

SISTEMA PARA ANÁLISE ESPECTRAL DO TREMOR EXPERIMENTAL INDUZIDO POR DROGAS EM RATOS

Fernando R. Pereira¹ e Ricardo Santos²

RESUMO -- A administração de certas drogas (oxotremorina, haloperidol, harmalina) em pequenos animais de laboratório induz tremores musculares de intensidade e frequência variáveis. A estimativa quantitativa da intensidade dos tremores e sua análise espectral são importantes para que se possa estudar mais detalhadamente o efeito das drogas. Para isso foi desenvolvido um sistema automatizado de aquisição de sinais, formado por uma plataforma sensora, um circuito de condicionamento de sinal, uma interface digitalizadora e um microcomputador PC-486. Os sinais gerados pela plataforma sensora são processados por meio de transformada rápida de Fourier. Antes da aplicação das drogas em ratos, os movimentos naturais dos animais são caracterizados por sinais de baixa frequência (0 a 2 Hz) e alta intensidade. A administração de oxotremorina induz tremores localizados em bandas de frequência mais elevadas, ao redor de 15 Hz. A administração de carbacol produz tremores centrados em 8 Hz, que ocorrem em salvas durante uma hora. O sistema desenvolvido permite inferir com precisão esses efeitos.

Palavras-chave: Tremores, Atividade Muscular, Oxotremorina.

INTRODUÇÃO

Os eletromiógrafos convencionais usados para o registro de tremores são pouco práticos para o estudo em pequenos animais (Nashold, 1966). A necessidade de se caracterizar os tremores induzidos por drogas resultou no desenvolvimento de várias técnicas qualitativas e quantitativas para o estudo em questão. Dill *et alii* (1968) descreveram a construção de um equipamento simples, baseado na indução que um pequeno magneto (atado a um membro dianteiro do animal) causa em uma bobina captadora que circunda o recipiente que confina a cobaia. Tal sistema só permitia a análise da frequência do tremor, e não quantificava a intensidade.

Mais tarde, Johnson *et alii* (1986) desenvolveram uma plataforma sensora baseada em células de carga, capaz de expressar a intensidade do tremor em função da tensão elétrica gerada pelos sensores. No entanto, não foi feita uma calibração do sistema em unidades de força ou de amplitude do tremor.

¹ Engenheiro, Campus Regional da Uerj - IPRJ, Caixa Postal 97282, CEP 28614-970, Nova Friburgo, RJ - E-mail: reiszal@iprj.uerj.br

² Professor Adjunto, Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, UERJ, Rio de Janeiro, RJ.

Mais recentemente, Foulter *et alii* (1990) implementaram um aparato baseado em transdutores de força isométricos, que captam o tremor de um único membro dianteiro da cobaia. A dificuldade prática encontrada pelos autores foi o correto posicionamento do membro do animal sobre uma pequena plataforma sensora. Neste caso, foi utilizado um transdutor calibrado para expressar a força do tremor em Newtons.

Esse trabalho descreve um sistema automatizado de grande sensibilidade para a caracterização do tremor muscular em frequência e intensidade. Todo controle de ajuste da sensibilidade, processamento digital, exibição dos resultados e armazenamento dos mesmos é feito pelo computador.

MÉTODOS

A plataforma na qual é colocada o rato sob análise consiste em uma caixa de plástico transparente com dimensões de 15 x 15 x 35 cm e espessura das paredes 2 mm. O tipo de plástico com o qual é feita a caixa é o poliestireno industrial, com densidade = 1.05g/cm³ e coeficiente de Poisson = 0.35. A caixa é apoiada em 4 pedestais, como mostrado na figura 1. Cada pedestal de apoio é formado por uma estrutura de fixação de alumínio que repousa sobre um transdutor de força isométrico do tipo piezoelétrico modelo KBI-2064, fabricado pela *Projects Unlimited*, com as seguintes características:

diâmetro = 20 mm,
espessura = 0.43 mm,
frequência de corte = 6 kHz,
capacitância = 12 nF,
sensibilidade (@ 100 Hz) = 0.5 Volts/Newton (60nC/kgf).

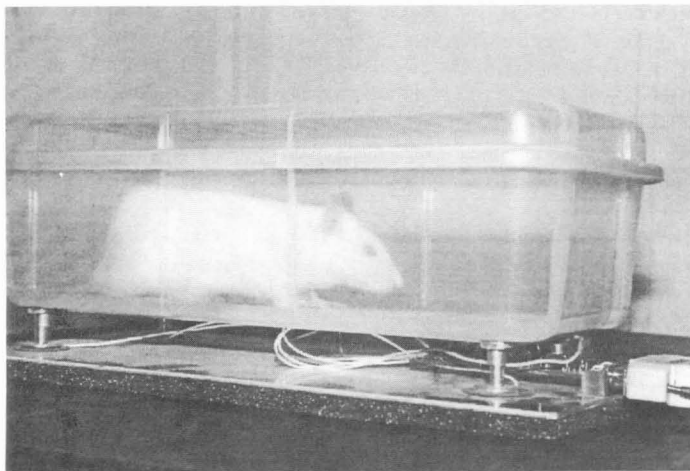


Figura 1 - Plataforma sensora e rato

Ao se movimentar ou tremer, o corpo do rato causa uma força de reação da plataforma ao movimento. A força é captada pelos 4 pedestais-transdutores, que geram um sinal elétrico proporcional à componente normal da força.

Os sinais dos quatro transdutores são somados e amplificados por um sistema de ganho programável e filtrados por um filtro passa-baixas de Bessel de 4^o ordem, com frequência de corte de 30 Hz, como mostrado na figura 2.

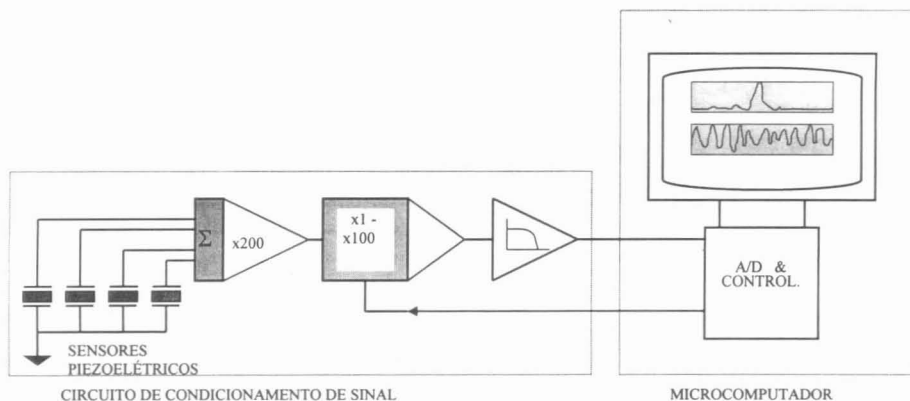


Figura 2 - Diagrama em blocos do sistema de aquisição

O sinal de tremor, já condicionado, é digitalizado por um conversor A/D de 12 bits, a uma taxa de amostragem de 100 Hz. A transformada de Fourier é calculada com um bloco de dados de 256 amostras. Com isso foi possível analisar tremores na faixa de 0 a 30 Hz com uma resolução espectral de aproximadamente 0.4 Hz. O conversor A/D utilizado foi o circuito integrado AD1674 da *Analog Devices*. A placa de interface e controle do conversor A/D foi desenvolvida pelos autores.

Para a aquisição e análise dos dados, foram desenvolvidos dois programas. O primeiro deles, responsável pela aquisição propriamente dita controla a amostragem do sinal de tremor e realimenta digitalmente o amplificador programável de maneira a otimizar a faixa dinâmica do conversor A/D. Esse controle automático reduz a possibilidade de erros caso o controle de sensibilidade seja feito pelo operador. O programa de aquisição atualiza o ganho desse amplificador a cada bloco de dados de 256 amostras.

A cada bloco de dados de 256 amostragens, calcula-se o espectro de potências utilizando o algoritmo da transformada de Fourier e mostra-se na tela do computador os sinais de tremor no domínio do tempo e da frequência, com as escalas dos gráficos ajustadas automaticamente, como é mostrado na figura 3. O uso de 256 amostras para o cálculo da transformada de Fourier permite que os gráficos visualizados (vide figura 4) sejam atualizados a cada 2.56 segundos. Nesse intervalo de

tempo os sinais podem ser considerados estacionários, visto que, segundo Nashold (1966) e Dill *et alii* (1968), sinais de tremor ocorrem em salvas que duram no mínimo 15 segundos.

Cada bloco adquirido é salvo em disco para posterior análise. Como um ensaio típico pode demorar até 50 minutos, tem-se ao final do ensaio cerca de 1000 arquivos gerados.

O segundo programa é destinado à análise mais detalhada dos dados. Nesse programa, o operador pode repassar todos os arquivos de dados adquiridos, fazer um acesso sequencial ou randômico dos arquivos, agrupar arquivos para fazer uma média de vários espectros e imprimir os gráficos. O processo de médias espectrais é importante para melhorar a estimativa espectral do

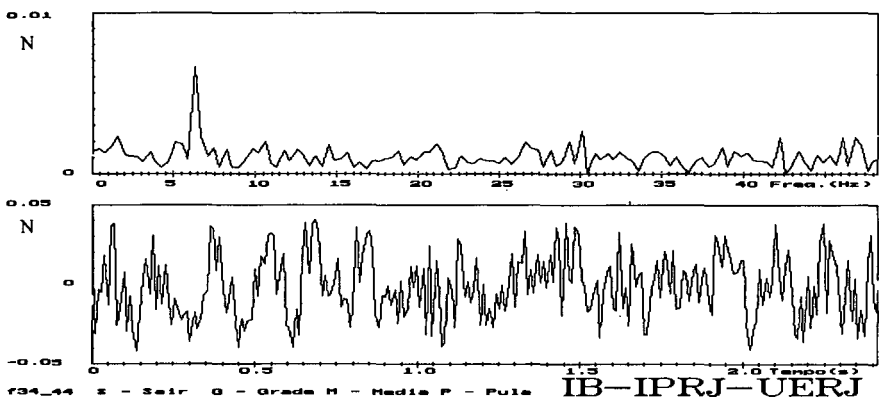


Figura 3 - Exibição dos resultados no domínio do tempo e da frequência.

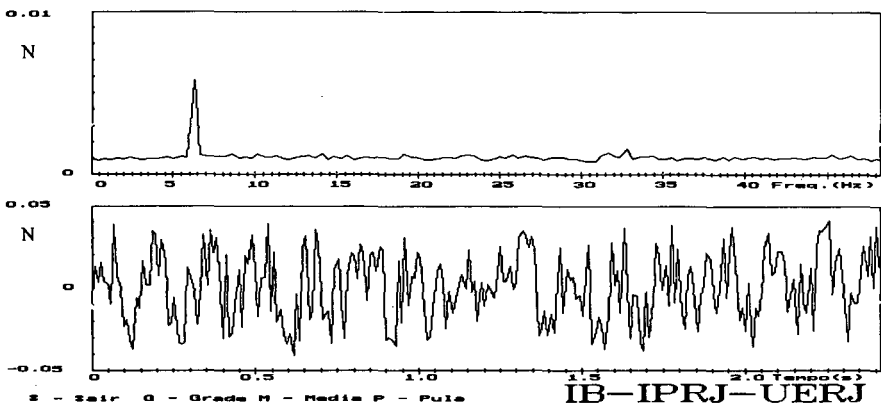


Figura 4 - Média espectral de 30 estimativas

sinal, já que o mesmo é bastante ruidoso. A figura 4 mostra uma tela na qual é apresentado o resultado de uma média espectral de 30 estimativas consecutivas. O número de espectros utilizado para a média dependerá do julgamento do operador, que terá como observar a estacionaridade do sinal.

Calibração

Nos trabalhos mencionados a análise dos resultados estava mais voltada para o estudo do espectro de frequências dos tremores, sem que nada fosse mencionado sobre a calibração do sistema para medidas de intensidade do tremor. Esse procedimento era justificado pela dificuldade de calibração causada pelos sinais randômicos com baixa relação sinal/ruído. No presente trabalho, a disposição de quatro transdutores de força nas extremidades da plataforma sensora permite uma melhoria da relação sinal/ruído em relação aos sistemas que usam um só captador. Verificou-se que a intensidade do sinal representativo da força fica menos sujeita a variações causadas pelo posicionamento do corpo que fica em vibração na plataforma sensora.

Visto que o sinal elétrico gerado pela soma dos sinais dos quatro transdutores é proporcional à componente normal da força de reação que a plataforma aplicaria a uma massa em vibração, implementou-se o procedimento mostrado na figura 5 para a calibração dos transdutores piezoelétricos. O sistema mostrado nessa figura é formado por uma massa conhecida acoplada a um acelerômetro de precisão (peso total = 16 g). Garantindo-se a precisão da medida de aceleração e sabendo-se o valor da massa, é possível calcular a força de reação normal da plataforma sensora e calibrar corretamente (em Newtons) o sinal gerado pelos transdutores piezoelétricos.

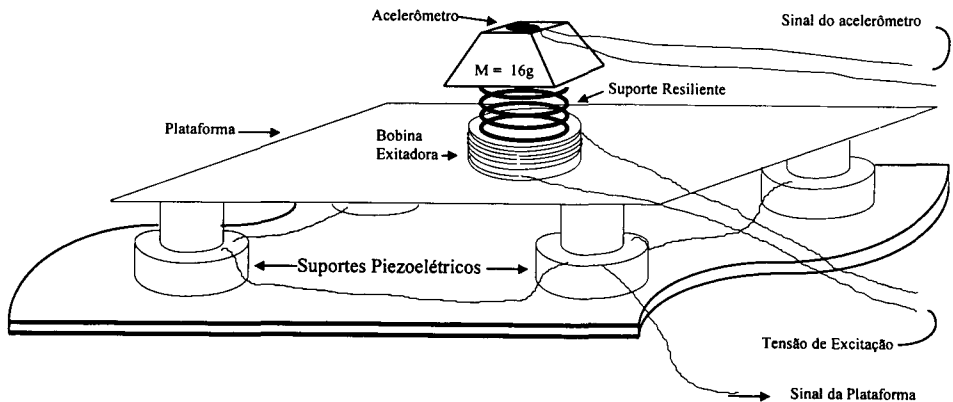


Figura 5 - Calibração da plataforma sensora.

Para aferir o acelerômetro usado na calibração (ADXL50, da Analog Devices), reproduziu-se o sistema eletro-mecânico descrito por Ladin *et alii* (1989). Nesse trabalho, os autores apresentam

um engenhoso aparato mecânico para produzir acelerações conhecidas dentro da faixa de freqüências desse estudo (0 a 30 Hz).

Esses cuidados na aferição e calibração permitiram expressar a intensidade do tremor com uma precisão bastante boa em comparação com a de outros trabalhos semelhantes. A resposta em freqüência do sistema foi levantada variando-se a freqüência de vibração da massa padrão da figura 5 e tomando-se o cuidado de manter constante o sinal do acelerômetro calibrado. Normalizando-se a saída dos transdutores de força em relação ao sinal do acelerômetro calibrado, foi possível verificar que, para faixa de interesse de 3 a 30 Hz, a resposta do sistema é razoavelmente plana, como mostrado no gráfico da figura 6. O sistema apresentou uma ressonância em 56 Hz, freqüência na qual o sinal captado apresentou uma intensidade de 8 dB a mais do que o sinal na faixa plana. Além dessa freqüência de ressonância o amortecimento natural do sistema faz com que o sinal dos transdutores caia. Esses valores foram coletados com um osciloscópio digital (taxa de aquisição = 250 kHz) interfaceado a um microcomputador por uma placa GP-IB, sem o uso do filtro passa-baixas descrito. Variou-se a freqüência 2 a 150 Hz, em intervalos de 2 Hz, tendo-se o cuidado de manter a saída do acelerômetro constante, o que pode ser obtido ajustando-se a potência entregue ao sistema. Isso garante uma força constante sobre a plataforma e permite a obtenção do gráfico da resposta em freqüência normalizada, mostrado na figura 6.

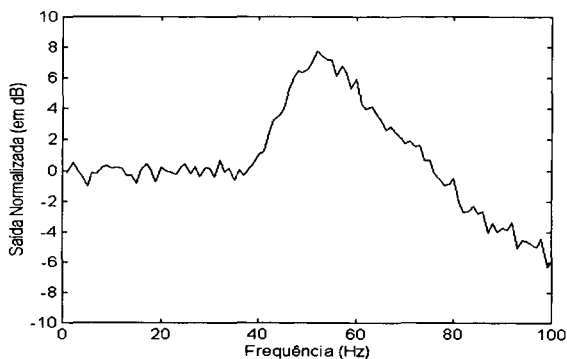


Figura 6 - Saída dos transdutores de força, normalizada em relação ao sinal do acelerômetro calibrado, em função da freqüência.

Para a quantificação da freqüência, pode-se dizer que ela é intrinsecamente precisa (mais do que o necessário para a análise de tremores), pois depende do período de aquisição do sinal, determinado por um cristal oscilador de alta estabilidade.

RESULTADOS

Foram feitos 16 ensaios com ratos com peso médio de 250 g, mantidos sob condições controladas até o ensaio. O resultado típico após a administração de uma solução salina que atua

como placebo é mostrado na figura 7. Pode-se observar a grande não-estacionariedade do sinal, com concentração de energia em frequências abaixo de 2 Hz. Esse é o padrão típico de movimentos aleatórios do animal ao explorar o ambiente novo no qual foi colocado.

Para o carbacol a dose aplicada foi de 1,0 mg/Kg. Os efeitos surgem após alguns minutos (1 a 3 min.) após a aplicação. A figura 8 mostra o resultado da análise de um tremor intenso localizado em 8 Hz. Após 30 minutos, observou-se um decaimento da intensidade do tremor. A aplicação de oxotremorina apresentou resultados semelhantes, só que localizados em 15 Hz. Os resultados para ambas as drogas são repetitivos. Entre os 16 ensaios feitos, espaçados de dois dias aproximadamente, sempre houve o pico centrado nas frequências de 8Hz e 15 Hz, para o carbacol e oxotremorina respectivamente. Observou-se uma variância de 0.9 Hz e 1.3 Hz para os dois casos. Esses resultados concordam com os apresentados por Nashold (1966), Dill *et alii* (1968) e Johnson *et alii* (1986).

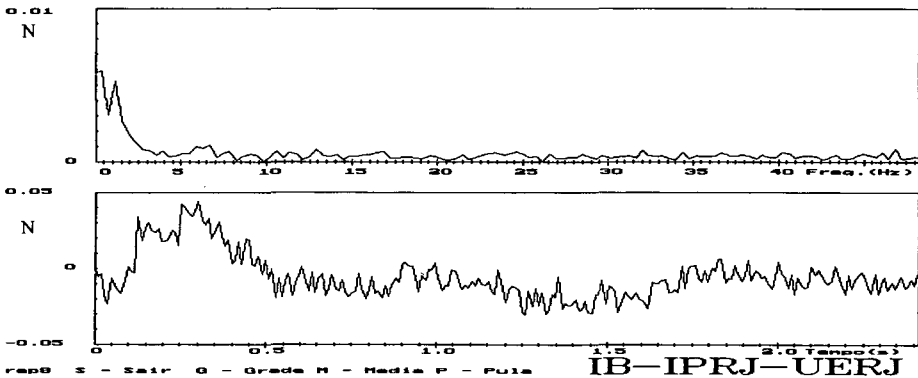


Figura 7 - Sinais típicos de movimentos aleatórios.

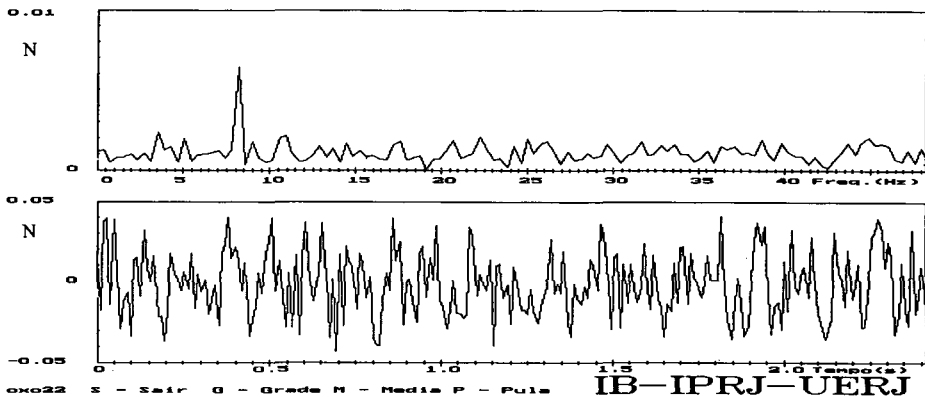


Figura 8 - Resultado da administração de carbacol.

CONCLUSÃO

O sistema desenvolvido é bastante útil para o estudo de modelos experimentais de tremores induzidos por drogas. Aplica-se bem ao modelo experimental Parkinsoniano, quando são usadas drogas como a oxotremorina e o carbacol, indutoras de tremores centrados em 15 Hz e 8 Hz respectivamente. Esses valores concordam com os valores apresentados nas referências mencionadas.

Deste modo esse sistema de registro constitui-se numa ferramenta importante na pesquisa de procedimentos para modificar os tremores experimentais, com possíveis repercussões terapêuticas. Os movimentos naturais dos ratos (ou outro pequeno animal) são facilmente identificados pelo espectro localizado em baixas frequências. A aplicação de drogas altera significativamente esse padrão. A extrema sensibilidade do sistema permite que sejam captados até mesmo tremores de animais bastante pequenos, como camundongos.

Como o objetivo desse trabalho foi somente o de descrever o sistema experimental para a coleta de dados, deixa-se o estudo estatístico aprofundado dos resultados para outras publicações mais voltadas para farmacologia.

REFERÊNCIAS

- DILL, R. E., DORMAN, H. L. and NICKEY, W. N. (1968). "A Simple Method for Recording Tremors in Small Animals". *Journal of Applied Physiology*. v. 24, n. 4, p. 598-599.
- FOULER, S. C., LIAO, R. M. and SKJOLDAGER, P. (1990). "A New Rodent Model for Neuroleptical-Induced Pseudo-Parkinsonism: Low Doses of Haloperidol Increase Forelimb Tremor in the Rat". *Behavioral Neuroscience*. v. 104, n. 3, p. 449-456.
- JOHNSON, J. D., MEISENHEIMER, T. L. and ISOM, G. E. (1986). "A new Method for Quantification of Tremors in Mice". *Journal of Pharmacological Methods*. v. 16, p. 329-337.
- LADIN, Z., FLOWERS, W. C. and MESSNER, W. (1989). "A Quantitative Comparison of a Position Measurement System and Accelerometry". *Journal of Biomechanics*. v. 44, n. 4, p. 295-308.
- NASHOLD, B. S. (1966). "Measurement of Tremor". *Journal of Neurosurg. Suppl.* v. 24, n. 1, part II, p. 320-323.

A SYSTEM FOR SPECTRAL ANALYSIS OF EXPERIMENTAL MICE INDUCED TREMORS

Fernando R. Pereira¹ and Ricardo Santos²

ABSTRACT -- The administration of certain drugs (oxotremorine, haloperidol, harmaline) in small laboratory animals induces muscular tremors with variable intensity and frequency. The quantitative estimate of the tremors intensity and its spectral analysis are very important for the study of drugs effects. For this purpose, it was developed a automatic data acquisition system, composed of a sensing platform, a signal conditioning circuit, a digital interface and a PC-486. The signals sensed by the platform are processed by a fast Fourier transform algorithm. Before the application of drugs, the natural movements of the mice are characterized by low frequency signals (0 to 2 Hz) and high intensity. The administration of oxotremorine induces tremors in higher frequency bands, about 8 Hz. The administration of carbachol induces tremors localized in the 15 Hz band, occurring in bursts during one hour. The system developed allows the precise measurement of these effects.

Keywords: Tremors, Muscular Activity, Oxotremorine.

¹ Engineer, Campus Regional da Uerj, IPRJ, Caixa Postal 97282, CEP 28614-970, Nova Friburgo, RJ, E-mail: reiszal@iprj.uerj.br

² Associate Professor, Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, UERJ, Rio de Janeiro, RJ.