSON, C. W. — Facilitation of simultaneous discrimination learning with strychnine sulphate. *Psychopharmacologia*, Berlin, 3: 166, 1962.
31. McGAUGH, J. L.; THOMSON, C. W.; WESTBROOK, W. H. & HUDSPETH, W. J. — Further study of learning facilitation with strichnine sulphate. *Psychopharmacoloia*, Berlin, 3: 352, 1962.
32. McGAUGH, J. L. — Time-Dependent processes in memory storage. *Science*, New York, 153: (3742): 1351158, 1966.
33. MEYERS, B. — Some effects of scopolamine on a passive avoidance response in rats. *Psychopharmacologia*, Berlin, 8: 111, 1965.
34. MEYER-GROSS, W. — Retrorade amnesia: some experiments. *Lancet*, London, 245: 603, 1943.
35. OLIVERIO, A. — Contrasting effects of scopolamine on mice trained simultaneously with two different schedules of avoidance conditioning. *Psychopharmacologia*, Berlin, 11: 39, 1967.
36. OLIVERIO, A. — Effects of scopolamine on avoidance conditioning and habituation of mice. *Psychopharmacologia*, Berlin, 12: 214, 1968.
37. OLIVERIO, A.; BOVET-NITTI, F. & BOVET, D. — Action de la scopolamine et des médicaments parasympatholitiques sur le condicionement d'évitement chez la souris. *C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris*, 262: 1796, 1966.
38. OSBORN, A. G. — Effects of thiopental sedation on learning and memory. *Science*, New York, 157(3788): 574-76, 1967.
39. OTT, T. & MATTHIES, H. — Die wirkung von Orotsäure auf die durch elektrokonvulsiven schock angelöste retrograde Amnesie. (The influence of Orotic acid on the retrograde amnesia caused by ECS). *Psychopharmacologia*, Berlin, 20: 1971.
40. PAZZAGLI, A. & PEPEU, G. — Amnesic properties of scopolamine and brain acetylcholine in the rats. *Int. J. Neuropharmacol.*, Basel, 4: 291, 1964.
41. PEARMAN, C. & JARVIK, M. E. — Retrograde amnesia produced by spreading cortical depression. *Fed. Proc.*, Washington, 20: 340, 1961.
42. RAY, O. S. & EMLEY, G. — Time factors in interhemispheric transfer or learning. *Science*, New York, 144(3614): 76-78, 1964.
43. RICHTER, D. & CROSSLAND, J. — Variation in acetylcholine content of the brain with physiological state. *Am. J. Physiol.*, Boston, 159: 247, 1949.
44. RINALDI, F. & HIMWICH, H. E. — Alerting reponses and the actions of atropine cholinergic drugs. *Arch. Neurol. Psychiat.*, Chicago, 73: function of mesodiencephalic activating system, *Arch. Neurol. Psy.* 387, 1955a.
45. RINALDI, F. & HIMWICH, H. E. — Cholinergic mechanisms involved in function of mesodiencephalic activating system. *Arch. Neurol. Psychiat.*, Chicago, 73: 396, 1955 b.

46. ROSENBLAT, F.; FARROW, J. T. & RHINE, S. — The transfer of learned behavior from trained to intrained rats by means of brain extracts. I, II. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, Washington, 55: 787, 1966.
47. ROSMAN, M. E. — Effect of amphetamine on the learning performance of mice in a swimming maze. *Proc. Sov. exp. Biol. Med.*, New York, 155: 728, 1964.
48. RUSSEL, W. R. — Brain, memory, learning. Oxford, Clarendon, 1959.
49. RUSSEL, W. R. & NATHAN, P. W. — Traumatic amnesia. *Brain*, New York, 5: 280, 1964.
50. TABER, R. I. & BANUAZIZI, A. — CO₂ induced retrograde amnesia in a one-trial-learning situation, *Psychopharmacologia*, Berlin, 9: 382, 1966.
50. TOBIAS, J. M.; LIPTON, M. A. & LEPINAT, A. A. — Effect of anaesthetics and convulsants on brain acetylcholine content. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 61: 51, 1946.
51. WADJA, A. T. — 1951 (*apud* Crossland & Merrich, 1954).