

ANÁLISE DA LUMINÂNCIA DE IMAGENS DIGITALIZADAS DE PLANÁRIA (*Dugesia tigrina*)

SANDRA CRISTINA DE SOUZA*, LEANDRO PROCÓPIO ALVES e EGBERTO
MUNIN*****

* mestranda em Engenharia Biomédica pelo Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Endereço: Av. Amaury Teixeira Vasques n° 40, Jardim Emília Jacareí, SP - cep: 12321420. E-mail: sandcristina@yahoo.com.br

**graduando em Engenharia Elétrica pela Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), situada na Av. Shishima Hifumi, 2911- cep: 12244-000 - São José dos Campos, São Paulo. E-mail: leandro@univap.br

*** Professor Doutor da Universidade do Vale do Paraíba) situada na Av. Shishima Hifumi, 2911- cep: 12244-000 - São José dos Campos, São Paulo. E-mail: munin@univap.br.

Palavras-chave: Luminância, Planária, Imagem digitalizada

Área do Conhecimento: Engenharias – Engenharia Biomédica

Resumo. O objetivo deste estudo foi avaliar a variação da luminância de várias imagens digitalizadas sob as mesmas condições de iluminação da mesma amostra de planárias (*Dugesia tigrina*) correlacionando os histogramas da frequência de pixels para cada valor de luminância da imagem e a translucidez do corpo do animal em diferentes posições determinadas pelo seu modo próprio de movimento. Foram utilizadas amostras selecionadas de acordo com a sua perfeita morfologia mantidas em recipientes plásticos acondicionados em ambiente climatizado, com temperatura na faixa de 19 a 21° C. As amostras foram alimentadas de uma a duas vezes por semana com fígado bovino. As imagens foram capturadas com uma câmera CCD utilizando software de obtenção de imagem. Para as fotografias as amostras foram posicionadas em placa de petri de fundo plano contendo 5ml de água não clorada. Para manipulação foram utilizados pincéis pelo de marta n° 0. Os dados foram analisados quanto à subida e descida da curva de luminância e tratados pelo software ORIGIN 6.0. Os resultados experimentais permitem correlacionar a disposição corporal da amostra no momento da captura da imagem com padrões de forma bem definidos da curva de luminância. Foi observado que a influência da disposição corporal da amostra nos valores de subida e descida da curva de luminância não superou 30%.

INTRODUÇÃO

As planárias são um grupo de vermes de vida livre, presentes predominantemente em água doce e mar que têm como característica anatômica, o corpo achatado dorsoventralmente e simetria bilateral. Assim, possuem uma região anterior (cabeça) e uma posterior (corpo), além de um dorso e um ventre. O achatamento observado no corpo desses animais caracteriza um aspecto de fita.

Na região anterior estão presentes os ocelos que são estruturas sensíveis à luz, porém não são olhos verdadeiros e, por isso, não formam imagens. Funcionam apenas como um mecanismo fotossensível que informa à planária se o ambiente tem pouca ou muita luz. Na região posterior, na posição mediana ventral, encontra-se um orifício onde se localizam a boca e a faringe. A alimentação desses animais é a base de larvas de insetos e animais mortos, sendo portanto, animais carnívoros e necrófagos.

As planárias escondem-se na superfície inferior de plantas submersas, rochas e gravetos, apresentando preferência por locais de penumbra. A espécie *Dugesia tigrina* (classe Turbellaria, ordem Tricladida, família Dugesidae) vive em córregos e lagoas presa à raízes de macrófitas ou sob pedras.

Dugesia tigrina apresenta reprodução sexuada que ocorre através de fecundação cruzada por serem animais hermafroditas, na qual formam-se vários embriões que são envoltos por uma cápsula e essa cápsula é fixada em ramos de plantas.

Esses animais desafiam a imaginação científica pela surpreendente capacidade regenerativa de fragmentos amputados de seu corpo (SALO *et al.*, 1984; GREMIGNI *et al.*, 1980; HORI, 1997; PASCOLINI *et al.*, 1984; ITO *et al.*, 2001). Diversas gerações de pesquisadores, em áreas interdisciplinares da ciência, têm encontrado razões para enfrentar os desafios. Nas planárias, a regeneração de

fragmentos amputados do corpo ocorre na forma de um crescimento compensatório das partes perdidas através, de acordo com diversos estudos, da proliferação de células embrionárias ou indiferenciadas chamadas neoblastos que são células-tronco totipotentes (KOBAYASHI *et al.*, 1999). Os neoblastos são os componentes proliferativos do corpo da planária, dos quais os outros tipos de células especializadas podem diferenciar-se.

Os tecidos regenerantes procedem de um blastema que é o acúmulo de células no local da amputação. Segundo Bueno *et al.*, 1996, as novas estruturas surgem simultaneamente e mantêm um eixo-padrão de crescimento.

Muitos estudos tentam conhecer esse desenvolvimento como no estudo de Salvetti *et al.*, 1998, que se dedicou a caracterizar os genes envolvidos na regeneração, isolando esses genes para conhecer os mecanismos-chave na ativação da diferenciação celular e proliferação.

Este estudo tem como propósito o desenvolvimento de técnica de observação não invasiva assistida por software de análise RGB de imagens digitalizadas. A técnica desenvolvida possibilitará a avaliação *in vivo* desses animais.

METODOLOGIA

A população será composta de planárias da espécie *Dugesia tigrina* obtidas de seu habitat natural e mantidas em laboratório em recipientes com água não clorada. Para análise dos dados serão utilizados softwares comerciais.

Cinco amostras de planárias foram selecionadas de acordo com a sua perfeita morfologia, utilizando para isso um microscópio estereoscópico com magnificação de 10x e 30x, sendo mantidas em laboratório em recipientes plásticos sob temperatura que variou entre 19 e 21° C e alimentadas de uma a duas vezes por semana com fígado bovino.

Em torno de 10 imagens foram capturadas para cada amostra utilizando software de obtenção de imagem LEICA QWIN®. Para aquisição das imagens, foi utilizado um sistema de iluminação padronizado, constituído de um suporte para câmera de vídeo CCD acoplada a uma lente macro Nikon 100 mm, suporte para posicionamento das amostras e fonte de luz halógena ROI RAM OPTICAL ILLUMINATOR incidindo inferiormente à amostra através de um anel de fibra óptica com 13,7 cm de diâmetro. A iluminação ambiente foi desligada durante a captura das imagens. Com a abertura da lente macro na posição 8, o nível de branco da câmera foi ajustado entre 82% e 84%, o contraste e o brilho em 50%.

Para a captura das imagens, as amostras foram acondicionadas em placa de petri de fundo plano contendo 5ml de água não clorada e para a manipulação foram utilizados pincéis pelo de marta nº 0 e nº 2.

O tratamento das imagens foi feito por software de análise RGB (SORENSEN, *et al.*, 2002; OTAKA, *et al.*, 2002; VALLEJO, *et al.*, 2001; MATTSSON, *et al.*, 2000) PAINT SHOP PRÓ-5 de onde foram obtidos histogramas para a análise da luminância.

Os dados obtidos para os níveis da subida e da descida da curva de luminância foram relacionados graficamente à área para cada imagem.

RESULTADOS

Comparando-se os histogramas obtidos das imagens das amostras obtivemos resultados experimentais que permitem correlacionar a disposição corporal da amostra no momento da captura da imagem com padrões de forma bem definidos da curva de luminância.

Para a correlação foram considerados as regiões de subida e de descida do histograma de luminância que correspondem, respectivamente, aos pixels mais claros e pixels mais escuros na imagem. As regiões de pixels mais escuros possivelmente, correspondam às áreas mais densas nas planárias, provavelmente a linha mediana do animal onde está concentrado o tubo digestivo e faringe, o que dificulta a passagem de luz através do animal.

Na figura 1a, a cauda distendida no sentido latero-lateral aumenta o número de pixels de maior luminância em relação à curva apresentada na figura 1b, correspondente a uma outra imagem digitalizada da mesma amostra.

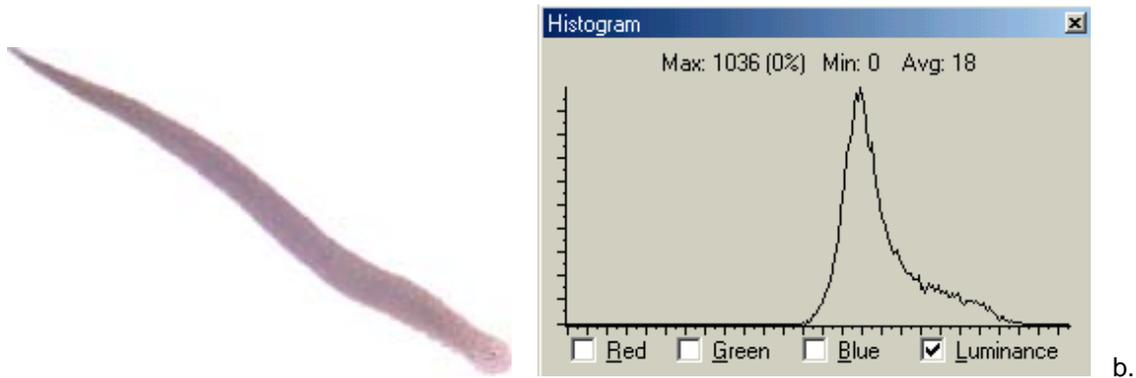
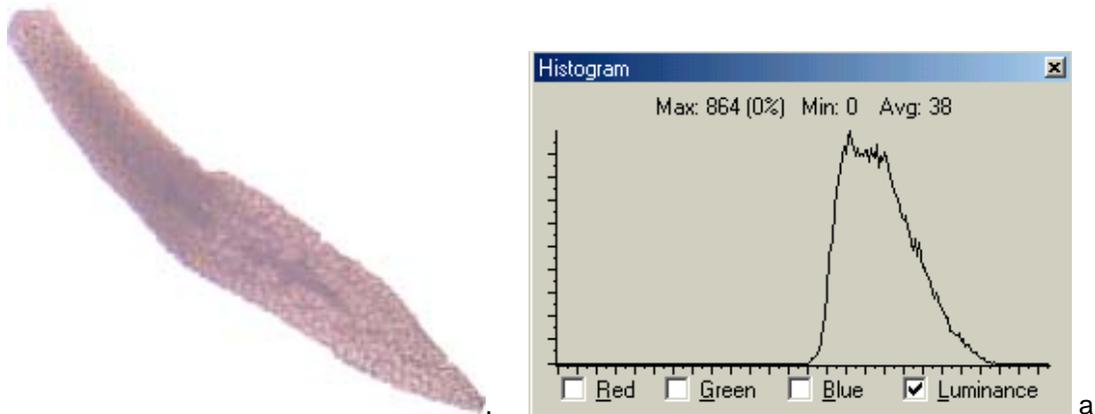


Figura 1. Histogramas referentes a duas disposições corporais diferentes de uma mesma amostra. Em a) a cauda está mais distendida no sentido latero-lateral em relação à b) em que ocorre uma contração latero-lateral da cauda e uma distensão antero-posterior.

Na figura 2a, a cauda e cabeça estão distendidas no sentido latero-lateral o que aumenta o número de pixels de maior luminância em relação à figura 2b que apresenta cauda mais distendida no sentido antero-posterior e cabeça menos distendida no sentido antero-posterior.

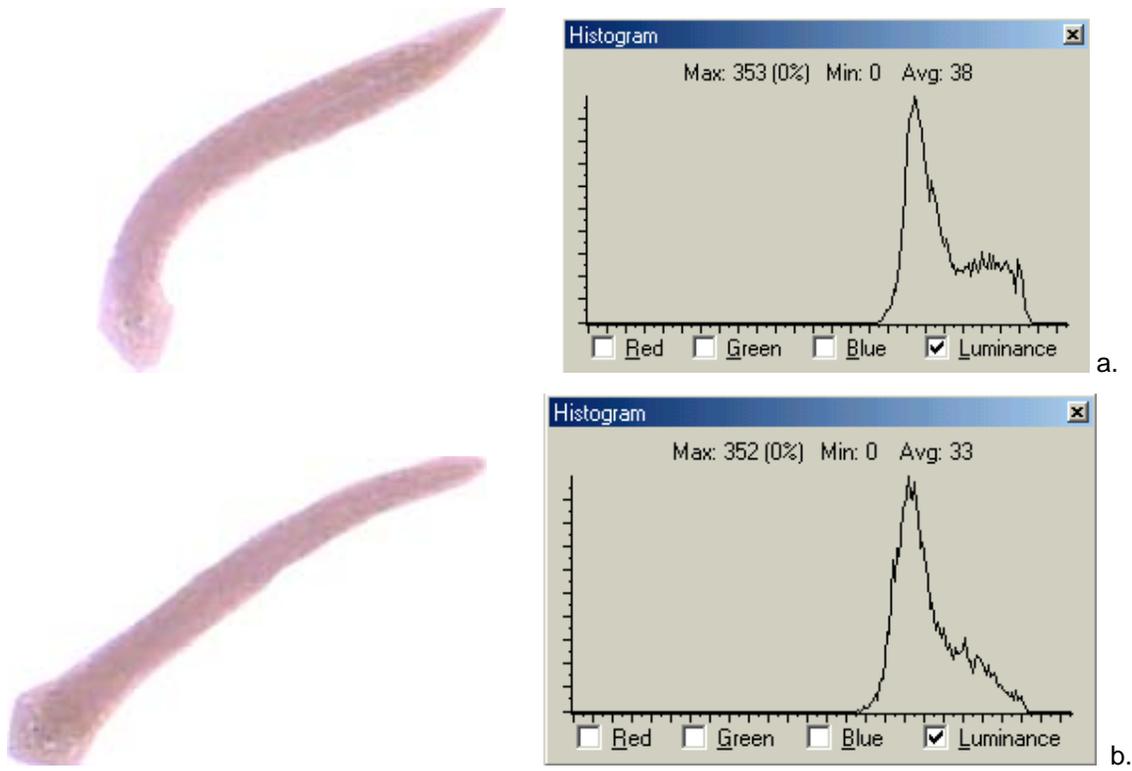


Figura 2. Em a) cauda e cabeça mais acentuadamente distendida no sentido latero-lateral em relação a b) da mesma amostra, que apresenta cabeça menos distendida no sentido antero-posterior.

Na figura 3a, o terço médio do corpo mais distendido no sentido latero-lateral aumenta o número de pixels de maior luminância em relação ao que se observa na figura 3b na qual ocorre um estreitamento no sentido antero-posterior, aproximando o corpo do animal da linha mediana.

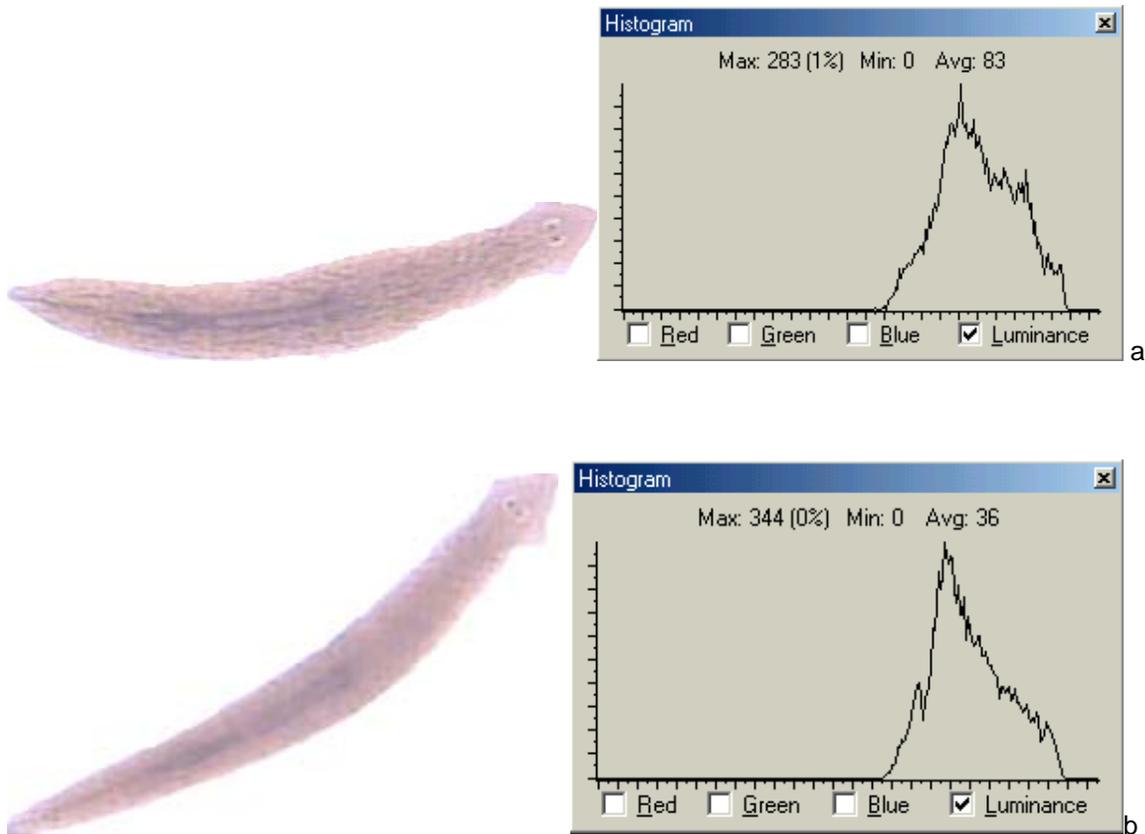


Figura 3. Em a), o terço médio do corpo mais distendido no sentido latero-lateral aumenta o número de pixels de maior luminância em relação à b) em que o terço médio do corpo menos distendido no sentido latero lateral, diminui o número de pixels de maior luminância na mesma amostra.

A disposição corporal da amostra no momento da captura das imagens teve uma

influência que não superou 30% nos valores que correspondem ao início da

subida e ao final da descida da curva de luminância. Para essa análise foram relacionados os valores de subida e descida dos histogramas com as áreas mensuradas das várias imagens de uma mesma

amostra. Na figura 4, observamos essa análise para as áreas das imagens de uma única amostra.

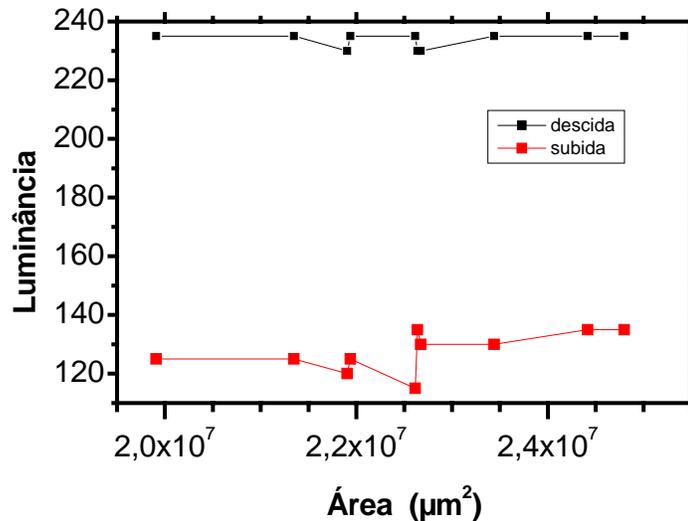


Figura 4. Variação dos valores de subida e de descida da curva de luminância em função das áreas correspondentes às diversas disposições corporais da amostra no momento da captura das imagens digitalizadas.

CONCLUSÃO

O nível da luminância no início da subida da curva e no ponto final da descida da curva na escala x do histograma tem uma variação que não superou 30% na translucidez do corpo do animal em diferentes disposições corporais determinadas pelo seu modo próprio de movimento.

As diferentes disposições corporais de uma mesma amostra, mais contraída ou mais distendida tem influência na forma da curva de luminância.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através do projeto no. 2001/12754-2.

BIBLIOGRAFIA

RUPPERT, E. E; BARNES, R. D.
Zoologia dos invertebrados. São Paulo:
Roca,1996. 6ª ed. 1029 p.

Bueno, D.; Baguña, J.; Romero, R.A.
Central body region defined by a position-
specific molecule in the planarian
Dugesia(Girardia) tigrina: spatial and temporal
variations during regeneration. **Developmental
Biology.**, v.178,p.446-458,1996, article nº 0230.

Salveti, A.; Batistoni, R.; Deri, P.; Rossi,
L.; Sommerville, J. Expression of Djyl, a protein
containing a cold shock domain and RG repeat
motifs, is targeted to sites of regeneration in
planarians. **Developmental Biology.**, v.201,
p.217-229, 1998.

Ito, H.; Saito, Y.; Watanabe, K.; Orii, H.
Epimorphic regeneration of the distal part of the
planarian pharynx. **Dev Genes Evol.**, v.211, n.1,
p.2-9, jan.2001.

Salo, E.; Baguna, J. Regeneration and
pattern formation in planarians. The pattern of
mitosis in anterior and posterior regeneration in
Dugesia (G) tigrina, and a new proposal for
blastema formation. **J. Embryol Exp Morphol.**,
v.83, p.63-80, Oct.1984.

Gremigni, V.; Miceli, C.; Puccinelli, I. On
the role of germ cells in planarian regeneration. I.
A karyological investigation. **J. Embryol Exp
Morphol.**, v.55, p.53-63, Feb.1980.

Hori, I. Cytological approach to
morphogenesis in the planarian blastema. II. The
effect of neuropeptides. **J. Submicrosc Cytol
Pathol.**, v.29, n.1, p.91-7, Jan.1997.

Pascolini, R.; Tei, S.; Vagnetti, D.; Bond,
C. Epidermal cell migration during wound
healing in *Dugesia lugubris*. Observations based
on scanning electron microscopy and treatment
with cytochalasin. **Cell Tissue Res.**, v.236, n.2,
p.345-9, 1984.

Garcia – Polla Vallejo, M.J.; Anitua
Roldan, M.J.; Fernández alvarez, B.E.; Garcia
Martín, J.M.; Lopez-Muniz, A. Study comparative
of ki-67 expression in oral lichen planus and oral
leukoplakia. Quantitative analysis. **Med Oral.**,
v.6, n.5, p.364-70, Nov,2001.

Kobayashi, C.; Watanabe, K.; Agata, K.
The process of pharynx regeneration in
planarians. **Developmental Biology.**, v.211,
p.27-38,1996.

Sorensen, M.S.; Dobrzeniecki, A.B.;
Larsen, P.; Frisch, T.; Sporning, J.; Darvann, T.A.
The visible ear: a digital image library of the
tempo. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.**, v.
64, n.6, p. 378-81, Nov-Dec.2002.

Otaka, I.; Kumagai, K.; Inagaki, Y.;
Shimoyama, M.; Saegusa, K.; Hara, T. Simple
and inexpensive software designed for the
evaluation of color. **Am J Ophthalmol**, v.133,
n.1 p.140-2, Jan. 2002.

Mattsson, U.; Cassuto, J.; Tarnow, P.;
Jonsson, A.; Jontell, M. Intravenous lidocaine
infusion in the treatment of experimental human
skin burns - digital colour image analysis of
erythema development. **Burns.**, v.26, n.8, p.710-
5, Dec. 2000.