

Estudos sôbre a excitação química da córtex cerebral

(Ação da acetilcolina)

por

H. Moussatché

Da Divisão de Fisiologia do Instituto Oswaldo Cruz

Tudo indica que o progresso no conhecimento do mecanismo das convulsões tem suas bases nos esclarecimentos que a pesquisa vem trazendo à fisiologia do sistema nervoso. Se quisermos restringir a questão às convulsões experimentais em animais, em que o número de fatores em jogo pode ser melhor controlado, vemos, então, que os numerosos problemas que tocam com a transmissão do influxo nervoso através das sinapses, influência dos estímulos êxtero e proprioceptivos sôbre as células nervosas, estado do tonus do sistema nervoso, etc., que dizem respeito à fisiologia do sistema nervoso, também interessam à compreensão do mecanismo das convulsões.

Há nas convulsões experimentais dois aspectos essenciais a considerar: 1) — a existência de um ou mais pontos do sistema nervoso central que são submetidos à influência de agentes convulsivante e nos quais se cria um estado especial de atividade — são os centros epileptogênicos; 2) — a irradiação dêste estado epileptogênico aos outros pontos do sistema nervoso.

Centros epileptogênicos podem ser produzidos em variadas partes do sistema nervoso central. Eles estão em conexão com a periferia, sendo influenciados pelos estímulos próprio — e exteroceptivos, particularmente pelos estímulos que partem da região em mais ligação com o centro epileptogênico. Em certos casos, como na epilepsia de Brown-Sequard, os estímulos que partem de uma região cutanea determinada — a zona epileptogênica — são os únicos

Tese apresentada ao Concurso de Biologista do Ministério de Educação e Saúde (C-87)

* Entregue ao D.A.S.P. em 21 de novembro de 1944.

* Recebido para publicação a 17 de abril de 1945.

capazes de provocar a convulsão. As excitações, partindo de outras regiões, ou mesmo de músculos e filetes nervosos subjacentes à zona epileptogênica, são ineficazes.

Sobre a natureza dos centros epileptogênicos pouca coisa é conhecida. As alterações da atividade elétrica destes centros têm sido objeto, ultimamente, de estudos mais detalhados. As alterações químicas, porém, são praticamente desconhecidas; as alterações químicas geralmente assinaladas referem-se a modificações sanguíneas de ordem geral. Sobre as modificações limitadas ao centro epileptogênico, especialmente aos criados experimentalmente, poucas coisas são conhecidas com segurança. (*)

Sabe-se hoje que há inúmeras condições experimentais que podem criar um centro epileptogênico. É sobre pequeno número dessas condições que pretendemos desenvolver este trabalho; as convulsões produzidas pela excitação química da córtex cerebral. Essa técnica talvez possa fornecer alguns pontos de partida para hipóteses sobre as modificações químicas que se passam nos centros nervosos quando estes passam para um estado epileptogênico.

A irradiação deste estado aos centros vizinhos é um dos pontos mais importantes no estudo do mecanismo das convulsões, e traduz-se em contrações clônicas e tônicas generalizadas, que são a manifestação exterior do ataque epiléptico.

Fazendo-se essa irradiação por intermédio de fibras que ligam o centro epileptogênico aos outros centros nervosos e tendo em vista que sinapses intercalares devem ser atravessadas, é claro que os estudos de condução da excitação e, particularmente, de transmissão da excitação através das sinapses mereçam a atenção dos que vêm trabalhando em epilepsia experimental.

São numerosos os meios hoje conhecidos no laboratório que podem provocar convulsões. A investigação sistemática destes meios e das convulsões causadas, tem trazido nestes últimos anos um grande número de fatos novos de importância essencial para a compreensão do fenômeno.

Seria impossível fazer um resumo de tudo que se tem feito em epilepsia experimental. As simples referências bibliográficas constituiriam por si só um alentado volume. Preferimos, por isto, limitar-nos, no decorrer da exposição, aos dados bibliográficos mais essenciais ao nosso caso.

(*) Martino estudou a relação entre atividade de um centro cortical motor e conteúdo em glicídeos, notando uma queda destes nos centros submetidos à ação de estriquina.

O CENTRO EPILEPTOGÊNICO

Coube a Fritsch e Hitzig, em 1870, com a descoberta das localizações cerebrais motoras e, ao mesmo tempo, da epilepsia por excitação elétrica da córtex cerebral, incentivar de maneira decisiva os estudos de epilepsia experimental.

O problema transportava-se da clínica também para o laboratório. As experiências de Fritsch e Hitzig geraram grande entusiasmo e esperança para os que desejavam esclarecimentos acêrca do mecanismo das convulsões.

Foram muitos os fisiologistas que passaram a se preocupar com o problema das localizações motoras e convulsões experimentais, particularmente na Itália. Albertoni (1) mostrou que nem tôda a área cortical do cérebro respondia convulsivamente às excitações elétricas, mas sòmente parte daquela que Fritsch e Hitzig localizaram como zona motora; convulsões por excitação elétrica de outras partes do cérebro, quando obtidas, obrigavam ao emprêgo de correntes muito fortes, levantando logo a idéia de difusão de corrente para o ponto mencionado, onde haveria, então, a criação do centro epileptogênico.

Luciani e Tamburini (2) não aceitaram a limitação de Albertoni, achando que qualquer área cortical excitável do cérebro era capaz de responder convulsivamente, porém, principalmente a motora. Luciani foi mais longe ao lançar a teoria que tôdas as convulsões eram de origem cortical, a córtex cerebral sendo o órgão central das epilepsias.

Essas idéias que foram fortemente combatidas na época por vários pesquisadores, como François-Franck e Albertoni e, em parte abandonadas pelo próprio autor (3), tiveram grande repercussão e muito influenciaram como elemento de resistência importante na admissão de convulsões tendo origem em outras partes do sistema nervoso central.

Não foi sòmente sôbre a córtex cerebral que a excitação elétrica mostrou-se capaz de provocar convulsões. Binswanger mostrou (4) que a excitação elétrica do bulbo também as provoca. Sôbre a medula espinhal da rã os resultados têm sido sempre negativos. Em trabalho realizado com M. Ozo-rio de Almeida (5), vimos que a excitação da medula espinhal da nossa rã (*L. ocellatus*), com correntes de forma, freqüência e intensidade varia nunca produziu reações convulsivas. Êstes resultados concordam com os obtidos em condições diferentes, por outros autores (6).

Além da excitação elétrica outros estímulos também podem criar centros epileptogênicos na córtex cerebral ou em outras partes do sistema nervoso central. François-Franck e Pitres (7) e Luciani e Tamburini (8) mostraram que a excitação mecânica da córtex cerebral motora pode produzir convulsões

semelhantes às obtidas pela excitação elétrica. M. Ozorio de Almeida obteve convulsões em cães excitando mecanicamente a córtex através da pele.

Ainda M. Ozorio de Almeida, resfriando a medula espinhal da rã (*L. ocellatus*) a uma temperatura abaixo de 8° C., viu aparecer um forte ataque convulsivo epileptiforme (9). O resfriamento da córtex motora de cães não produz imediatamente convulsões. Speransky (10), porém, congelou a córtex cerebral de cães e viu aparecerem, vinte e quatro horas depois, convulsões que foram atribuídas a produtos de decomposição conseqüentes ao congelamento celular.

Poderíamos citar muitas outras experiências que têm como conseqüência o aparecimento de convulsões e, portanto, a formação de um ou múltiplos centros epileptogênicos. Torna-se, porém desnecessário. Os fatos citados já mostram como são variadas as condições experimentais que podem ocasionar convulsões. Deter-nos-emos mais pormenorizadamente sôbre o método e resultados da excitação química do sistema nervoso central, particularmente da córtex cerebral, pela sua importância para êste trabalho.

Numerosos têm sido os trabalhos sôbre convulsões provocadas pela excitação química direta do sistema nervoso central. O método é empregado desde longa data, e Claude Bernard (11) já tinha assinalado os efeitos convulsivantes da morfina introduzida por via sub-aracnóidiana. Esta técnica não permitia limitar a ação da substância empregada a um centro determinado.

Landois (12) experimentou a ação convulsivante de várias substâncias existentes na urina como a creatina, creatinina, fosfato de potássio, urato de sódio, obtendo convulsões tônico clônicas, espontâneas, freqüentes. A técnica utilizada é, todavia, passível de objeções; Landois colocava os cristais diretamente sôbre a córtex do animal.

Baglioni e Magnini (13) e mais tarde Baglioni e Amantea (14) empregaram o método da excitação química com técnica diferente. Os primeiros colocavam um algodão embebido na solução a estudar sôbre um centro motor prèviamente determinado pela excitação elétrica, permanecendo aí o algodão pouco tempo, e o excesso de solução era retirado, absorvido com um papel de filtro. Estudaram, assim, a ação do ácido fênico, estriçnina, glicose, uréia, cloreto de sódio, picrotoxina, etc.

Classificaram estas substâncias em dois grupos: 1) as que em solução diluída não agem sôbre a córtex mas, em solução concentrada, produzem uma depressão dos centros corticais; neste grupo colocaram o ácido fênico, a glicose, o cloreto de sódio, a uréia; 2) as que em solução diluída aumentam a

excitabilidade do centro e causam o aparecimento de contrações clônicas espontâneas dos músculos em conexão com o centro excitado; entram neste grupo a estricnina, a picrotoxina e também o curare, anteriormente estudado por Sergi (15).

As contrações clônicas têm origem na substância cinzenta. A prévia destruição da substância cinzenta no ponto em que se vai aplicar o excitante químico, impede o aparecimento das contrações clônicas.

Baglioni e Magnini dirigiram sua atenção, de maneira particular, para as diferenças de ação do ácido fênico e estricnina sobre a medula espinhal. Em pesquisas anteriores sobre a ação destas substâncias na medula espinhal de batráquios, Baglioni (16) encontrou uma eletividade de ação do ácido fênico para os cornos anteriores e da estricnina para os cornos posteriores da medula espinhal.

Este fato levou Baglioni e Amantea (17) a utilizar a excitação química como método de exploração funcional centros corticais cerebrais.

Posteriormente, Dusser de Barenne (18) empregando técnica idêntica, mas utilizando-se exclusivamente da estricnina, explorou sistemáticamente as áreas sensitiva e motora da córtex cerebral de macacos com resultados hoje clássicos.

Baglioni e Dusser de Barenne divergiram em alguns pontos. Para Baglioni a estricnina tem uma eletividade de ação em tôdas as estruturas funcionalmente sensitivas. Que isto não era verdadeiro mostrou-o Dusser de Barenne (19) em seus estudos sobre a estricnização dos gânglios espinhais. Estes gânglios, funcionalmente sensitivos, fazem parte das vias dos reflexos espinhais; sua estricnização em nada alterou os reflexos. Mesmo Baglioni, não obtendo uma resposta motora pela aplicação de soluções de ácido fênico sobre a córtex motora, mostrava que suas idéias iniciais, aplicáveis à medula espinhal, não valiam para todo o sistema nervoso central. Ficou, porém, a idéia da exploração funcional do sistema nervoso pela excitação química direta que, posteriormente, foi desenvolvida por Dusser de Barenne e Amantea.

Os estudos de Amantea foram executados principalmente em cães. Seus trabalhos foram realizados sobre a córtex cerebral motora. Depois de determinar pela excitação elétrica um centro motor, colocava sobre este um papel embebido em estricnina a 1%.

Além das contrações clônicas já assinaladas em trabalho anterior com Baglioni, Amantea (20) chama a atenção para o aparecimento de uma área cutânea com caracteres especiais no lado contra lateral ao excitado com estricnina. Esta área cutânea superpunha-se aos músculos nos quais apareciam os

fenômenos clônicos e diferia das regiões cutâneas adjacentes pela influência que exercia, quando excitada com estímulos tactís ou dolorosos, sôbre a intensidade e frequência das contrações clônicas. Seu aparecimento precedia as contrações clônicas e as excitações tatis ou dolorosas, neste período, facilitavam a aparição das contrações clônicas nos músculos em ligação com o centro estriçnizado.

Esta área foi designada por Amantea como área reflexogênea, caracterizando-se por possuir aí a pele uma hipersensibilidade aos estímulos indicados. A estriçnização localizada de um centro motor da córtex cerebral do cão provocava o aparecimento de uma área cutânea hipersensível.

Os estímulos que incidem sôbre a área reflexogênea não só aumentam a intensidade e frequência das contrações clônicas dos músculos em ligação com o centro estriçnizado, como facilitam a irradiação do clônus à outros músculos e o desenvolvimento de contrações clônico-tônicas generalizadas com aspecto de um ataque convulsivo epileptiforme.

Êste fato foi descoberto por Amantea (21) durante uma experiência de estriçnização localizada da córtex, e estudado em seguida mais pormenorizadamente em colaboração com seus discípulos. Obteve resultados idênticos em sucessivas experiências particularmente em cães que a prévia determinação elétrica do centro sensitivo-motor, mostrava um limiar de excitabilidade muito baixo.

Os resultados obtidos por Amantea não foram confirmados por todos os autores, particularmente no que diz respeito às convulsões.

Dusser de Barenne, empregando técnica idêntica, mas realizando suas experiências em gatos e macacos (18), encontrou que o aparecimento da área cutânea hipersensível não se faz exclusivamente do lado oposto ao centro estriçnizado, mas de ambos os lados. Há, além disso, alterações da sensibilidade profunda, sendo que estas se limitam quase ou exclusivamente ao lado contra lateral do ponto cortical estriçnizado. As contrações clônicas raramente apareceram e quando apareciam, limitavam-se a pequenos feixes musculares. Os fenômenos de hiperestesia e hiperalgesia foram os que sempre predominaram.

Para Dusser de Barenne estas diferenças nos resultados são explicáveis pela diferença na maneira de aplicar a estriçnina. A técnica seguida por Dusser de Barenne foi a seguinte: uma pequena mecha de algodão é enrolada na ponta de uma pinça, cortando-se a extremidade de maneira que se forme uma superfície com cêrca de 1 milímetro quadrado. Esta mecha assim preparada é parcialmente mergulhada em uma solução de estriçnina a 1 por cento corada

pelo azul de toluidina. A introdução somente da extremidade da mecha na solução de estricnina impede uma excessiva absorção da solução e transporte para a córtex. Antes de aplicar a estricnina, a superfície cortical é seca do excesso de líquido céfalo-raquidiano com algodão. Após a aplicação da solução de estricnina, o excesso de solução deixado sobre a córtex é absorvido com um algodão umedecido em solução fisiológica. Sobre o ponto que foi aplicada a solução vê-se uma pequena área, de cor azulada, correspondendo ao ponto estricnizado. Em outra memória, Dusser de Barenne (22) passou a empregar a técnica de Baglioni e Amantea, isto é, de pequenos quadrados de papel de fitro, porém com solução de estricnina mais concentrada — 3%. Estas experiências foram realizadas na córtex de macacos; na primeira memória as experiências foram realizadas em gatos. Em ambos os casos não obteve sintomas de excitação motora nítidos, mesmo quando a aplicação era feita sobre um ponto motor previamente determinado pela excitação elétrica.

Atribui Dusser de Barenne as divergências às quantidades de estricnina levadas ao contato com o córtex cerebral.

Ao nosso ver não é aí que reside o motivo das diferenças encontradas, mas nos efeitos da anestesia que talvez ainda persistissem, mesmo deixando Dusser de Barenne, após a aplicação da estricnina, o animal voltar a si. Os efeitos dos anestésicos sobre o sistema nervoso e particularmente sobre os fenômenos convulsivos, são muito duradouros. Mesmo depois dos animais recuperarem da anestesia e aparentarem normalidade, persistem ainda efeitos dos anestésicos.

Poderíamos citar, como exemplo esclarecedor, o do clorofórmio, éter e protóxido de azoto nas convulsões produzidas pelo resfriamento brusco da medula espinhal da rã (23). Depois de uma anestesia de 15 a 20 minutos com éter ou clorofórmio e de um intervalo de 45 minutos a uma hora de interrupção da anestesia, os animais com aparência normal, ainda não se conseguiam convulsões. No caso do protóxido de azoto, a insuflação do gás não provocou anestesia, havendo, porém, ação impediante sobre as convulsões.

Depreende-se dos protocolos de Dusser de Barenne que o intervalo decorrido entre o fim da anestesia e a aplicação da estricnina era muito curto e, talvez, dentro dos limites de uma ação impediante do anestésico.

As diferenças de resultados não podem ser atribuídas ao emprêgo de animais diferentes.

Em um trabalho anterior (24), em colaboração com M. Vianna Dias, mostramos que a excitação do giro precentral de macacos (*M. rhesus*) com estricnina, produz convulsões semelhantes às observadas por Amantea em cães. Estas convulsões se iniciavam sempre por contrações clônicas limitadas

aos músculos em ligação com o centro motor estriçnicizado e generalizando-se depois de algumas excitações mecânicas sobre a área cutânea reflexogênea. Como já foi assinalado para os cães, por Amantea, nem todos os animais deram convulsões; os animais podem ser classificados em naturalmente predispostos e não predispostos às convulsões.

Em uma outra espécie de macaco, natural das nossas matas (*C. capucinus*) os fenômenos motores, conseqüentes à estriçnicização da córtex cerebral, aparecem com grande facilidade, as convulsões surgindo sem necessidade das excitações tátis e dolorosas, muitas vêzes, poucos segundos depois de iniciada a estriçnicização. Nos macacos desta última espécie obtivemos convulsões em todos os exemplares experimentados; nas experiências com macacos rhesus só obtivemos em 20 %.

Tem-se admitido que esta ação convulsivante da estriçnicina não é o resultado de uma ação local da estriçnicina, produzindo uma modificação que dá origem a formação de um centro epileptogênico, mas de uma absorção e ação geral sobre a córtex.

Bremer e Kleytjens (I), em uma recente revisão geral sobre córtex dizem:

“Mais la strychnisation d'une région corticale, quelle que soit son intensité (à la condition, bien entendu, que la dose ne soit pas telle que le poison puisse atteindre l'ensemble de l'écorce par la voie sanguine), n'a jamais comme conséquence l'apparition d'une syndrome épileptique généralisé. La région strychnisée, bien qu'elle soit le siège d'ondes életriques d'un voltage considerable, ne devient jamais un foyer épileptogène. La raison en est, sans doute, que les resistences synaptiques, restées normales dans les territoires corticaux qui entourent la region strychnisée, opposent une barrière efficace aux ondes qui naissent dans celle-ci et se propagent a son interieur, ainsi qu'il est aisé de le constater oscillographiquement”.

Para Bremer e Kleytjens a estriçnicização localizada de uma região cortical do cérebro não dá origem a convulsões generalizadas, se a dose fôr suficientemente pequena para não atingir toda a córtex.

As experiências sobre esta forma de convulsões mostram que ataques epileptiformes podem ser desencadados com doses de estriçnicina muito variáveis. Em algumas experiências uma única aplicação de estriçnicina pode desenvolver um ou mais ataques convulsivos, sem intervenção de excitações sensoriais na área reflexogênea, ataques espontâneos.

(I) Bremer, F. et Kleytjens, F. — Systeme nerveux cérébro-spinal. (Juillet 1937 — Juillet 1938). Physiologie (Revue Annelle). Actualités scientifiques et industrielles pg. 60, 1938.

O seguinte protocolo de experiências que realizamos é ilustrativo:

Cão 3.400 grs., fêmea. (Experiência de 13 de janeiro de 1939). Hemisfério cerebral, na região da zona motora, pôsto a descoberto (lado direito). Trepanação sem anestésico. Operação terminada às 11.30. A meninge foi retirada às 13.10. Às 13.45 — Determinação do centro motor do músculo orbicular da palpebra esquerda. 13.52 iniciada a estricnização do centro anteriormente determinado com uma solução de estricnina a 1%. 13.53 — o clonus apareceu espontaneamente no orbicular, irradiou-se à pata anterior esquerda, seguindo-se depois forte ataque epileptiforme.

13.56 — Clonus espontâneo do orbicular que aumentou de intensidade e irradiou-se aos outros músculos, generalizando-se e formando forte ataque; segue-se, sem interrupção, um segundo ataque, durando ambos um total de três minutos.

14.02 — Novo ataque espontâneo que durou 2m.45.

14.05 — Novo ataque espontâneo que durou 2m.40.

Logo que terminou o ataque anterior, iniciou-se, simultaneamente, forte clonus no orbicular da pálpebra e na pata anterior esquerdas, seguindo-se ataque que durou mais de três minutos.

A seguir o cão foi tendo ataques fortes quase sem interrupção, num verdadeiro estado de mal epilético.

14.15 — Temperatura retal 41.º.

14.26 — Continuam os ataques violentos e ininterruptos. Injeção na safena de 20cm³ de sôro glicozado a 10 %.

14.35 — Ataques convulsivos de forte intensidade. Temperatura retal 42.º.

14.50 — O animal continua dando ataques quase sem interrupção e violentos. Temperatura retal 42.º 5.

Em outros cães, uma repetida aplicação de estricnina sôbre o ponto motor cortical, por longo tempo, não é seguida da aparição de fenômenos convulsivos; os fenômenos motores permanecem localizados aos músculos em ligação com o ponto estricnizado. Se as crises convulsivas dependessem de uma absorção da estricnina e ação em outros pontos corticais, certamente as convulsões apareceriam também neste último caso. Isto, porém, não sucede em uma sensível percentagem de cães (cães não predispostos).

Quando a renovação do papel com estricnina é freqüente e repetida por longo tempo, começam a aparecer os fenômenos de intoxicação estrícnicla clássicos, facilmente reconhecíveis e distinguíveis dos fenômenos convulsivos por

estricnização localizada da córtex cerebral; esta forma de convulsões nada tem de semelhante com as convulsões estrícnicas medulares.

Não há, ademais, evidências seguras que a generalização das convulsões por estricnização da córtex cerebral motora, exija uma participação dos outros pontos corticais do cérebro. A generalização pode depender de centros localizados em pontos mais baixos do sistema nervoso central.

A ausência de irradiação das "ondas estrícnicas" aos outros pontos da córtex cerebral não é fator impediante para que o centro estricnizado funcione como centro epileptogênico. Essa questão será estudada, posteriormente, com mais detalhe.

Contam-se às dezenas as substâncias cuja ação sobre a córtex cerebral já foi estudada com a técnica da Baglioni e Amantea. Em tese publicada há alguns anos, Rizzolo (25) faz uma exposição completa da bibliografia existente até aquela época.

Abstemo-nos, assim de enumerar aqui tôdas as substâncias estudadas e indicar os seus efeitos. Limitamo-nos a aquelas que interessam ao nosso trabalho, isto é, às substâncias que existem normalmente no organismo e particularmente às que parecem representar papel importante no funcionamento do sistema nervoso.

O emprêgo da excitação química direta da córtex cerebral, restrito às substâncias que experiências de outra natureza demonstram desempenhar função primordial na atividade do sistema nervoso, talvez seja uma das formas de abordar a natureza das alterações químicas que se devam passar no centro epileptogênico.

De certo modo, a aplicação direta destas substâncias sobre a córtex cerebral, poderia ser uma forma artificial de aumentar, súbitamente, sua concentração em determinados centros nervosos, e os fenômenos motores ou elétricos, decorrentes deste aumento, interpretados como uma consequência deste. Pode-se imaginar que em dadas condições, ocorra espontaneamente um aumento de substâncias existentes normalmente no cérebro (como a acetilcolina) em certos centros nervosos e seja a causa de descargas convulsivas. Assim, Loewy (26) dosou o conteúdo em acetilcolina do sistema nervoso central de rãs submetidas à convulsões estrícnicas e encontrou uma concentração duas vezes maior do valor normal.

Êstes resultados foram confirmados por Cortell, Feldman e Gellhorn (27), que encontraram um aumento da taxa de acetilcolina na medula e cérebro de rãs com convulsões estrícnicas, mas não obtiveram aumento nos hemisférios

cerebrais de coelhos com convulsões pelo metrazol e estriçnina, após tratamento com eserina. Fegler, Kowarzyk e Lelusz (28) encontraram no cérebro de coelhos com convulsões estríçnicas, um aumento da taxa de acetilcolina livre.

Estas experiências nem sempre levaram em conta o segmento do sistema nervoso em que agiu o convulsivante. Êste ponto talvez esclarecesse as divergências. Além disso, o aumento da taxa de acetilcolina poderia, nas experiências citadas ser, muito provàvelmente, efeito e não causa.

Certamente, a questão só pode ser tomada, por enquanto, como simples hipótese de trabalho.

Já foi anteriormente mencionado ter Landois (12) empregado diversas substâncias químicas como excitantes da córtex cerebral; êste autor fez experiências em coelhos e cães. Usou várias substâncias, colocando-as sôbre a córtex cerebral motora sob forma cristalina ou em solução. Entre as substâncias empregadas podemos citar: a creatina, a creatinina, a uréia, o urato de sódio e o cloreto de sódio e de potássio.

Nem todas mostraram efeitos convulsivantes. A creatina, aplicada em pó sôbre a córtex, foi a que forneceu resultados mais constantes. A uréia mostrou-se inativa e o cloreto de sódio e de potássio provocaram sempre fenômenos motores localizados.

O trabalho de Landois é passível de algumas críticas. Em primeiro lugar Landois fez experiências sôbre cães e coelhos, mas no seu trabalho não especifica se tôdas as substâncias químicas estudadas foram empregadas tanto em cães como em coelhos e, portanto, se as suas conclusões se aplicam a ambos os animais. O coelho é um animal que dá com dificuldade ataque por excitação química direta do córtex cerebral. O método, que tem sido últimamente muito empregado, especialmente com estriçnina, em coelhos, revela que os efeitos são, comumente, localizados aos músculos em ligação com o centro estriçnizado. Consegue-se, com dificuldade, irradiação do clonus aos músculos vizinhos. Em algumas experiências que realizamos, jamais conseguimos, com estriçnina, ataque epileptiforme generalizado.

Não sabemos se os resultados negativos que Landois assinala com algumas substâncias, são devidos à escolha do animal. Além disso, Landois experimentou com substâncias químicas sob forma cristalina ou em "soluções adequadas", mas não diz a concentração que foi usada, tão pouco quanto tempo depois do emprêgo das soluções os ataques sobrevieram. Não diz ainda se re-

novou a aplicação dos cristais ou soluções e por quanto tempo, sobre a córtex dos animais.

Êstes pontos são importantes para ajuizar do mecanismo de formação do centro epileptogênico. Em experiências ainda não publicadas, vimos que tanto o cloreto de sódio, como a glicose, aplicada sobre a córtex cerebral motora de cães em soluções hipertônicas, podem criar centros epileptogênicos, enquanto que as soluções isotônicas são ineficazes. A aplicação deve ser renovada com intervalos de cerca de 4-6 minutos e mantidas pelo espaço de uma hora.

Pode-se admitir, então, que as soluções hipertônicas (e podemos nos perguntar se o mesmo não se passa com a aplicação de cristais), acarretam alterações celulares que secundariamente levam à crises convulsivas. Neste caso, os efeitos convulsivantes de substâncias empregadas em soluções hipertônicas devem ser considerados inespecíficos, se não forem considerados outros fatores.

Gallerani e Lussana (29) estudaram também os efeitos da creatina sobre a córtex de cães e coelhos e pombos. Êstes autores aplicaram sobre a córtex cerebral cristais de creatina e obtiveram, em cães, violentos acessos convulsivos; em coelhos os fenômenos motores se estenderam aos dois lados, mas eram menos intensos e mais acentuados no lado contra-lateral ao ponto cortical excitado; em pombos, a aplicação de creatina à metade posterior do hemisfério cerebral, gerava fenômenos que os autores interpretaram como sendo de natureza sensorial; tanto a aplicação à metade posterior como à anterior jamais provocou convulsões. Além da creatina estudaram os efeitos da uréia, ácido úrico e uratos; tôdas as três substâncias se mostraram ineficazes como convulsivantes.

Em 1909, Baglioni e Magnini (13) prosseguiram seus estudos sobre a ação de substâncias químicas sobre a córtex cerebral e investigaram a influência da glicose, uréia, e cloreto de sódio, além de várias outras substâncias, porém de natureza estranha ao organismo. Seus resultados assinalam uma ação depressora sobre a excitabilidade cortical, quando as soluções empregadas são de forte concentração. Em concentrações mais fracas há, raramente, contrações clônicas; nas concentrações mais fortes podem aparecer, posteriormente, fenômenos paralíticos idênticos aos observados pela ablação da zona motora.

Amantea, em 1920 (30), aplicou sobre a córtex motora de cães solução millessimal de adrenalina, não observando alguma alteração da excitabilidade cortical nem fenômenos motores.

Mais recentemente, os estudos voltaram-se particularmente para um grupo de substâncias cuja ação interessava ao esclarecimento de certos pontos da fisiologia do sistema nervoso. São elas a acetilcolina e o potássio.

Depois da descoberta de Loewy que a excitação do pneumogástrico e do simpático da rã era acompanhada da liberação de substâncias cuja ação se identificava com os efeitos cardíacos produzidos pela excitação dos respectivos nervos, os estudos do mecanismo de passagem do influxo nervoso do nervo para o efetuator ou através das sinapses centrais, seguiu um rumo inteiramente novo.

Loewy limitou-se, preliminarmente, a experimentar sobre o coração de rã. Muitos outros autores estenderam estes resultados não só a outras partes do sistema parasimpático como a outros animais, inclusive mamíferos. Cannon e colaboradores desenvolveram especialmente as pesquisas que se referem à excitação do simpático.

E' grande, hoje o número de fisiologistas que admite existir, simultaneamente com a passagem do influxo nervoso nas sinapses ou terminações nos órgãos das fibras do sistema nervoso autônomo, liberação de substâncias cuja composição química se aproxima muito da acetilcolina, para o caso da excitação do parasimpático e da adrenalina para o simpático, e que intervêm diretamente no mecanismo de passagem do influxo nervoso.

A questão foi posta para a transmissão do influxo nervoso nas sinapses do sistema nervoso central e nas terminações motoras dos músculos estriados.

Não faremos aqui um resumo do que foi feito, por fugir à finalidade d'este trabalho. O assunto está sendo ainda hoje exaustivamente investigado em numerosos laboratórios e excelentes revisões têm aparecido nestes últimos anos, expondo os fatos e as hipóteses em conflito.

Entre as objeções feitas à hipótese de que a passagem do influxo nervoso pelas sinapses do sistema nervoso central se faz por intermédio da acetilcolina, há a que esta substância não possui ação excitante sobre a córtex cerebral, mesmo quando aplicada diretamente.

Fulton (II), em seu tratado sobre a fisiologia do sistema nervoso, diz:

“It has been suggested therefore that acetylcholine is the synaptic transmitter here and probably also in the central nervous system. Acetylcholine has been injected into the cerebral ventricles. Eserine, moreover, is said to augment certain reflexes. However, local application of acetylcholine on the cerebral cortex is wholly without excitatory effect”.

(II) Fulton, J. F. — *Physiology of the nervous system*, 1938, pg. 74.

Vários experimentadores abordaram o problema da ação excitante da acetilcolina sobre o sistema nervoso central. Feldberg e Minz (31) estudando a influência da acetilcolina sobre a secreção da adrenalina, observaram que a injeção endovenosa de 5-10 mlgr. de acetilcolina provocava no animal fenômenos convulsivos ou contrações musculares generalizadas; admitiram ser de origem central visto que desapareciam pela destruição do cérebro e da medula; mas estes autores obtiveram contrações musculares pela injeção de acetilcolina por via arterial, mesmo depois da seção dos nervos.

Freytag e Schilf (32) injetaram acetilcolina em diversas partes do cérebro e da medula de gatos sem obter sinais de ação central dessa substância. Rosenbaum (33) obteve ocasionalmente contrações musculares pela aplicação de acetilcolina diretamente sobre a córtex cerebral de cães; mas estes resultados foram inconstantes; algumas vezes a aplicação de concentrações fracas dava resultados positivos e a de concentrações muito mais fortes era ineficaz.

Schilf e Sternberg (34) aplicaram sobre a córtex de gatos e coelhos soluções de acetilcolina que chegaram a 50 e 100 % sem observar fenômenos de excitação. Estes autores repetiram as observações de Feldberg e Minz e obtiveram convulsões de caráter transitório. Admitem que estas não sejam uma manifestação da ação central da acetilcolina, visto que, a injeção de histamina, por via venosa, provoca também fenômenos idênticos; admitem que os fenômenos observados são condicionados por alterações circulatórias.

Outros abordaram a questão por via diferente. Uma ação da acetilcolina sobre a córtex foi posta em evidência por Bonnet e Bremer (35) e por Miller e Stavradi (36) e outros, utilizando técnicas oscilográficas.

Bonnet e Bremer trabalharam com preparações de "encéfalo isolado" e animais fora da ação de anestésicos. Observaram que a injeção por via carotidiana de doses de acetilcolina de menos de 0,5 gama, já produzia forte excitação das células corticais com aumento da amplitude e frequência das ondas elétricas; doses fortes têm uma ação depressora, suprimindo as ondas elétricas da córtex.

Miller e Stavradi trabalharam em coelhos e gatos anestesiados e aplicaram acetilcolina diretamente sobre a córtex, observando depois os efeitos sobre o eletrocorticograma. Aplicada na córtex de animais que não foram previamente tratados pela eserina, a acetilcolina revelou uma ação depressora sobre

certas ondas do electrocorticograma; soluções de 0,2-1% de acetilcolina revelaram ação fraca em contraste com os fortes efeitos obtidos com a eserina. Não assinalam efeito motor.

Quando a córtex era previamente submetida a ação da eserina, a acetilcolina provocava sensíveis alterações do electrocorticograma, com fenômenos motores que consistiam em fibrilações e tremores, acompanhados de movimentos de mastigação (experiências feitas em coelhos), o que indicava uma excitação da córtex. A atropina por injeção e aplicação direta na córtex numa concentração de 0,2%, impedia a aparição das ondas que foram observadas pelo emprêgo da acetilcolina-eserina.

Os resultados discordantes encontrados pelos autores acima citados poderiam, em parte, ser explicados por uma ação de anestésicos. Chamamos a atenção, anteriormente, para a importância dos efeitos dos anestésicos sobre as convulsões por resfriamento da medula espinhal da rã e na aparição de contrações clônicas e reações convulsivas pela estriçnização da córtex cerebral. Esta ação inibidora dos anestésicos explica a constância dos resultados que obtivemos.

Em um trabalho anterior em colaboração com M. Vianna Dias (37) mostramos que a acetilcolina possui, aplicada sobre a córtex cerebral de cães, forte ação convulsivante. Estes nossos primeiros resultados concordam com os obtidos antes e independentemente por Longo (38). Continuamos as experiências, estendendo-as a outros animais. A seguir daremos os resultados de experiências feitas posteriormente e outros detalhes das já publicadas.

A técnica empregada foi a seguinte: o animal era trepanado sem anestésico ou sob a ação da morfina e a zona motora posta a descoberto. Entre o fim da trepanação e o início da experiência decorria um prazo de 1-2 horas. A determinação do ponto motor era feita pela excitação elétrica com uma bobina de indução e eletródio unipolar. Sobre o centro determinado pela excitação elétrica era aplicada a solução de acetilcolina na concentração a estudar. As soluções de acetilcolina (Acetylcholine "Roche") eram de preparação recente. Estudamos também a influência do cloreto de potássio. Os animais empregados eram todos adultos. A maioria das experiências foi realizada sobre cães. Realizamos também experiências sobre macacos.

No quadro seguinte enumeramos os resultados em cães que não foram submetidos à ação da morfina :

QUADRO I

CÃO Nº.	CONCENT. ACH.	CONTR. CLONICAS	CONVULSÃO DEPOIS DE (minutos)	DURAÇÃO RENOVAÇÃO ACH (minutos)
1	10%	fortes	7'	7'
1	1%	fracas	—	30'
2	10%	fracas	—	20'
3	1%	fracas	—	13'
4	10%	fortes	1'	1'
5	10%	fortes	5'	5'
6	1%	fracas	—	30'
7	10%	fortes	2'	30'
8	10%	não	—	30'
9	10%	fortes	1'	5'
10	1%	não	—	27'
11	10%	fortes	50 seg.	3'
11	1%	fracas	—	25'
12	5%	fortes	—	30'
13	10%	fracas	—	20'
14	10%	fortes	—	32'
15	10%	fracas	—	35'
16	10%	fracas	—	30'
17	10%	fortes	—	30'
18	10%	fortes	1'30	5'
18	1%	fracas	—	30'
19	10%	fortes	3'	8'
20	10%	fortes	—	25'
21	1%	fracas	—	21'
22	10%	fortes	3'	5'
22	0.2%	fracas	—	29'
23	10%	fracas	—	20'
24	10%	fracas	—	32'
25	10%	fortes	—	28'
26	10%	fortes	—	40'
27	1%	fortes	—	18'
28	1%	fortes	—	17'
29	1%	fortes	13'30	13'+30
30	1%	fracas	—	21'
31	10%	fortes	—	20'
32	10%	fortes	—	30'
33	10%	fracas	—	20'
34	10%	fortes	4'	4'
35	10%	fortes	1'45	1'45
36	10%	fortes	2'	2'
36	1%	fortes	18'	18'

No quadro acima vê-se que quase a totalidade dos cães apresentaram fenômenos motores pela aplicação de acetilcolina sobre um centro motor cortical. O critério para avaliar os fenômenos motores (contrações clônicas) era baseado na intensidade e frequência das contrações musculares. As contra-

ções clônicas ora ficavam estritamente limitadas aos músculos em conexão com o centro excitado, ora se irradiavam aos músculos vizinhos espontaneamente ou após algumas excitações da pele que recobre os músculos em clônus. Só assinalamos os casos em que a irradiação do clônus se generalizava e formava ataque epileptiforme. Na 4.^a coluna está indicado o tempo que decorreu entre o início da aplicação da acetilcolina e a aparição do ataque. Na 5.^a coluna indicamos o tempo que durou a aplicação da acetilcolina, sendo esta renovada com intervalos de 4-6 minutos; a aplicação era feita pela imbibição de pequenos quadriláteros de papel de filtro de 2mm de lado, na solução a estudar.

As excitações foram feitas, principalmente, com soluções de acetilcolina na concentração de 1 e 10%. Os nítidos resultados obtidos com a solução à 1% que possui uma pressão osmótica próxima da dos tecidos, afasta a hipótese de uma ação osmótica. Com solução a 10%, as contrações clônicas surgiram em 96,3% dos cães e em 44,4% houve generalização e ataque epileptiforme. Os ataques sobrevieram ou espontaneamente ou depois de excitações mecânicas cutâneas. As excitações cutâneas nem sempre facilitam a irradiação das contrações clônicas; em alguns casos parece haver inibição do clonus.

Os ataques surgem, para as concentrações de 10% de acetilcolina, poucos minutos depois de iniciada a experiência. Uma repetida renovação da acetilcolina, não leva sempre a um aumento da intensidade e freqüência do clônus com maior irradiação, mas, ao contrário, varias vêzes ha uma diminuição e mesmo abolição das contrações clônicas. O aumento da intensidade e freqüência das contrações clônicas dá-se nas primeiras aplicações da acetilcolina; depois há uma estabilização ou decréscimo. Se o ataque não surge nos primeiros minutos êle, em geral, não se apresenta mais. O centro que não responde mais pela renovação da acetilcolina, mostra-se ainda normalmente excitável pela correntes elétrica. As excitações mecânicas cutâneas nem sempre aumentam as contrações clônicas e facilitam a aparição das convulsões; em alguns casos parecem provocar inibição do clônus.

O número de experiências com solução de acetilcolina a 1% não permite concluir sôbre a freqüência de aparição de contrações clônicas e ataques convulsivos; deixa claro, entretanto, que possui nítida ação excitante. Em uma das experiências empregamos solução a 0,2% com resultado positivo.

Fizemos também experiências em macacos das espécies *Macaca mulata* e *Cebus capucinus*. Da primeira espécie de macacos só obtivemos três exemplares. Em todos os casos aplicamos acetilcolina a 10% sôbre o centro do orbicular da pálpebra e obtivemos contrações clônicas fortes, mas limitadas aos

músculos em ligação com o centro excitado. Excitação mecânica cutânea provocava irradiação limitada; em nenhum caso obtivemos convulsão.

Da espécie *Cebus capucinus* dispusemos de oito exemplares. Ensaíamos obter ataques convulsivos com concentrações baixas de acetilcolina baseados na grande facilidade que tem êsses animais de reagir convulsivamente como constatamos para a estricnina (24). Os resultados são resumidos na tabela abaixo.

QUADRO II

CEBUS Nº	CONCENT. ACH.	CONTR. CLONICAS	CONVUL. DEPOIS DE (minutos)	DURAÇÃO RENOVAÇÃO (minutos)
I	1%	fortes	2'	2'
I	0,5%	fortes	—	23'
II	1%	fortes	8'	10'
II	0,5%	fracas	15'	18'
III	0,1%	fracas	—	15'
III	0,5%	fortes	—	15'
IV	0,2%	fortes	—	15'
IV	0,5%	fortes	—	23'
V	1%	fortes	27'	30'
V	0,2%	fortes	27'	20'
VI	10%	fortes	7'	8'
VI	1%	—	—	20'
VII	1%	fracas	—	20'
VII	20%	fortes	—	21
VII	10%	fortes	—	2'1
VIII	1%	fortes	—	25'
VIII	0,2%	—	—	16'

Fizemos ainda experiências sobre a córtex de três gatos e três coelhos. Em todos os casos foi aplicado acetilcolina a 10%; dos três gatos, um deu ataque convulsivo 18 minutos depois de iniciada a aplicação da solução; os outros dois só apresentaram fenômenos motores localizados; os coelhos também apresentaram fenômenos de excitação motora mas em nenhum dos casos obtivemos ataque convulsivo. Não multiplicamos as experiências porque já tínhamos verificado a dificuldade de obter convulsões pela excitação da córtex cerebral de coelhos tanto pela estricnina como pela corrente elétrica. Ficava evidente, porém, que a acetilcolina exercia ação excitante também sobre a córtex destes animais, provocando fenômenos motores.

Os macacos experimentados foram obtidos no Laboratório de Febre Amarela da Fundação Rockefeller, por intermédio dos Drs. H. A. Penna e N. W. Laemaert e Sr. A. S. Cabral a quem agradecemos.

Influência da atropina, eserina e nicotina aplicada sobre um centro cortical submetido à ação da acetilcolina.

Como se sabe para o sistema nervoso autônomo, a eserina reforça os efeitos da acetilcolina, a atropina inibe os efeitos muscarínicos e a nicotina os nicotínicos.

Procuramos ver qual é a ação exercida por estas substâncias sobre os efeitos provocados pela acetilcolina aplicada sobre a córtex.

a) *eserina*: Experimentamos aplicar eserina (sulfato) em solução, sobre centros corticais que anteriormente já tinham sido submetidos à ação acetilcolina e cujos efeitos já eram conhecidos.

A aplicação era feita depois que os efeitos da acetilcolina já tinham desaparecido. O reinício da aplicação da acetilcolina era feito quando a eserina não provocava efeitos motores que viessem interferir com os causados pela acetilcolina ou quando aqueles eram suficientemente diminutos para dar margem a comparar com os provocados pela acetilcolina (como já foi verificado a eserina possui ação excitante sobre a córtex, produzindo fenômenos clônicos e ataques convulsivos).

As soluções de eserina empregadas eram de preparação recente. As experiências foram feitas em cães e macacos (*Cebus*).

Experimentamos em quatro cães tomando como base os casos em que a prévia aplicação de acetilcolina não provocava fenômenos motores ou estes eram fracos. Como já dissemos anteriormente, as soluções concentradas de eserina fazem aparecer fenômenos clônicos intensos que podem mascarar os exercidos pela acetilcolina. Soluções a 1/10.000 de eserina não provocam efeitos motores sobre a córtex dos cães ou estes são de intensidade bem reduzida. Em todos os casos observados, as contrações clônicas provocadas pela acetilcolina, após o tratamento do centro com a solução de eserina, eram nitidamente mais fortes que as obtidas pela simples aplicação de acetilcolina. Em uma das experiências houve irradiação das contrações clônicas e ataque convulsivo. A seguir damos um protocolo ilustrativo da marcha da experiência :

Cão. 7.400 grs. Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Operação terminada às 10.20.

11.45 — Determinação do centro motor do orbicular da pálpebra. Ataque por excitação elétrica.

11.55 — Aplicação de sol. de acetilcolina a 10% sobre o centro do orbicular.

- 11.58 — Renovado o papel com acetilcolina. Não há clônus. Excitação mecânica cutânea. O clônus aparece, irradia-se e forma-se forte ataque convulsivo que dura cêrca de um minuto.
- 12.03 — Suspensa a acetilcolina.
- 12.07 — Excitação mecânica do orbicular não produz mais clônus.
- 13.45 — Reinício da acetilcolina sôbre o mesmo centro com solução a 1%.
- 13.49 — Novo papel com ACh. Excitação mecânica não clônus.
- 13.52 — Novo papel com ACh. Excitação mecânica não clônus.
- 13.56 — Novo papel com ACh. Excitação mecânica não clônus.
- 14.00 — Novo papel com ACh. Excitação mecânica não clônus.
- 14.03 — O clônus continua ausente mesmo após excitação mecânica.
- 14.06 — Suspensa a acetilcolina.
- 14.20 — Início da aplicação de eserina a 1/100.00 sôbre o centro.
- 14.25 — Novo papel com eserina. Não há clônus pela excitação mecânica.
- 14.29 — Novo papel com eserina. Não há clônus pela excitação mecânica.
- 14.33 — Novo papel com eserina. Não há clônus pela excitação mecânica.
- 14.37 — Novo papel com eserina. Não há clônus pela excitação mecânica.
- 14.43 — Novo papel com eserina. Mesmo pela excitação mecânica prolongada não há fenômenos clônicos.
- 14.46 — Suspensa a eserina e reiniciada logo a aplicação de acetilcolina a 1%. Trinta segundos depois aparição de fortissimo clônus.
- 14.49 — Após algumas excitações mecânicas da pele, o clônus irradiou-se e houve ataque convulsivo fraco. O clônus continuou forte depois do ataque.
- 14.51 — Clônus forte.
- 14.55 — Novo papel com acetilcolina. Clônus forte que se propaga espontâneamente até o lábio.
- 14.58 — Novo ataque convulsivo forte.
- 15.00 — Suspensa a acetilcolina. Clônus continua forte.
- 15.05 — Ataque convulsivo espontâneo e de forte intensidade.

Experimentamos sobre dois macacos cébus em que a aplicação de acetilcolina nas concentrações de 1 e 0,2% não tinham provocado efeitos motores. Pareceu-nos ser a córtex do macaco cébus mais sensível a ação da eserina do que a do cão e por isso empregamos soluções menos concentradas desta substância. Em ambos os casos houve aparição de clônus pela aplicação de acetilcolina sobre o centro tratado pela eserina; a simples aplicação de acetilcolina tinha sido ineficaz. A seguir damos um resumo dos dois protocolos:

Cébus macho. 1.700 grs. (proveniente de Rockefeller). Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Operação terminada às 10.50.

13.45 — Início da acetilcolina a 0,2% sobre o centro flexor dos dedos.

13.50 — Novo papel com acetilcolina. Ainda não, há contrações clônicas espontâneas ou provocadas.

O papel foi renovado com intervalos de 4-5 minutos até 14.06 quando foi suspensa a acetilcolina sem que houvessem aparecido contrações clônicas espontâneas ou provocadas pela excitação mecânica cutânea.

Às 15.06 foi experimentada uma solução de eserina à 1/5.000, aparecendo espontaneamente clônus. Pouco depois foi suspensa a eserina.

16.05 — Não há mais clônus. Iniciado o emprêgo de uma solução de eserina a 1/25.000. A eserina foi renovada com intervalos de quatro minutos até 26.25, quando foi suspensa. Durante êste intervalo não obtivemos contrações clônicas nem espontâneas nem provocadas pela excitação mecânica.

16.26 — Início da acetilcolina a 0,2% sobre o centro eserinado.

16.27 — Clônus forte espontâneo.

16.30 — Novo papel com acetilcolina a 0,2%. O clônus continua forte e se irradia até o lábio.

16.32 — Pela excitação mecânica houve ataque convulsivo fraco.

16.34 — Suspenda a acetilcolina.

16.50 — Não há mais clônus espontâneo ou provocado.

Cébus macho. 2.100 grs. (proveniente da Rockefeller). Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Determinação do centro de extensão dos dedos da pata anterior. Operação terminada às 11.15.

Às 14.30 foi experimentada acetilcolina a 10%, vindo forte ataque.

15.05 — Não há mais clônus. Início da acetilcolina a 1%. A acetilcolina foi renovada com intervalos de 4-6 minutos até às 15.25 sem que houvesse aparição de contrações clônicas espontâneas ou provocadas pelas excitações cutâneas.

16.00 — Início da eserina a 1/25.000. Houve um intervalo de 26 minutos; a segunda aplicação foi feita a 16.26 com eserina na mesma concentração da aplicação anterior. A eserina foi renovada mais três vezes com intervalos de 5-6 minutos. Não houve durante este intervalo contrações clônicas espontâneas ou provocadas. Logo após a suspensão da eserina foi iniciada a aplicação de acetilcolina. Empregamos uma solução à 1/200. Poucos minutos depois veio clônus fraco. Pela excitação mecânica houve irradiação do clônus até a orelha.

Estas experiências mostram que a prévia aplicação de eserina sobre um centro motor cortical reforça os efeitos motores provocados pela acetilcolina.

b) *Atropina*: Miller, Stavradi e Woonton (39) estudaram os efeitos da atropina sobre os potenciais elétricos de um centro cortical motor submetido à ação da eserina-acetilcolina. Viram que há uma diminuição das "pontas" provocadas por estas substâncias, ao mesmo tempo que há desaparecimento dos efeitos motores. Estes autores não assinalam efeitos motores pela simples aplicação de acetilcolina sobre os centros motores mas os encontraram quando aplicaram solução de eserina a 1% ou acetilcolina e eserina simultaneamente. Os efeitos motores obtidos pela aplicação simultânea de eserina e acetilcolina podem ser devidos exclusivamente à eserina, visto que esta substância era empregada em uma concentração capaz de por si só provocá-los. Isto impede também de concluir sobre a ação da atropina nos efeitos motores da acetilcolina.

Nas experiências que realizamos, empregando doses de atropina suficientes para impedir os efeitos muscarínicos da acetilcolina, não encontramos ação inibidora nítida.

Os protocolos que se seguem resumem as experiências feitas.

Cadela. 5.200 grs. Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Operação terminada às 10.10.

11.17 — Início da acetilcolina a 10%. Pouco depois clônus após excitação mecânica cutânea.

11.20 — Clônus forte mas não se irradia pela excitação mecânica.

11.23 — Injeção na safena de 5 milgrs. de sulfato de atropina.

11.24 — Clônus permanece bom. Novo papel com acetilcolina.

11.27 — Clônus bom.

11.30 — Novo papel com acetilcolina. Clônus mais fraco. Animal extremamente sensível a qualquer estímulo cutâneo ou muscular. Não houve abolição dos efeitos motores.

Cadela. 3.200 grs. Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Determinação do centro do orbicular. Operação terminada às 11.10.

11.30 — Início da acetilcolina a 1%. O clônus aparece pouco depois. clônus fraco.

11.36 — Novo papel com acetilcolina. O clônus propaga-se pouco pela excitação mecânica.

11.42 — Novo papel com acetilcolina.

11.45 — Novo papel com acetilcolina. Clônus bom mas aumenta pouco pela excitação.

11.48 — Injeção na safena de 3 milgrs. de sulfato de atropina.

11.50 — Novo papel com acetilcolina a 1%.

11.52 — Clônus continua como antes. Aumenta pouco pela excitação mecânica. Não houve abolição dos fenômenos motores.

Cão. 5.200 grs. 11.30 — Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Determinação do centro motor do orbicular da pálpebra.

13.40 — Acetilcolina a 1% sobre o centro do orbicular. Pouco depois clônus.

13.44 — Renovada a acetilcolina. Clônus bom.

13.48 — Clônus continua bom. Injeção na safena de 5 milgrs. de sulfato de atropina. Novo papel com acetilcolina a 1%.

13.52 — Clônus continua bom e aumenta pela excitação mecânica cutânea.

13.54 — Clônus bem forte.

13.56 — Aplicação sobre o centro do orbicular de uma solução de atropina a 1 p. 1000.

14.01 — Novo papel com atropina. Clônus do orbicular continua forte.

14.07 — Novo papel com acetilcolina a 1%.

14.09 — Clônus continua bom; talvez um pouco, mais fraco. Aumenta pela excitação mecânica.

Cão. 4.700 grs. Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Determinação do centro do orbicular da pálpebra. Operação terminada às 11.10.

14.05 — Início da acetilcolina a 1% sobre o centro do orbicular. O clônus apareceu pouco depois.

Como o clônus fôsse de fraca intensidade passamos às 14.35 a empregar acetilcolina a 10%. O clônus tornou-se bastante forte.

14.49 — Colocamos sobre o centro um papel embebido em sulfato de atropina a 2/1000. O papel com atropina foi renovado de 5 em 5 minutos até 15.09.

15.12 — Acetilcolina a 10% sobre o centro do orbicular. As contrações clônicas apareceram, porém, mais fracas. Houve certa diminuição em relação às anteriores à aplicação de atropina.

Vianna Dias também experimentou a ação da atropina, empregando doses bem maiores das que empregamos. Injetava por via endovenosa sulfato de atropina nas doses de 1 a 5,5 milgrs. por Kg. de peso de cão e procurou ver o efeito sobre a predisposição aos ataques provocados pela acetilcolina e também sobre o clônus.

A predisposição aos ataques não se alterou apreciavelmente. Quanto ao clônus, a aplicação direta da atropina sobre a córtex faz diminuir a intensidade das contrações musculares ou retarda sua aparição. Em alguns poucos casos não obteve mais ataques pela injeção de atropina e emprêgo da acetilcolina a 2%.

Miller, Stavradi e Woonton não investigaram a influência da atropina exclusivamente sobre os potenciais da córtex. Não eliminaram, assim, os efeitos desta substância sobre os citados potenciais. Limitaram-se a observar os efeitos sobre os potenciais provocados após a aplicação de eserina-acetilcolina. Brenner e Merritt (40) viram que a aplicação direta de atropina sobre a córtex produz alterações do eletrocorticograma comparáveis aos observados por Miller e colaboradores sobre as "pontas" provocadas pela eserina-acetilcolina. A injeção intravenosa de atropina abolia a reação vascular provocada sobre o centro pela aplicação da acetilcolina sem alterar sensivelmente sua ação sobre a atividade neurônica.

Os efeitos da atropina parecem, assim, estar mais ligados a ação depressora que esta substância exerce sobre os centros do que a uma inibição dos efeitos muscarínicos da acetilcolina.

c) *nicotina*: Sabe-se, desde Langley, que a nicotina tem sobre as sinapses do sistema nervoso autônomo inicialmente uma ação excitante e depois paralisante.

Procuramos ver se os efeitos da acetilcolina seriam impedidos pela nicotina. A forte ação excitante exercida pela nicotina sobre a córtex cerebral impediu de observar os efeitos da acetilcolina, mesmo quando empregávamos concentrações de nicotina extremamente elevadas. Em uma das experiências chegamos a empregar uma solução de nicotina a 50% sem que houvesse inibição das contrações clônicas e dos ataques provocados pela própria nicotina.

Cão. 4.700 grs. Trepanação do lado direito. Exposição da zona motora. Determinação do centro do orbicular da pálpebra.

Tempo O — Acetilcolina a 1% sobre o orbicular.

- | | | |
|--------------|---|---|
| 4 min. | — | Renovada a acetilcolina. Clônus fraco. |
| 8 " 30 seg. | — | Renovada a acetilcolina. Clônus ainda fraco. |
| 12 " | — | Acetilcolina a 10%. |
| 13 " 30 seg. | — | Clônus aumentou muito. Pela excitação mecânica veio ataque forte que durou dois minutos. |
| 18 " | — | Injeção na safena de 1 cm ³ de uma solução de nicotina em solução a 2 p. 1000. Forte hiperpnéia. |
| 23 " | — | Renovada a acetilcolina a 10%. |
| 25 " | — | Clônus e depois ataque que durou 2 min. e 30 seg. |
| 30 " | — | Clônus forte. Aplicação sobre o centro de nicotina a 2% 2 p. 1000. |
| 33 " | — | Clônus e depois forte ataque que durou 3 minutos e 20 segundos. |
| 36 " | — | Aplicação de nicotina em solução a 50%. |
| 37 " 20 seg. | — | Forte ataque espontâneo que durou 3 minutos e 4 segundos. |
| 40 " | — | Nova aplicação de nicotina a 50%. Clônus muito forte. |
| 41 " | — | Novo ataque espontâneo. A nicotina foi renovada mais duas vezes. O clônus permaneceu sempre muito forte. |
| 55 " | — | Suspensa a nicotina por haver lesão da córtex; provavelmente devida a concentração da nicotina. O clônus continuava fortíssimo. Não foi obtido paralisante ou diminuição das contrações clônicas produzidas pela própria nicotina em grau suficiente para permitir avaliar as provocadas pela acetilcolina. |

Em experiências anteriores tínhamos ensaiado concentrações de nicotina a 2 e 10% sempre com os mesmos resultados. Estes fatos têm explicação nas observações de Rizzolo (41) que assinalou ter a nicotina a 1% ação excitante sobre a substância branca da córtex, provocando clônus e ataque.

IRRADIAÇÃO DOS ATAQUES CONVULSIVOS

A questão do mecanismo de irradiação dos ataques convulsivos corticais experimentais tem interessado a numerosos pesquisadores e é, ainda hoje, problema aberto.

Bubnoff e Heidenhain admitiam que havia uma transmissão do "estado epilético" ao outro hemisfério cerebral, mas as experiências de François-Franck e Pitres infirmaram essa hipótese. Estes autores mostraram que os ataques convulsivos podiam se generalizar num animal em que havia sido extirpado o outro hemisfério cerebral. A generalização se dava em um ponto localizado abaixo da córtex.

A questão vem sendo retomada de tempo em tempo e, ainda recentemente, Erickson (42) fez um estudo das vias de generalização do ataque. Uma exposição minuciosa da questão levar-nos-ia a um ponto distante do nosso objetivo atual.

Uma boa parte dos autores que se tem interessado pela natureza da descarga epilética, admite ser esta uma "after discharge" dos centros nervosos.

Procuramos encarar a questão por outro ângulo. Seja a descarga epilética uma "after discharge" que se propaga, ou seja este "estado epilético" de uma natureza ainda não definida, na sua irradiação aos outros pontos do sistema nervoso, essa descarga epilética atravessa sinapses que devem representar barreiras naturais.

Se a passagem pelas sinapses faz-se por um mediador químico do tipo da acetilcolina, isto é, se as sinapses centrais são colinérgicas, como admitem algumas hipótese, poderíamos perguntar se os fatores que impedem a destruição do mediador químico facilitam a descarga epilética. Seria a persistência nos meios celulares ou uma continuada produção de um agente químico que formaria a facilitaria a transmissão da "after-discharge", como discute Bronk (42) para o gânglio cervical superior.

Experimentamos a ação sobre a irradiação do clônus e formação de ataque convulsivo, de três substâncias que facilitam o acúmulo da acetilcolina por inibição da colinesterase: eserina, prostigmina e morfina.

A ação inibidora da eserina sobre a colinesterase foi estabelecida por Loewy e Navratil no período inicial dos estudos sobre os mediadores químicos. Também a prostigmina possui forte ação inibidora sobre a colinesterase, como o demonstrou Roepke.

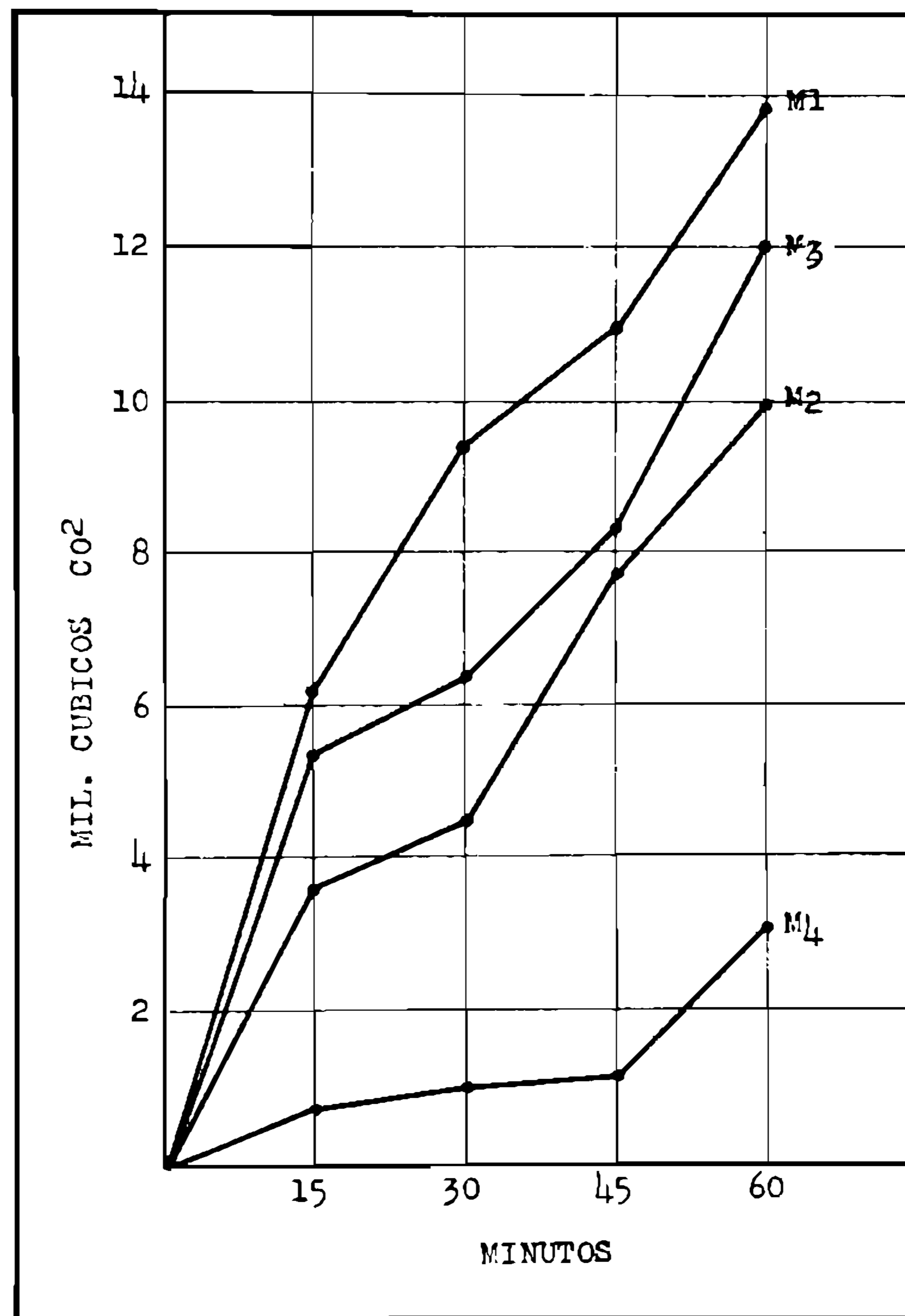
A ação inibidora da morfina sobre a colinesterase já havia sido verificada por Loewy, mas recentemente a questão foi de novo retomada.

Bernheim e Bernheim (43) mostraram que a morfina, mesmo em pequenas concentrações, inibe a colinesterase de diversos órgãos, inclusive de cérebro.

Quastel e Tennenbaum (44) experimentaram a ação da morfina sobre a contração do músculo dorsal da sanguesuga provocada pela acetilcolina e viram que esta é inibida. Estas experiências não provam que a morfina não tenha ação inibidora sobre a colinesterase.

Slaughter e Gross, baseados na ação sinérgica da morfina sobre os efeitos da eserina e prostigmina, concluem que a morfina tem uma ação colinérgica, mas que esta não se faz sentir sobre a colinesterase *in vitro*; ela só se manifesta *in vivo* (Slaughter e Lackey) (45).

Idêntica ação inibidora também encontraram Kuhn e Surles (46) e Edie (47), empregando técnicas diferentes.



M₁, M₂, M₃, M₄ indicam os manômetros com a seguinte seriação :

Manômetro	Cérebro	Acetilc.	Morfina	Eserina	Ringer
1	1cm ³	0,05cm ³	—	—	5cm ³
2	1cm ³	0,05cm ³	0,3cm ³	—	4,7cm ³
3	1cm ³	0,05cm ³	0,3cm ³	—	4,7cm ³
4	1cm ³	0,05cm ³	—	0,1cm ³	4,9cm ³

Também tivemos ocasião de ensaiar a ação da morfina sobre a colinesterase de cérebro de frangos. A verificação foi feita empregando a técnica de Amon (48), que consiste em medir em manômetro de Warburg (*) a quantidade de CO² desprendida pela ação do ácido acético resultante da hidrólise da acetilcolina sobre o bicarbonato de sódio.

Na fig. 1 está representado em ordenadas o volume de CO² desprendido e em abcissas o tempo. Ai vemos, comparativamente, a influência inibidora da morfina e da eserina e os valores encontrados sem a interferência destas duas substâncias. A ação inibidora da morfina sobre a colinesterase é nítida, porém, bem menor do que a exercida pela eserina.

A emulsão de cérebro empregada consistiu em 20 milgr. de substância cinzenta de cérebro de frango triturados em 10 cm³ de Ringer. A solução de acetilcolina era a 10%; a de morfina a 1% e a de eserina a 1% 1 p. 1000.

Damos a seguir os quadros com os resultados da influência da eserina, prostigmina e morfina sobre a aparição de convulsões pela excitação química de um ponto motor cortical.

QUADRO III

Influência da eserina e prostigmina

CÃO	ACETILCOLINA	TEMPO EM MINUTOS	CLONUS	ATAQUE	SUBSTANCIA	ACETILCOLINA	TEMPO EM MINUTOS	CLONUS	ATAQUE
1	10%	25	fraco	não	prost.	10%	20	fraco	não
2	10%	30	fraco	não	prost.	10%	30	fraco	ataque
3	10%	25	forte	não	prost.	10%	25	forte	não
4	10%	30	forte	não	eser.	10%	30	fraco	não
5	1%	30	fraco	não	eser.	1%	35	forte	não
6	10%	17	fraco	não	prost.	10%	22	fraco	não
7	10%	40	forte	não	eser.	10%	25	fraco	não

No quadro acima a 3.^a e 8.^a coluna marcam o tempo que durou a aplicação de acetilcolina sobre o centro. O papel embebido na solução foi regularmente renovado com intervalos de 4-5 minutos.

Antes da injeção de eserina e prostigmina, o animal era injetado com atropina em dose pequena que não altera a predisposição do animal aos ataques e impede que surjam os fenômenos vasculares. A eserina e prostigmina foram injetadas por via venosa. As doses foram variáveis mas em todos os casos suficientes para exercer ação inibidora sobre a colinesterase. Em alguns casos atingimos a doses que já provocavam fibrilações musculares.

(*) Essas experiências foram feitas no Departamento de Fisiologia do Instituto Biológico de S. Paulo. Queremos agradecer ao Dr. H. da Rocha Lima, Diretor do Instituto que permitiu realizar as experiências e ao Dr. Paulo E. Galvão, Chefe do Departamento de Fisiologia, que nos orientou na técnica.

Com a morfina os resultados foram os seguintes:

QUADRO IV
Influência da morfina

CÃO	ACETILCOLINA	TEMPO EM MINUTOS	CLONUS	ATAQUE	SUBSTÂNCIA	ACETILCOLINA	TEMPO EM MINUTOS	CLONUS	ATAQUE
1	10%	30	não	não	Cl. morf.	10%	30	não	não
2	1%	30	fraco	não	Cl. morf.	1%	4	forte	forte
3	1%	30	fraco	não	Cl. morf.	10%	13	forte	forte
4	10%	17	forte	não	Cl. morf.	1%	14	forte	forte
5	5%	30	forte	não	Cl. morf.	5%	1	forte	forte
5	—	—	—	—	Cl. morf.	1%	2	forte	forte
6	10%	20	fraco	não	Cl. morf.	10%	5	forte	forte
7	10%	30	fraco	não	Cl. morf.	10%	3	forte	forte
8	1%	25	fraco	não	Cl. morf.	1%	23	forte	não
9	10%	32	forte	não	Cl. morf.	10%	30	forte	não

As injeções de morfina eram feitas por via intra-peritoneal. As doses empregadas foram de 1 a 2 ctgrs. por Klgr. de peso de animal. Depois de injetada a morfina, aguardava-se um intervalo de 1 a 2 horas para reiniciar a excitação do centro cortical.

Na 8.^a coluna está indicado o tempo que decorria entre o início da excitação e o aparecimento do ataque. Quando este não se apresentava, a excitação era continuada até perfazer um tempo igual ao empregado antes da injeção de morfina.

Dos resultados acima vê-se que a morfina tem uma ação facilitante sobre a aparição das convulsões pela excitação da córtex cerebral do cão com a acetilcolina, nitidamente maior do que a eserina. Com a eserina e prostigmina somente em um caso obtivemos ataque convulsivo, depois da injeção dessas substâncias. Com a morfina em seis das nove experiências houve facilitação e os ataques sobrevieram com relativa facilidade.

Estas experiências não levam a concluir que na generalização do clônus e formação do ataque não intervenha a formação e acúmulo de alguma substância do tipo da acetilcolina, mas que esta condição não deve ser, por si só, suficiente; outros fatores devem ser considerados.

CONCLUSÕES

- 1) As soluções de acetilcolina aplicadas sobre a córtex cerebral motora de cães, gatos, macacos e coelhos, provocam forte reação motora localizada. Os resultados negativos ou duvidosos encontrados por outros autores podem ser explicados por uma influência dos anestésicos empregados.

- 2) Em cães, macacos e gatos esta ação excitante pode levar os animais a apresentar crises convulsivas epileptiformes.
- 3) A aplicação sobre a córtex de solução de eserina aumenta os efeitos excitantes de acetilcolina.
- 4) A injeção endovenosa de atropina, em dose suficiente para impedir os efeitos "muscarínicos" ou a aplicação local de concentrações relativamente baixas não fazem desaparecer os efeitos da acetilcolina.
- 5) Com a aplicação sobre a córtex de fortes doses de nicotina não se conseguiu efeito paralisante que permitisse verificar se os efeitos da acetilcolina sobre a córtex eram do tipo "nicotínico".
- 6) As injeções de eserina e prostigmina não têm sensível efeito facilitante na irradiação dos ataques produzidos pela acetilcolina.
- 7) A morfina possui forte efeito facilitante sobre a irradiação dos ataques convulsivos.

SUMMARY

The author has studied the influence of acetylcholine solutions directly applied on the motor cortex of dogs, cats monkeys and rabbits.

For this purpose small squares of filter paper were soaked in the acetylcholine solution and soon afterwards laid on the motor cortex. Solutions varying from 0,2 to 10 per cent have been experimented.

It has been shown that local application of the solutions on the motor points, previously localised by induction coil, produced motor reactions.

It has been found, in the dogs that 10 per cent acetylcholine solutions cause localised muscular twitchings (clonus) in almost all the animals experimented. Generalised epileptiform convulsions were obtained in 44,4% of the dogs. Convulsions were also obtained by employing 1 per cent solution of acetylcholine. Definite response has been obtained with 0,2 per cent solution. Failure of motor action, pointed out by other authors, has been related to the use of anesthetics. Convulsions were easily produced by rapid light mechanical stimulations of the skin covering the muscles in connection with the excited motor point, and the application on the motor point of acetylcholine.

The results on monkeys can be summarised as follows. Two species of monkeys were experimented: *Cebus capucinus* and *Macaca mulata*. In the monkeys *C. capucinus* generalised convulsive reactions were induced with acetylcholine solutions in a concentration as low as 0,5 per cent. Motor reaction or convulsive seizures were obtained in seven of the eight monkeys used. Three monkeys *M. mulata* were stimulated with 10 per cent acetyl-

choline solution but only localised muscular contraction has been observed. Similar results have been obtained on the motor cortex of cats and rabbits. One of the three cats employed has shown epileptiform convulsions and the remaining only localised muscular contractions. In the rabbits muscular twitchings have been also induced.

The sensitizing power of eserine on the action of acetylcholine has been also searched. The results indicate that a previous application of eserine solution on the motor center, potentiates the action of acetylcholine. The intensity of the muscular twitchings is greater than the obtained before the application of the eserine solution. Generalised epileptiform convulsions sometimes appeared following the use of lower concentrations of acetylcholine than those previously employed.

Experiments have been carried out by injecting eserine and prostigmine by parenteral route.

A dose sufficient for induce small muscular tremors did not enhance obviously the motor effects produced by the application of the acetylcholine solutions on the motor cortex. From seven dogs experimented, all previously tested for convulsive seizures by application of 1 and 10 per cent acetylcholine solution with negative results, only one has shown epileptiform convulsions after the injection of prostigmine.

Morphine has also been tested as facilitating substance for convulsions induced by acetylcholine.

Six from the nine dogs submitted to the experiments, developed epileptiform seizures after injection of morphine and stimulation of the motor cortex with acetylcholine. (Table IV).

In another series of experiments atropine and nicotine have been studied as for to their action on the motor effects of acetylcholine. Nicotine has a strong convulsant action, even when employed in very high concentration. Since a depressant effect has not appeared even by the applications of high concentrations of nicotine in the motor cortex of dogs, unlike the classical observations for the autonomic nervous system, it was not possible to verify the action of acetylcholine on a motor center paralysed by nicotine. It is important to note that the motor phenomena observed after the first application of acetylcholine, can disappear by the renewal of the pieces of filter paper soaked in the acetylcholine solution.

Atropine, either applied on the motor point in low concentration, or injected in sufficient amount for inhibiting the "muscarinic effects" of acetylcholine on the autonomic nervous system, did not prevent the motor reactions of acetylcholine on the cerebral cortex.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALBERTONI, P.,
1887. Em François-Franck "Leçons sur les fonctions motrices du cerveau et sur l'épilepsie cérébrale", pg. 95.
- 2) LUCIANI e TAMBURINI.
1886. Em Luciani, L. und Seppilli, G., "Die Functions-Localisation auf der Grosshirnrinde", pg. 339.
- 3) LUCIANI, L.
1923. Fisiologia dell'uomo, pg. 715, 6.^a Ed.
- 4) BINSWANGER
1897. Em Ch. Richet "Dictionnaire de Physiologie", vol. II.
- 5) OZORIO DE ALMEIDA, M. et MOUSSATCHÉ, H.
1936. L'excitation électrique directe de la moelle épinière, chez la grenouille, ne produit pas des attaques épileptiformes.
C. Rend. Soc. Biol. 121, 774.
- 6) LAPINSKY, M.
1921. Zur Frage der Rolle des Rückenmark bei epileptische Krämpfe.
Neurol. Zentr. 39, 324.
- 7) FRANÇOIS-FRANCK et PITRES, A.
1883. Recherches expérimentales et critiques sur les convulsions épileptiformes d'origine corticale.
Arch. Physiol. 2 (troisième série), 1.
- 8) LUCIANI, L. e TAMBURINI
1887. Em François-Franck "Leçons sur les fonctions motrices du cerveau et sur l'épilepsie cérébrale", pg. 303.
- 9) OZORIO DE ALMEIDA, M.
1933. Sur une attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle de la grenouille.
C. Rend. Soc. Biol. 115, 78.
- 10) SPERANSKY, A.
1926. La congélation des tissus; procédé d'obtention de l'autoneurotoxine et d'autres autotoxines cellulaires (Note préliminaire).
Ann. Inst. Pasteur, 40, 213.
- 11) CLAUDE BERNARD,
1863. Leçons sur les substances toxiques et médicamenteuses.
- 12) LANDOIS, L.
1887. Ueber typische, recidivierende Krampfanfälle, erzeugt durch Behandlung der Grosshirnrinde mittelst chemisch wirksamer Substanzen und über cerebrale Chorea.
Deut. Med. Woch. pg. 685.

- 13) BAGLIONI, S. et MAGNINI, M.
1909. Action de quelques substances chimiques sur les zones excitables de l'écorce cérébrale du chien.
Arch. Ital. Biol. 52, 349.
- 14) BAGLIONI, S. e AMANTEA, G.
1914. Il metodo della locale stimolazione chimica nello studio dei centri corticali.
Arch. Farmac. Sperim. 17, 302.
- 15) SERGI, S.
1902. L'azione del curaro sulle zone eccitabili del cervello della cavia. (Citado em Baglioni e Magnini (13), pg 351).
Arch. Farmac. Sperim. 1.
- 16) BAGLIONI, S.
1904. Physiologische Eigenschaften der sensiblen und motorischen Rückenmarkelemente.
Zeit. Allgem. Physiolog. 4, 113.
- 17) BAGLIONI, S. e AMANTEA, G.
1912. Il problema della localizzazione e della natura funzionale dei centri corticali studiati col metodo della stimolazione chimica.
Melanges Biologiques-Livre dédié a Ch. Richet., pg. 21.
- 18) DUSSE DE BARENNE, J. G.
1916. Experimental researchs on sensory localizations in the cerebral cortex.
Quart. Jour. Experim. Physiol. 9, 355.
- 19) DUSSE DE BARENNE, J. G.
1911. Sulla azione elettiva della stricnina.
Arch. Farmac. Sperim. 10, 204.
- 20) AMANTEA, G.
1915. Sull rapporto fra centri corticali del giro sigmoideo e sensibilità cutanea nel cane.
Arch. Ital. Biol. 62, 143.
- 21) AMANTEA, G.
1920. Epilessia sperimentale da eccitamenti afferenti.
Il Policlinico, 27, 1.
- 22) DUSSE DE BARENNE, J. G.
1924. Experimental researchs on cerebral localization in the cerebral cortex of the monkey (Macacus).
Proc. Royal Soc., B. 96, 272.
- 23) OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. et VIANNA DIAS, M.
1937. Action de quelques anesthésiques sur l'attaque épileptiforme par refroidissement brusque de la moelle chez la grenouille sud-américaine.
C. Rend. Soc. Biol. 117, 720.

- 24) MCOUSSATCHÉ, H. and VIANNA DIAS, M.
1939. On the Amantea's epilepsy on the monkey.
Liv. Homenagem Profs. A. e M. Ozorio de Almeida, pg. 457.
- 25) RIZZOLO, A.
E'tudes experimentales sur l'excitabilité de l'écorce cérébrale du Chien. Dissertation.
(D.Sc.). Paris.
- 26) LCEWY, O.
1937. Strychninerregung und Acetylcholingehalt des Zentralnervensystem.
Naturwissensch. 25, 526.
(Resumo do Brit. Chem. Physiol. Abst. Oct. 1937, pg. 391).
- 27) CORTELL, R., FELDMAN, J. and GELLHORN, E.
1941. Studies on cholinesterase activity and acetylcholin content of the central nervous system.
Amer. Jour. Physiol.
- 28) FEGLER, J., KOWARZYK, H. und LELUSZ-LACHOWICZ, Z. I.
1938. Über den Einfluss von Tetanus-Toxin un Strychnin auf den Acetylcholingehalt des Zentral Nervensystem. — II) — Über den Einfluss von Strychninerregung auf den Acetylcholingehalt im Nervensystem und über dessen aufhebung durch Dial-Narkose.
Klin. Wochensc. 17, 240, 667.
- 29) GALLERANI e LUSSANA
1891. Sensibilité de l'écorce cerebrale á l'excitation chimique. Contribution á l'etude de la pathologie de l'épilepsie et de la chorée.
Arch. Ital. Biol. 15, 396.
- 30) AMANTEA, G.
1920. Sull'azione di varii alcaloidi applicati direttamente sui centro corticali del giro sigmoideo del cane.
Arch. Farmac. Sperim. 30, 3.
- 31) FELDBERG, W. und MINZ, B.
1931. Wirkung von Azetylcholin auf die Nebennieren.
Arch. Exp. Pharmak. 163, 66.
- 32) FREYTAG, A. und SCHILF, E.
1932. Über die Resorption von Kreislaufgiften (Adrenalin, Azetylcholin, Histamin) aus dem Zentralnervensystem.
Zeit. f. Neurol. 139, 35.
- 33) ROSENBAUM, H.
1939. Experiments concerning the problem of chemical mediation in the central nervous system.
Arch. Internat. Pharmacod. 63, 417.
- 34) SCHILF, E. und STERNBERG, W. F.
1932. Über die Wirkung von Azetylcholin auf Ganglienzellen.
Arch. Exper. Pharmak. 166, 371.

- 35) BONNET, V. et BREMER, F.
1937. Action du potassium, du calcium et de l'acetylcholine sur les activités électriques spontanées et provoquées de l'écorce cérébrale.
G. R. Soc. Biol. 126, 1271.
- 36) MILLER, F. R., STAVRAKI, G. W. and WOCNTON, G. A.
1938. Effects of eserine, acetylcholine and atropine on the electroencephalogram.
Amer. Jour. Physiol. 123, 147.
- 37) MOUSSATCHÉ, H. et VIANNA DIAS, M.
1941. Sur l'action convulsivante de l'acetylcholine.
Rev. Brasil. Biol. 1, 457.
- 38) LONGO, V.
1940. Azione dell' acetilcolina applicata direttamente sulla corteccia cerebrale del cane.
Arch. Fisiol. 40, 348.
- 39) MILLER, F. R., STAVRAKI, G. W. and WOONTON, G. A.
1940. Effects of eserine, acetylcholine and atropine on the electrocardiogram.
Jour. of Neurophysiol. 3, 131.
- 40) BRENNER, CH. and MERRITT, H. H.
1942. Effect of certain choline derivatives on the electrical activity of the cortex.
Arch. Neurol. and Psychiat. 48, 382.
- 41) RIZZOLO, A.
1930. Clonus and generalized epileptiform convulsions caused by local applications of strophantin, thein and nicotin on the cephalic end of the central nervous system.
Arch. Farmacol. Sper. Scien. Affini. 50, 16.
- 42) ERICKSON, TH.
1940. Spread of the epileptic discharge: An experimental study of the after-discharge induced by electrical stimulation of the cerebral cortex.
Arch. Neurol. and Psychiat. 43, 429.
- 42a) BRONK, D. W.
1939. Synaptic mechanism in sympathetic ganglia.
Jour. of Neurophysiol. 2, 380.
- 43) BERNHEIM, F. and BERNHEIM, M.
1936. Action of drugs on choline esterase of the brain.
Jour. of Pharmac. 57, 427.
- 44) QUASTEL, J. H. and TENNENBAUM, M.
1937. The action of morphin and its derivatives on the contractions of leech muscle due to acetylcholine, choline and nicotine.
Jour. of Pharmac. 60, 228.

- 45) SLAUGHTER, D. and LACKEY, R. W.
1940. Effect of morphine sulfate on the serum choline esterase.
Proc. Soc. Exp. Biol. — 45, 8.
- 46) KUHN, H. H. and SURLLES, D.
1938. The action of various members of the morphine series and emetine on the choline esterase of the brain.
Arch. Internat. Pharmac. 58, 88.
- 47) EADIE, G. S.
1945. The inhibition of cholinesterase by morphine *in vitro*.
Jour. Biolog. Chem. 138, 597.
- 48) AMON, R.
1933. Die Fermentative Spaltung des Acetylcholins.
Pflug. Arch. 233, 486.
-