

Artigo Original

Recebido em 20/01/2005 e aceito em 08/12/2005

Sistema de imagem para análise de experimentos realizados com o labirinto aquático: WAP – Water-maze Analysis Programme

Water-maze Analysis Programme - WAP

Luís Alberto Lucas

CPGEI/UTFPR

Humberto Remigio Gamba

Laboratório de Imagens e
Instrumentação Eletrônica - LableM
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica e Informática Industrial
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UTFPR - CPGEI/UTFPR
Av. 7 de setembro 3165 - 80.230-901 Curitiba-PR
e-mail: humberto@utfpr.edu.br

Roberto Andreatini

Departamento de Farmacologia
Universidade Federal do Paraná-UFPR

Claudio da Cunha

Departamento de Farmacologia
Universidade Federal do Paraná-UFPR

Tania Mezzadri Centeno

CPGEI/UTFPR

Joaquim Miguel Maia

CPGEI/UTFPR

Pedro Miguel Gewehr

CPGEI/UTFPR

Álvaro Luiz Stelle

CPGEI/UTFPR

Resumo

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um novo sistema, chamado de WAP (Water-maze Analysis Programme), para análise de experimentos realizados com o labirinto aquático de Morris. O método proposto utiliza técnicas de processamento digital de imagens para rastrear o animal no labirinto e calcular os principais parâmetros que determinam o desempenho do animal durante o experimento: latência, distância percorrida e velocidade média de nado. O labirinto aquático foi construído em uma sala de aproximadamente 10 m² com uma caixa de água de 500 litros. Um sistema de imagem, composto por uma câmera CCD, um vídeo cassete, uma placa de aquisição de vídeo e um microcomputador, é utilizado para registrar e processar os experimentos. Os parâmetros de desempenho do animal no labirinto podem ser determinados em tempo real ou posteriormente a partir do registro do experimento em fita cassete. O sistema foi avaliado com um simulador de movimento circular e em um experimento realizado *in vivo*. Os erros de medida ficaram entre 0,2% e 7,6% para o parâmetro distância, 3,8% e 18% para o parâmetro latência e 3,6% e 17,6% para o parâmetro velocidade. Os erros máximos foram determinados para as situações teóricas mais críticas, isto é, movimento circular de pequeno diâmetro e alta velocidade. Os excelentes resultados obtidos indicam que a metodologia proposta é adequada e o sistema de análise promissor.

Palavras-Chaves: Labirinto aquático, Processamento de imagens em movimento, Rastreamento

Abstract

*This work presents a new developed system, called WAP (Water-maze Analysis Programme), to analyse the Morris water-maze experiment. The system uses digital image processing to track the animal in the water-maze tank and calculate the animal performance parameters in the experiment: latency, swimming distance and swimming mean velocity. The water-maze was built in a 10 m² room with a 500 litre water tank. The image system uses a CCD camera, a videocassette, a frame grabber and a microcomputer. The parameter used to assess the animal performance can be determined during the experiment in real time or later, using the registered experiment in the videotape. The WAP was assessed using a simulator of circular movements and in an *in vivo* experiment with a Pentium III computer. The measurement errors were between 0.2% and 7.6% for the distance parameter, 3.8% and 18% for the latency parameter and 3.6% and 17.6% for the velocity parameter. The maximum errors were determined for the most critical situation, that is: circular movement of small diameter and high swimming velocity. The excellent results obtained with the proposed system demonstrate that it is suitable to analyse the water-maze experiments.*

Keywords: Image Processing, Tracking, Water-maze

Extended Abstract

Introduction

The Morris water-maze is a classical experiment used to study the spatial memory of animals since 1984. In this experiment the rat (a native swimmer) learns to escape from water onto a hidden 2 cm-submersed platform in a water tank. The three main parameters used to evaluate the experiment are: the period of time the animal takes to find the platform (latency), swimming mean velocity and the length of the swimming path taken by the animal from the point it is put into the tank and the point it finds the platform. A new system called Water-maze Analysis Programme (WAP) to calculate these parameters is implemented and described in this work. The parameters are determined using digital image processing techniques. The main features of the new system are its versatility and precision. The WAP was licensed by GPL (General Public License).

Materials & Methods

Figure 1 presents a sketch of the water-maze built at the Department of Pharmacology of the Federal University of Paraná. The water-maze was built in a 10 m² room using a water tank of 500 litres. The tank diameter is 1.73 m and its internal surface was black painted, forming a water mirror to avoid the animal to see through the water and find the platform. The platform was built using perspex, with dimensions of 11 × 14 cm, in a support that allows it to be placed anywhere inside the tank and with enough highness to keep it 2 cm below the water surface.

Above the tank, in the ceiling of the laboratory, a CCD camera was installed. The camera is connected to a videocassette. The illumination system was placed around and below the tank border. Thus the scattered light in the ceiling uniformly illuminates the tank.

Each experiment lasts from one to six minutes, depending on the animal ability to find the platform. If in 60 s the animal is unable to accomplish the task, the technician gently guides the animal to the platform, keeping it there for about 20 s and then removing it to its box for 30 s. This procedure is repeated four times during five days. The distances and latencies are expressed in terms of averages.

Figure 2 presents a block diagram of the three main parts of the WAP: "Image Acquisition", "Image segmentation and animal path trace" and "Experiment parameters calculation". The image acquisition is made using the DT3153 frame grabber from Data Translation (<http://www.datx.com>). The captured images are transferred and processed in a microcomputer.

The segmentation algorithm is divided in nine steps: 1) Selection of the region of interest (ROI); 2) Selection of a reference frame; 3) Background subtraction; 4) Thresholding; 5) Labelling and centre of mass calculation; 6) Filtering according to the objects area, and 7) Swimming path's trace of the animal.

Figure 3 illustrates the ROI selection, which is made using a mask. The use of a mask is only possible because the tank and the camera are always in the same position. Equation 1 is used to convert

the distances measured in pixels to centimetre.

Once the ROI selection is made, the next step is to eliminate the image of the tank. This is done using a reference frame, which can be any frame selected in the beginning of the experiment. Figure 4 illustrates the process of background subtraction.

Even though automatic threshold method can be used, the bimodal histogram of the processed image, Figure 4(c), makes it possible to use a fixed grey level. This makes the algorithm simple and fast.

The next step is to eliminate the light reflected in the water mirror. For this each object in the image is labelled using a labelling algorithm, Figure 5(a). The animal image is the biggest labelled object in the image. The last step is to find the centre of mass of the animal.

The WAP was assessed using the image movement simulator illustrated in Figure 7. Circular movements with different diameters (152.2 cm, 328.2 cm and 500 cm) and velocities (less than 10 cm.s⁻¹, between 10 cm.s⁻¹ and 20 cm.s⁻¹ and larger than 20 cm.s⁻¹) were simulated. Each simulation was assessed three times and the measurement uncertainty and errors were determined.

Results

Figure 8 shows the WAP user interface. Figures 9(a) and 9(b) shows the paths of two different health animals in two different experiments. The points 1 and 2 indicate where the animal was placed in the tank and the platform position. Figures 10(a) and 10(b) present the performance parameters calculated from Figures 9 (a) and (b), respectively.

Table 1 shows the results of the WAP assessment. The measurement errors are directly proportional to the velocity and inversely proportional to the path length. Figures 11, 12 and 13 resume the errors in the measurement.

Actual experiments were also performed with the water-maze built at UFPR. In this experiment, ten Wistar rats were submitted to a cannula implantation surgery in the hippocampus of their brains. After four days of training, lidocaine was injected in the hippocampus. Figure 13 shows an example of the swimming paths trace. Figure 14 shows the period taken by the rats to locate the platform.

Conclusion

The new water-maze analysis programme (WAP) presented in this work was assessed with a simulator and with an *in vivo* experiment. Results demonstrated that the measurement errors were between 0.2% and 7.6% for the distance parameter; 3.8% and 18% for the latency parameter; and 3.6% and 17.6% for the velocity parameter. The maximum errors were determined for the most critical situation, that is: circular movement of small diameter and high swimming velocity. Nevertheless, it is important to mention that the tests were performed using a 1 GHz Pentium III processor and the errors will be smaller for faster processors.

Introdução

O experimento do labirinto aquático de Morris (ou water-maze) foi desenvolvido em 1982 por Richard Morris (Morris et al., 1982). Originalmente, o experimento de Morris foi criado como uma forma alternativa para tentar resolver as controvérsias que existiam em relação à região do cérebro responsável pela formação de memória espacial e os indícios de que a memória espacial era diferente de outras formas de aprendizado associativo.

Neste experimento, os ratos, nadadores natos, têm que aprender a localizar e subir em uma plataforma, aqui denominada de plataforma de fuga, submersa em um tanque (Morris, 1984). A busca pela plataforma, como meio de fuga, é a principal motivação desse aprendizado, sendo que a temperatura da água e suas variações são alguns dos fatores que afetam essa motivação. Embora os ratos não possam ver, ouvir ou mesmo sentir o odor da plataforma, eles rapidamente aprendem, após alguns treinos, a nadar em direção à plataforma usando o caminho mais curto. Portanto, os ratos reconhecem as vizinhanças, e utilizam pistas visuais para encontrar um lugar seguro, no caso a plataforma de fuga. O experimento com o labirinto aquático é utilizado, principalmente, por laboratórios de farmacologia para avaliar o efeito de drogas experimentais em animais. Os três principais parâmetros que medem o desempenho dos animais no labirinto são (D'Hooge e De Deyn, 2001):

- latência: tempo necessário para o animal encontrar a plataforma;
- distância percorrida: é a distância percorrida pelo animal durante o experimento;
- velocidade média: relação entre a distância percorrida e a latência.

Em alguns laboratórios os experimentos realizados com o labirinto aquático são registrados em fita cassete para posterior análise do desempenho do animal.

A construção de um labirinto aquático requer o uso de um sistema para a análise do experimento, em geral de alto custo. A análise de um experimento registrado em fita cassete pode ser realizada de forma manual, ou seja: desenha-se em um papel o caminho percorrido pelo animal visto na tela de um televisor, estende-se um barbante sobre o traçado e estabelece-se a distância percorrida a partir do comprimento do barbante e do diâmetro do tanque visto na tela. Esse processo, além de ser extremamente demorado é tedioso, cansativo, subjetivo e, portanto, sujeito a erros.

Atualmente existem alguns equipamentos importados para monitoração e medição dos parâmetros de

desempenho do animal no labirinto aquático, como o *PolyTrack Video Tracking System* (San Diego Instruments, Inc.), o *HVS Video Measuring System* da companhia inglesa HVS Image e o *Water-maze Software*, desenvolvido em 1989 por Richard Morris e Roger Spooner.

Nesse artigo apresenta-se um novo sistema, projetado e desenvolvido para análise de experimentos realizados com o labirinto aquático de Morris, e os resultados obtidos na sua avaliação (Lucas, 2001). Os parâmetros de desempenho do animal são determinados utilizando técnicas de processamento digital de imagens e podem ser determinados em tempo real, durante os experimentos, ou ainda posteriormente, a partir das imagens registradas em fita cassete. Entre outras, as principais características do sistema aqui descrito é a sua versatilidade, rapidez e a precisão na medida dos parâmetros de desempenho do animal. O sistema foi batizado de WAP (*Water-maze Analysis Programme*) e foi licenciado pela GPL (*General Public License*), podendo ser livremente utilizado, copiado e modificado (<http://savannah.nongnu.org/projects/wap>).

Materiais e Métodos

A Figura 1 apresenta um esboço do labirinto aquático construído no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O labirinto aquático foi construído em uma sala aproximadamente quadrada com 10 m² de área. Como tanque de água utilizou-se uma caixa-d'água, no formato de um setor de cone, de 500 litros, com diâmetro da borda superior igual a 1,73 m. A caixa-d'água foi pintada na cor preta, para formar um espelho de água, e assim evitar que o animal possa visualizar a plataforma submersa. Além disso, a cor preta produz um excelente contraste com a cor branca do animal. A plataforma foi construída em acrílico, com dimensões de 11 × 14 cm, fixa em um suporte com altura suficiente para mantê-la a aproximadamente 2 cm abaixo do nível da água. O suporte é móvel e permite que a plataforma seja posicionada em qualquer local dentro da caixa-d'água.

Adaptou-se à caixa-d'água uma resistência elétrica para aquecer a água, possibilitando ajustar a sua temperatura e evitar choques térmicos no animal em contato com a água fria. Após o aquecimento, a temperatura da água permanece praticamente constante em 22°C, pois a temperatura ambiente também é controlada para este valor por um sistema de ar-condicionado.

No teto do laboratório, sobre a superfície do tanque, colocou-se uma câmera CCD. Esta câmera pode ser ligada a um vídeo-cassete ou ao WAP, ambos colocados

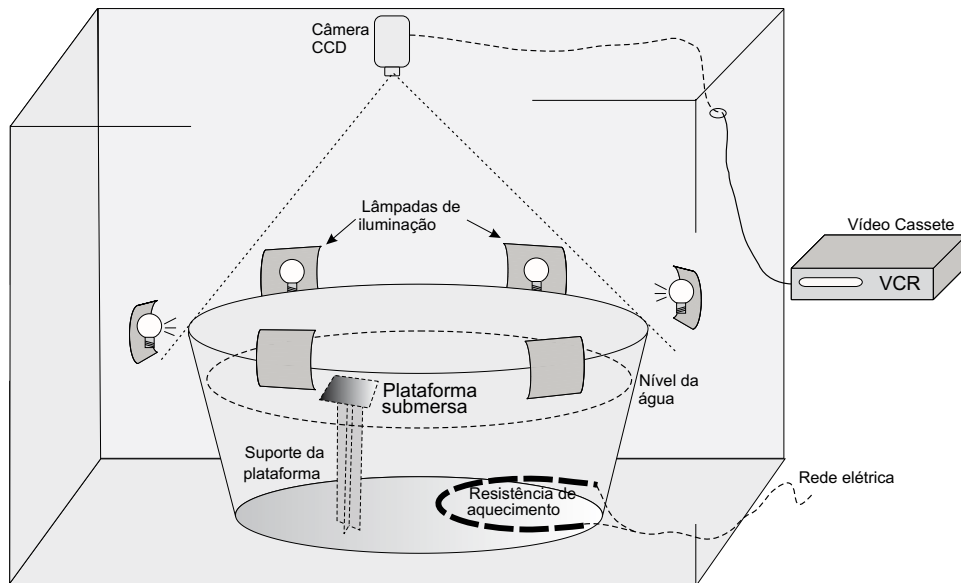


Figura 1. Esboço do labirinto aquático construído no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná. A figura ilustra o sistema de imagem instalado para o registro e/ou análise em tempo real do experimento.
Figure 1. Sketch of the water-maze built at the Department of Pharmacology of the Federal University of Paraná. The figure shows the image system installed to record and/or analyse the experiment in real time.

em uma sala ao lado para evitar ruídos e perturbar o aprendizado do animal.

O sistema de iluminação do labirinto aquático utiliza seis lâmpadas posicionadas nas paredes da sala e ligeiramente abaixo da borda da caixa de água. Assim, o teto do laboratório reflete a luz de forma difusa e uniforme. A iluminação lateral evita excesso de ruídos na imagem do tanque, causados pelo reflexo da luz na superfície da água, a qual é agitada pelo nado do rato.

Nas paredes da sala, no teto e dependurado no teto, estão vários objetos (alguns deles formas geométricas), assimetricamente colocados para que o animal possa triangular estas “dicas” visuais com a posição da plataforma de fuga, construindo assim um mapa espacial que deve armazenar em sua memória.

Cada experimento possui uma duração de um a seis minutos, dependendo da habilidade do animal em encontrar a plataforma. O animal é liberado de um dos pontos cardinais do tanque, tendo 60 segundos para encontrar a plataforma. Caso isto não ocorra, ele é delicadamente guiado até ela. Após encontrar a plataforma, o animal aí permanece por 20 segundos e é retirado do labirinto, permanecendo em uma caixa plástica por 30 segundos. Logo após, ele é colocado em outra posição de partida do labirinto, escolhida ao acaso. Cada animal tem quatro tentativas consecutivas para encontrar a plataforma por dia, durante cinco dias. As distâncias e latências para encontrar a plata-

forma nas quatro tentativas de cada dia são expressas na forma de média.

A Figura 2 apresenta um diagrama do sistema WAP desenvolvido, dividido em três blocos principais (linhas pontilhadas): “Aquisição das Imagens”, “Segmentação e Traçado do Caminho percorrido pelo Animal” e “Cálculo dos Parâmetros do Experimento”.

O programa de processamento de imagens foi desenvolvido em linguagem C++, ambiente Qt (Blanchette e Summerfield, 2004), utilizando o *X-Window System* e o sistema operacional Linux.

Aquisição das Imagens

A primeira etapa do processamento é a Aquisição das Imagens (Figura 2), podendo ser oriunda diretamente do sinal de vídeo da câmera CCD, ou a partir do registro do experimento, proveniente do vídeo-cassete. A etapa de aquisição das imagens compreende o *hardware* necessário para o sistema e o processo de aquisição dos quadros. Essa etapa foi subdividida nos seguintes blocos: vídeo-cassete ou câmera CCD, placa de aquisição de sinal de vídeo (*frame grabber*) e computador. Cada quadro capturado é transferido para a memória do computador e processado. Ressalta-se que essa é uma das etapas mais importantes, pois requer um sistema de captura rápido, a fim de propiciar um processamento em tempo real e reduzir ao mínimo o número de quadros não processados.

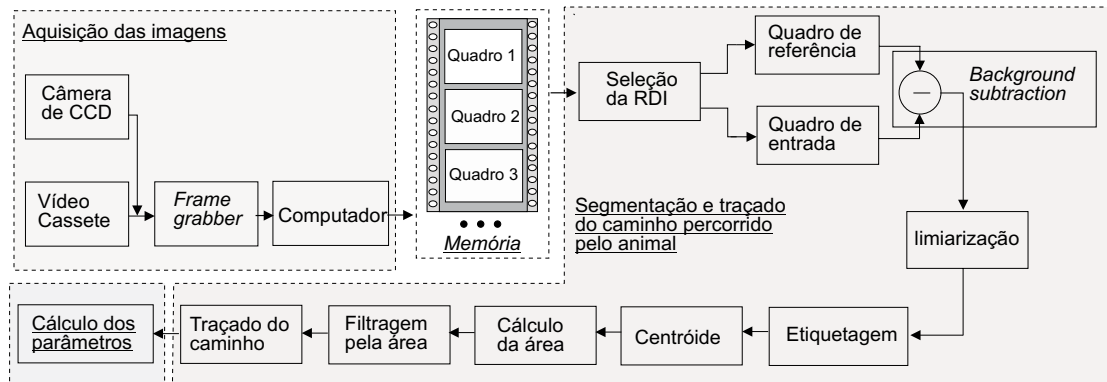


Figura 2. Diagrama em blocos do sistema WAP desenvolvido. **Figure 2.** Block diagram of the developed WAP system.

O processo de aquisição é iniciado ao clicar-se o botão do mouse com o seu cursor posicionado sobre a imagem do animal no tanque. Da mesma forma, o processo de aquisição encerra-se com um segundo clique do mouse na imagem do animal. O WAP registra as coordenadas no instante em que ocorre o evento “clique do mouse”.

O vídeo-cassete utilizado para reproduzir os experimentos previamente registrados em fita cassete (Gradiente, modelo GV-25), possui ajuste manual de *tracking*. Outras marcas de vídeo-cassete podem também ser utilizadas, contudo recomenda-se que o vídeo possua ajuste manual de *tracking*, pois isso possibilita um ajuste fino e uma melhora significativa na imagem reproduzida.

A placa de aquisição de sinal de vídeo (*frame grabber*) é responsável pela captura, digitalização do sinal de vídeo proveniente da câmera CCD (ou do vídeo-cassete) e pela transferência das imagens para a memória do computador. A qualidade da placa de aquisição é fundamental para o bom desempenho do WAP. Nesse projeto utilizou-se a placa de captura DT3153 da Data Translation (<http://www.datx.com>).

No desenvolvimento e nos testes realizados com o WAP utilizou-se um microcomputador com processador Pentium III, 1 GHz com 256 MB de RAM. A taxa efetiva de captura ficou em 1,7 quadros por segundo. Ressalta-se que para utilizar a placa DT3153 em ambiente Linux foi necessário desenvolver o *device driver* para comunicar a placa de captura com o sistema operacional Linux.

Segmentação e Traçado do Caminho Percorrido pelo Animal

A etapa de segmentação (Figura 2) consiste em isolar em cada quadro a imagem do animal nadando no labi-

rinto aquático. O ideal seria que todas as cenas fossem processadas e as coordenadas exatas do animal dentro do tanque fossem determinadas. Dessa forma, seria possível reproduzir um traçado que correspondesse exatamente ao caminho percorrido pelo animal durante um experimento. Isso requer algoritmos de tratamento de imagem simples e, principalmente, rápidos. Se o algoritmo de tratamento for lento, durante o processamento de um quadro perdem-se as cenas seguintes e, por conseguinte, o traçado percorrido não corresponderá exatamente àquele percorrido pelo animal.

O processo de segmentação implementado nesse trabalho está dividido em sete etapas, a saber (Figura 2): 1) Seleção da região de interesse (RDI); 2) Seleção de um quadro de referência; 3) Subtração de Fundo (*background subtraction*); 4) Limiarização; 5) Etiquetagem (*labeling*); 6) Determinação do centro de massa; 7) Cálculo da área; 8) Filtragem do objeto pela área; e; 9) Traçado do caminho percorrido pelo animal. Cada uma das etapas é descrita a seguir.

Seleção da região de interesse (RDI)

Em cada uma das cenas determina-se a RDI, no caso a imagem do tanque de água do labirinto aquático. Como no labirinto aquático a câmera CCD está fixa no teto do laboratório, com foco e zoom fixos, e o tanque de água está sempre na mesma posição do campo de visão da câmera, optou-se por selecionar a RDI multiplicando-se os pixels da imagem original (Figura 3(a)) pelos pixels correspondentes de outra imagem, cujo conteúdo é uma máscara onde os pixels da região do tanque são iguais a um e os demais zero, Figura 3(b) (Marques Filho e Oliveira Neto, 1999). A Figura 3(c) apresenta a imagem com a RDI selecionada. As principais vantagens desse método são a sua simplicidade e, por conseguinte, a rapidez.

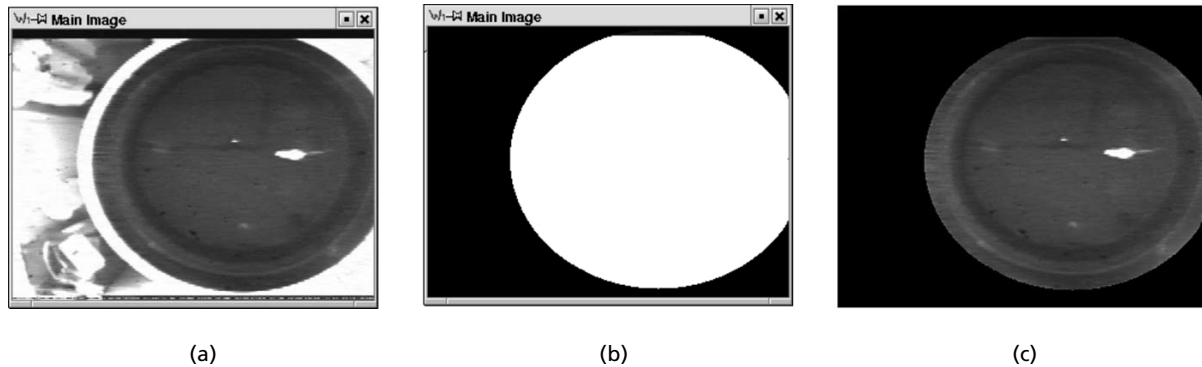


Figura 3. Seleção da região de interesse (RDI). (a) Imagem original. (b) Máscara para seleção do RDI. (c) Imagem resultante da multiplicação dos pixels de (a) pelos respectivos pixels de (b). **Figure 3.** Region of Interest (ROI) selection. (a) Original image. (b) Mask used for the ROI selection. (c) Result of the product of each pixel in (a) by the correspondent pixel in (b).

A partir das dimensões da máscara faz-se a conversão das distâncias medidas em pixels para centímetros. A conversão de unidade é feita utilizando-se a equação 1:

$$dist_{cm} = \frac{dist_{pel}}{raio_h} \cdot raio_t \quad (1)$$

onde $dist_{cm}$ é a distância em centímetros que se quer obter, $dist_{pel}$ é a distância em pixels, $raio_h$ é o raio horizontal da máscara (por características do CCD, a imagem e a máscara são elipses), e $raio_t$ é o raio do tanque, igual a 86,5 cm.

Seleção de um quadro de referência

Após a seleção da RDI faz-se a seleção de um quadro de referência para realizar o processo de subtração de fundo (*background subtraction*). Inicialmente procurou-se selecionar um quadro de referência cujo conteúdo, após a seleção da RDI, fosse apenas a imagem do tanque, sem a presença do animal. Contudo, esse procedimento se mostrou desnecessário. Na prática verificou-se que qualquer cena pode ser utilizada como referência para processar os quadros consecutivos, pois no processo de subtração de fundo é possível eliminar a imagem do animal que aparece no quadro de referência. Ressalta-se que o quadro de referência é selecionado uma única vez durante o experimento, reduzindo-se assim o tempo de processamento de cada imagem.

Algoritmo de subtração de fundo

Na Figura 3(c) é necessário eliminar a imagem de fundo ou os níveis de cinza referentes à imagem do tanque. Isso é feito com um algoritmo de subtração de fundo (Castleman, 1996; Russ, 1992), conforme a equação 2:

$$d = \begin{cases} Q_i - Q_r & \text{se } Q_i \geq Q_r \\ 0 & \text{se } Q_i < Q_r \end{cases} \quad (2)$$

onde d é o resultado da subtração de quadros, pixel a pixel, Q_i é o i -ésimo quadro que se deseja processar e Q_r é o quadro de referência.

A Figura 4 apresenta o resultado do processo de subtração de fundo. Nota-se que toda a imagem de fundo foi eliminada, permanecendo na cena apenas a imagem do animal e alguns ruídos aleatórios que resultam do reflexo da iluminação no movimento da água causado pelo nado do animal.

Limiarização

Durante o desenvolvimento do WAP foram implementados e avaliados dois métodos automáticos de limiarização descritos na literatura: Pun (Pun, 1980; Parker, 1996) e Kapur (Parker, 1996). Os resultados com o primeiro foram inadequados. O método descrito por Kapur funcionou para a maioria das imagens. Durante os testes verificou-se que o histograma da imagem, após a subtração de fundo, Figura 4(c), é sempre do tipo bimodal. Assim, optou-se por implementar um método de limiarização com nível de cinza constante (Sonka *et al.*, 1995). Como as imagens de fundo e do animal apresentam níveis de cinza menores que 50 e maiores que 150 respectivamente, optou-se por um nível de cinza igual a 100.

Etiquetagem, determinação das áreas e dos centros de massa de cada objeto presentes na imagem

Após a limiarização somente a imagem do animal deveria estar presente. Contudo, a natação produz movimentos da água ao redor do animal, e por conseguinte o espelho d'água produz reflexos da iluminação

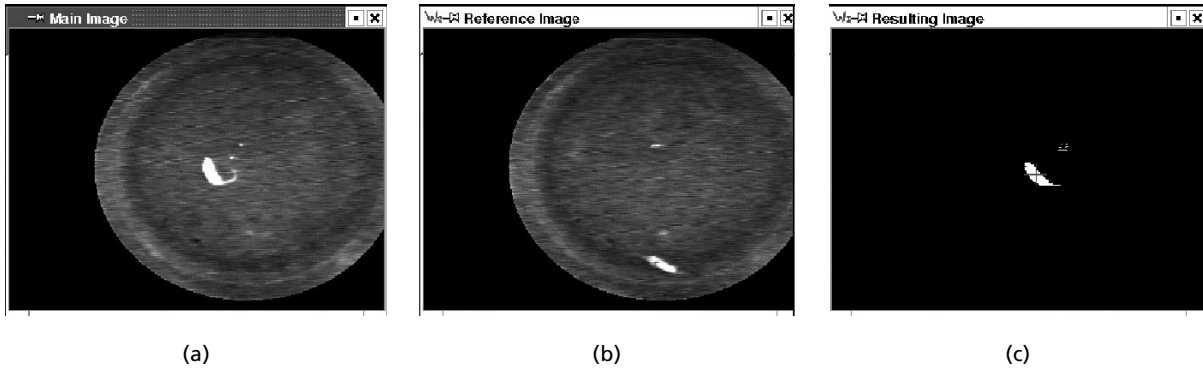


Figura 4. Ilustração do processo de subtração de fundo. (a) Imagem após a seleção da RDI. (b) Imagem de referência após a seleção da RDI. (c) Resultado da subtração de (a) e (b). **Figure 4.** Background subtraction. (a) Selected ROI. (b) Reference image. (c) Result of the background subtraction.

em várias direções, inclusive na direção da câmera. Os reflexos da água podem ser observados na Figura 4(c). Para diferenciação dos diversos objetos que aparecem na imagem e que não estão conectados, implementou-se o algoritmo recursivo de etiquetagem (labeling), descrito por Gonzales e Woods (2002). A Figura 5(a) mostra um exemplo de uma imagem etiquetada (ampliada), onde se notam vários objetos de pequenas áreas, pintados com diferentes tons de cinza, ao redor do animal.

A seguir determinam-se as coordenadas do centro massa de cada objeto etiquetado, pela equação 3:

$$X_c = \frac{1}{A} \sum_{i=1}^N X_i \quad Y_c = \frac{1}{A} \sum_{i=1}^N Y_i \quad (3)$$

onde X_c e Y_c são as coordenadas do centro de massa, A é a área em pixels, N é o número de pixels e X_i e Y_i são as coordenadas do i -ésimo pixel do objeto. No algoritmo implementado as coordenadas do centro de massa são calculadas durante o processo de etiquetagem para reduzir o tempo de segmentação das imagens. A Figura 5(b) ilustra uma imagem processada com a indicação do centro de massa do animal.

Filtragem pela área do objeto

Após a análise das imagens de vários experimentos, observou-se que a imagem do animal é sempre maior que a imagem do ruído produzido pelo reflexo da água em movimento dentro do tanque. Dessa forma, optou-se por utilizar um sistema de filtragem adaptativa que elimina das cenas processadas todos os objetos com poucos pixels, ou seja, mantém-se apenas o objeto de maior dimensão. A Figura 6 ilustra o resultado do processo de filtragem onde se observa somente a imagem limiarizada do animal. O cruzamento das linhas vertical e horizontal corresponde à posição do centróide do animal.

Traçado do caminho

O traçado do caminho percorrido pelo animal está dividido em duas partes: 1) construção de uma matriz imagem T cujos pixels de coordenadas (i,j) que coincidirem com as coordenadas do centróide do animal (x_{c_N}, y_{c_N}) do n -ésimo quadro, são ajustados para o valor um, equação 4; 2) união dos pixels da matriz T , cujos valores são iguais a um, com segmentos de reta.

Figura 5. (a) Ilustração do processo de etiquetagem. (b) Indicação do centróide do maior objeto da imagem. **Figure 5.** (a) Illustration of the image labeling process. (b) Indication of the mass centre of the biggest object in the image.



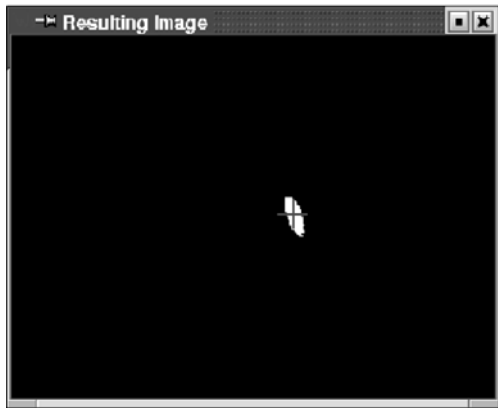


Figura 6. Exemplo do resultado do processo de filtragem.

Figure 6. Example of the filtering process results.

$$T_{i,j} = \begin{cases} 1 & \text{se } (i = x_{C_N}) \text{ e } (j = y_{C_N}) \\ 0 & \text{se } (i \neq x_{C_N}) \text{ e } (j \neq y_{C_N}) \end{cases} \quad (4)$$

Cálculo dos Parâmetros do Experimento

A terceira e última etapa do processamento é o cálculo dos parâmetros de desempenho do animal no labirinto aquático. Os seguintes parâmetros são calculados: latência, distância percorrida e velocidade média.

A distância percorrida pelo animal é a somatória das distâncias entre os centros de massas indicados na matriz T. A distância Euclidiana em pixels $d_{pel}(p,q)$ entre dois pontos consecutivos p e q é determinada pela equação 5 (Marques Filho e Oliveira Neto, 1999):

$$d_{pel}(p,q) = \sqrt{(x-s)^2 + (y-t)^2} \quad (5)$$

onde (x,y) são as coordenadas do centro de massa em p , e (s,t) são as coordenadas do centro de massa em q . A distância em pixels é convertida para centímetros utilizando-se a equação 1.

O tempo de duração do experimento é denominado latência, e é o tempo decorrido entre o início e o término do experimento, em segundos.

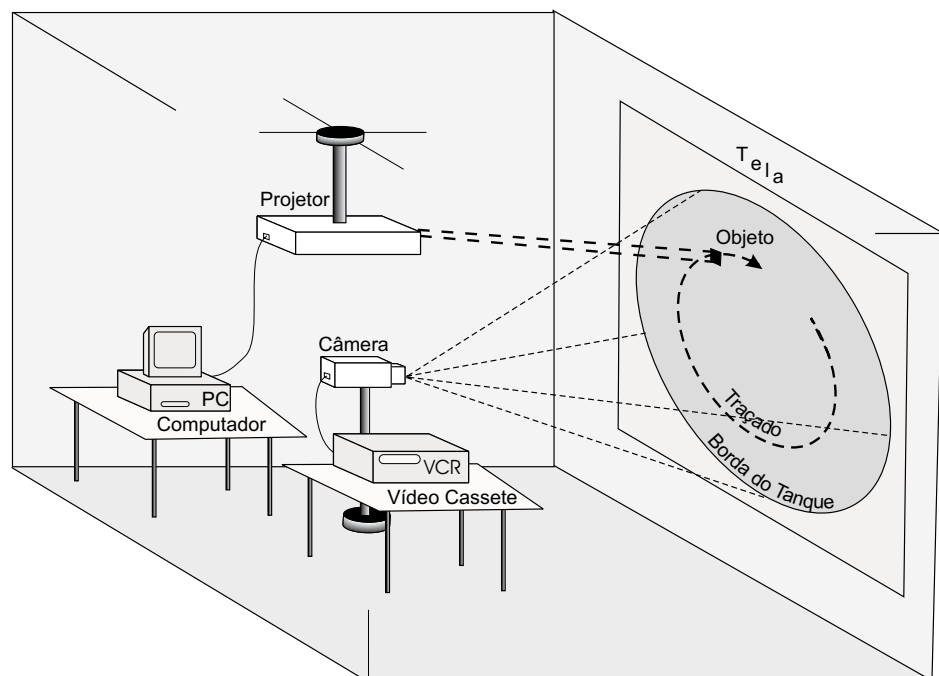
A velocidade média é calculada como a relação entre a distância percorrida e a latência.

Procedimento utilizado para avaliação do WAP

Para a avaliação do WAP implementou-se um simulador de objeto em movimento, em linguagem C++. O objeto consiste de um quadrado de 100 pixels em um monitor ajustado para uma resolução de 800×600 pixels.

Para que as imagens obtidas fossem similares às obtidas na filmagem dos experimentos reais, utilizou-se um projetor multimídia (Boxlight, modelo CP-7t) para projetar em uma tela de $2 \text{ m} \times 2 \text{ m}$ os movimentos gerados pelo simulador e vistos no monitor do microcomputador. A Figura 7 apresenta um esboço da montagem do experimento utilizado na simulação dos movimentos circulares. As imagens projetadas na tela foram registradas em fita, com uma câmera CCD (Watec, modelo WAT-202B) e o vídeo-cassete descrito anteriormente.

Figura 7. Esboço da organização do experimento utilizado para avaliação do WAP com o simulador de movimentos. **Figure 7.** Sketch of the experimental setup used to assess the WAP system with a simulator of circular movements.



Os diâmetros dos movimentos circulares foram escolhidos de acordo com os experimentos realizados no Labirinto da UFPR. Sabe-se que no início o animal tende a nadar próximo às bordas do tanque. Assim, escolheu-se um diâmetro (D_1) de 159,2 cm, próximo ao diâmetro do tanque (173 cm) e no limite da largura da tela de projeção. Conforme o animal vai evoluindo, existe a tendência de nadar na região central do tanque, em busca da plataforma. Definiu-se, portanto um diâmetro médio $D_2 = \frac{2}{3} D_1$ e um diâmetro pequeno $D_3 = \frac{1}{3} D_1$. Os três círculos são concêntricos.

Cada um dos movimentos circulares foi realizado com três velocidades diferentes, avaliando-se assim o desempenho do WAP em relação a este parâmetro. As velocidades foram escolhidas levando-se em conta que a velocidade típica observada nos experimentos foi de aproximadamente 20 cm/s. Utilizou-se uma velocidade menor que 20 cm/s, outra entre 10 a 20 cm/s e uma maior que 20 cm/s.

Cada simulação foi avaliada pelo WAP três vezes e utilizou-se a distribuição *Student t* para determinar a incerteza de medição (IM) e o máximo erro relativo (Spiegel, 1975; Brasil /ABNT-INMETRO-SBM, 1998).

Resultados

A Figura 8 apresenta a interface do programa WAP com o usuário.

As Figuras 9(a) e 9(b) são exemplos do traçado do caminho percorrido pelo mesmo animal, saudável, em dois experimentos distintos, após o período de treinamento. Os pontos 1 e 2 nessas figuras indicam, respectivamente, o local em que o animal foi colocado na água (ponto de partida) e o ponto em que o mesmo encontrou a plataforma submersa (final do experimento).

As Figuras 10(a) e 10(b) apresentam os resultados dos cálculos dos parâmetros de desempenho dos animais em cada um dos experimentos da Figura 9(a) e (b): medidas da distância, latência e velocidade média.

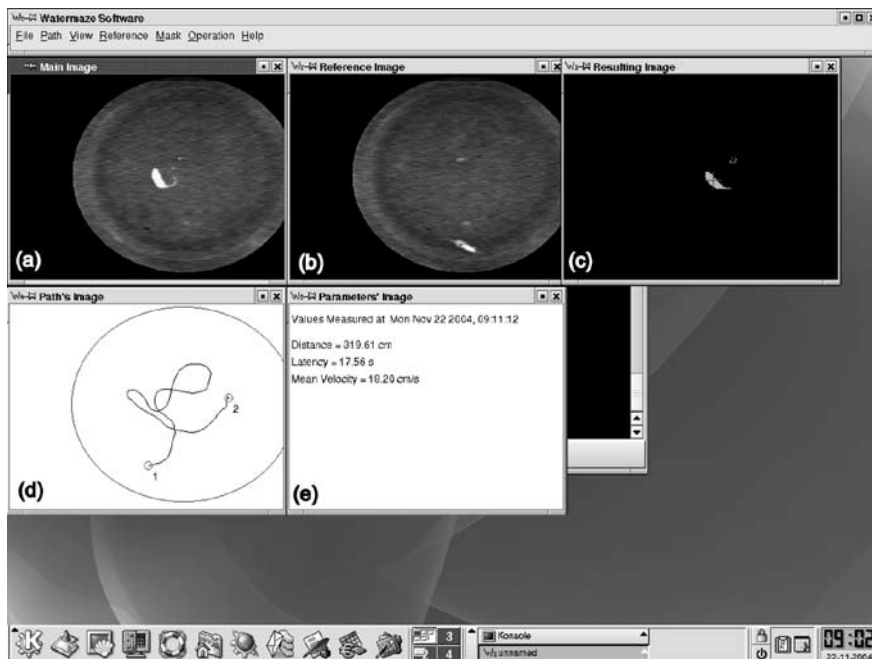


Figura 8. Interface do programa WAP, desenvolvida em ambiente Linux, utilizando X-Windows. (a) Imagem em tempo real do animal nadando no tanque. (b) Imagem referência, utilizada pelo algoritmo de subtração de fundo; (c) Imagem segmentada do animal após ter sido processada. (d) Traçado do caminho percorrido pelo animal durante o experimento. (e) Parâmetros de desempenho do animal. Nota-se que a imagem em (c) não necessariamente corresponde à imagem vista em (a) pois existe um intervalo de tempo entre a captura e o processamento da imagem até obter-se a imagem segmentada (c). **Figure 8.** Interface of the WAP programme, developed in Linux using X-Windows. (a) Real time image of the animal swimming in the tank. (b) Reference image used in the background subtraction. (c) Segmented image after being processed. (d) Swimming path traced by the programme. (e) Evaluation parameters of the animal performance. Note that the image in (c) is not necessarily the same image seen in (a) since there is a time interval between the captured and the processed images.

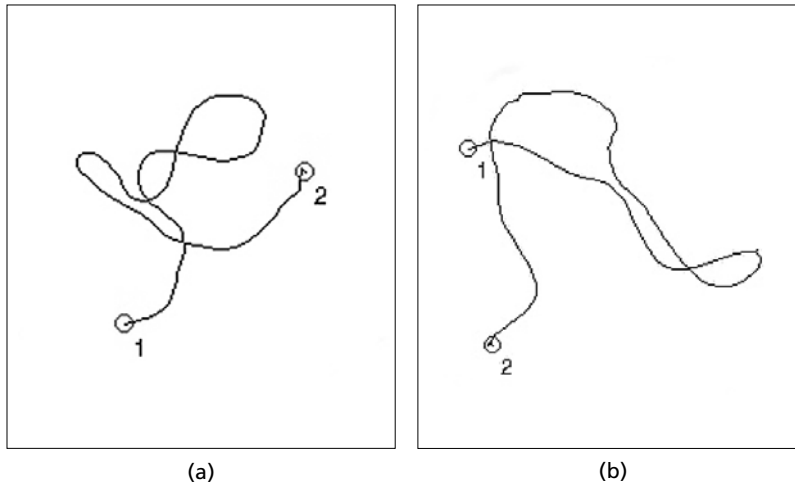


Figura 9. Exemplos do traçado do caminho percorrido pelo animal durante dois experimentos realizados com o labirinto aquático construído no Departamento de Farmacologia da UFPR. Em (a) e (b) as marcas 1 e 2 indicam os pontos de início e fim dos experimentos, respectivamente. **Figure 9.** Examples of the path made by two animals in the water-maze in two different experiments. The marks 1 and 2 indicate the beginning and end of the experiments, respectively.

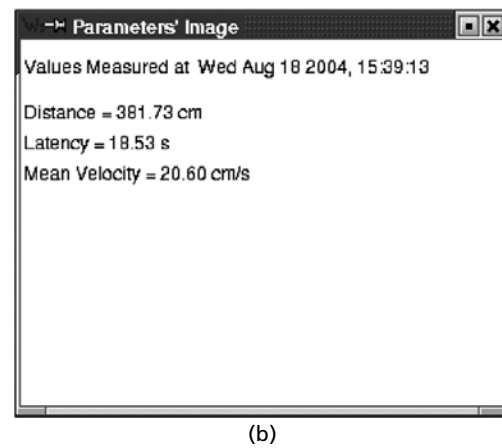
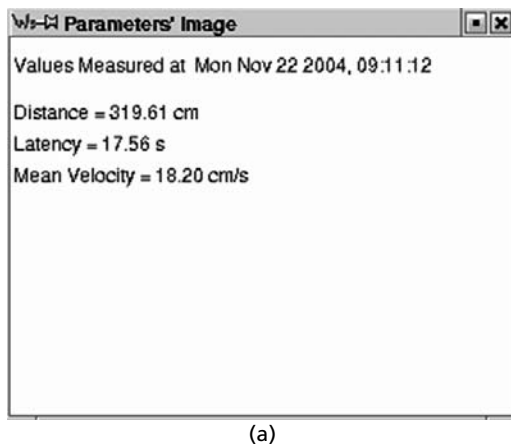


Figura 10. (a) e (b) apresentam os resultados dos cálculos dos parâmetros de desempenho dos animais nos experimentos indicados na Figura 9(a) e (b), respectivamente. **Figure 10.** (a) and (b) present the results of the parameters calculation that indicates the performance of the animal in the experiments indicated in Figures 9(a) and 9(b), respectively.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da avaliação do WAP: incerteza de medição e erro relativo máximo de cada movimento simulado. Nota-se nessa tabela que os erros máximos (e_{max}) de medição para os parâmetros distância, latência e velocidade são diretamente proporcionais à velocidade do movimento simulado, ou seja, quanto maior a velocidade do movimento, maior é o erro na medida. Ainda, nota-se que o erro é inversamente proporcional ao comprimento da circunferência, isto é, quanto maior o comprimento, menor o erro na medida. As Figuras 11, 12 e 13 resumem a avaliação do protótipo para as situações mais críticas encontradas na prática.

Comparando-se as Figuras 11(a), 11(b) e 11(c), verifica-se que o erro na medida de distância aumenta com o aumento da velocidade e diminui com o aumento do diâmetro. Para o círculo de 152,2 cm de comprimento (circunferências internas) o erro é de 3%, 3,3% e 7,6% para as velocidades pequena, média e grande,

respectivamente. Por outro lado, analisando-se as três figuras, nota-se que o erro diminui com o aumento do diâmetro. Portanto, o erro do WAP na medição de distância variou de 0,2% a 7,6%.

Comparando-se as Figuras 12(a), 12(b) e 12(c) verifica-se que o erro na medida da latência aumenta com o aumento da velocidade e diminui com o aumento do diâmetro. Para circunferências de 500,0 cm de comprimento (circunferências externas) os erros são de 3,8%, 6,6% e 10,3% para velocidades pequena, média e grande, respectivamente. Por outro lado, analisando-se as três figuras, nota-se que o erro diminui com o aumento do diâmetro do movimento. Portanto, o erro do WAP na medição da latência variou entre 3,8% e 18%.

Comparando-se as Figuras 13(a), 13(b) e 13(c) verifica-se que, como nos demais casos, o erro na medida de velocidade aumenta com o aumento da velocidade e diminui com o aumento do diâmetro do movimento. Para circunferências de 500,0 cm de comprimento

Tabela 1. Incertezas de medição (IM) e erros percentuais máximos (e_{\max}) do sistema WAP com alteração da velocidade de deslocamento do animal e do diâmetro do movimento simulado. **Table 1.** Measurement uncertainty (IM) and maximum percentage errors (e_{\max}) of the WAP system with different velocities and diameters of the simulated object movement

Simulador					WAP			
Latência (s)	Velocidade (cm/s)		Distância (cm)		Grandeza	X (médio)	IM	e_{\max} (%)
18,1	Pequena	8,4	Pequena	152,2	Distância (cm)	151,2	± 3,5	3,0
36,4		9,0	Média	328,3		327,5	± 3,4	1,3
54,0		9,3	Grande	500,0		499,8	± 0,9	0,2
10,0	Média	15,2	Pequena	152,2		149,1	± 1,9	3,3
19,7		16,4	Média	328,3		325,4	± 2,4	1,6
27,7		18,0	Grande	500,0		501,7	± 5,4	1,4
7,1	Grande	21,3	Pequena	152,2		142,3	± 1,7	7,6
11,4		28,8	Média	328,3		321,5	± 7,3	4,3
18,8		26,6	Grande	500,0		494,5	± 1,0	1,3
18,1	Pequena	8,4	Pequena	152,2	Latência (s)	18,3	± 1,4	9,0
36,4		9,0	Média	328,3		36,3	± 1,4	4,2
54,0		9,3	Grande	500,0		54,7	± 1,4	3,8
10,0	Média	15,2	Pequena	152,2		9,7	± 1,4	18,0
19,7		16,4	Média	328,3		20,3	± 1,4	10,5
27,7		18,0	Grande	500,0		27,3	± 1,4	6,6
7,1	Grande	21,3	Pequena	152,2		8,0	± 0,0	12,1
11,4		28,8	Média	328,3		11,3	± 1,4	13,2
18,8		26,6	Grande	500,0		19,3	± 1,4	10,3
18,1	Pequena	8,4	Pequena	152,2	Velocidade (cm/s)	8,3	± 0,8	10,9
36,4		9,0	Média	328,3		9,0	± 0,3	3,6
54,0		9,3	Grande	500,0		9,1	± 0,3	3,9
10,0	Média	15,2	Pequena	152,2		15,5	± 2,3	17,0
19,7		16,4	Média	328,3		16,0	± 1,2	11,3
27,7		18,0	Grande	500,0		18,4	± 1,1	8,2
7,1	Grande	21,7	Pequena	152,2		17,8	± 0,2	17,6
11,4		28,8	Média	328,3		28,4	± 3,2	12,4
18,8		26,6	Grande	500,0		25,6	± 1,8	10,5

(circunferências externas) os erros são de 3,9%, 8,2% e 10,5% para velocidades pequena, média e grande, respectivamente. Por outro lado, analisando-se as três figuras nota-se que o erro diminui com o aumento do diâmetro do movimento. Portanto, o erro do WAP na medição da velocidade média variou entre 3,6% e 17,6%.

Experimento *in vivo*

Além das avaliações de desempenho, efetuou-se também um estudo com animais. Nesse estudo dez ratos machos da linhagem Wistar foram submetidos a uma cirurgia onde em cada um uma cânula metálica foi implantada sobre o hipocampo. Sabe-se que a rede neural do hipocampo é crucial para que o animal armazene

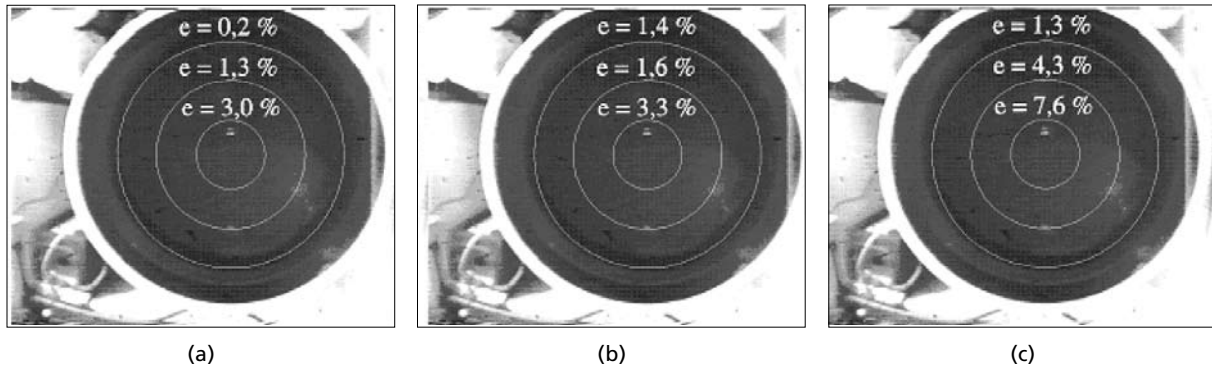


Figura 11. Erro percentual máximo na medição do parâmetro distância em função do comprimento da circunferência e da velocidade com que este é traçado pelo Simulador de Movimentos. Da esquerda para a direita têm-se os mapas de erros para velocidades pequena ($V < 10$ cm/s), média (10 cm/s $< V < 20$ cm/s) e grande ($V > 20$ cm/s), respectivamente. Três movimentos circulares de diferentes comprimentos foram simulados para cada velocidade: 152,2 cm (pequeno), 328,2 cm (médio) e 500,0 cm (grande). **Figure 11.** Maximum percentage error of the distance parameter as a function of the circular length and the velocity at which the Movement Simulator traces the circular path. From left are the maps of errors for low ($V < 10$ cm/s), medium (10 cm/s $< V < 20$ cm/s) and high velocities ($V > 20$ cm/s), respectively. For each velocity three circular lengths were evaluated: small (152.2 cm), medium (328.2 cm) and large (500.0 cm).

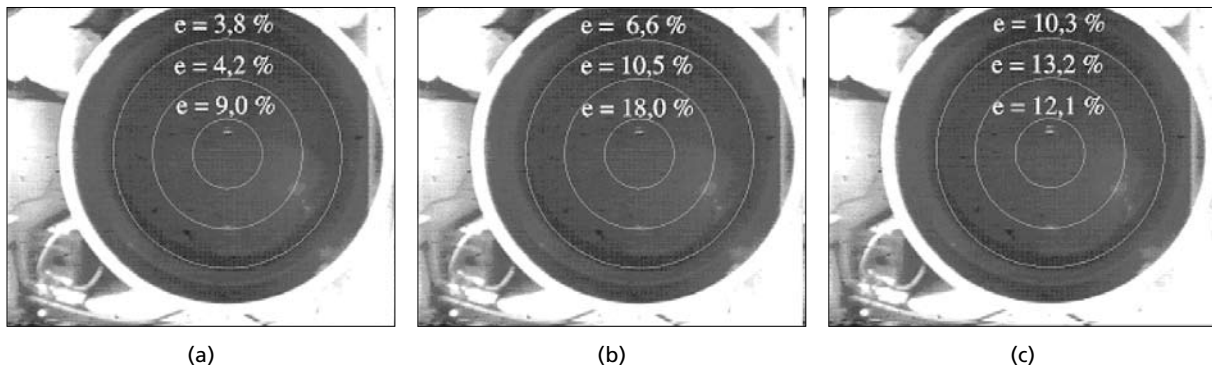


Figura 12. Erro percentual máximo na medição do parâmetro latência em função do comprimento da circunferência e da velocidade com que este é traçado pelo Simulador de Movimentos. Da esquerda para a direita têm-se os mapas de erros para velocidades pequena ($V < 10$ cm/s), média (10 cm/s $< V < 20$ cm/s) e grande ($V > 20$ cm/s), respectivamente. Três movimentos circulares de diferentes comprimentos foram simulados para cada velocidade: 152,2 cm (pequeno), 328,2 cm (médio) e 500,0 cm (grande). **Figure 12.** Maximum percentage error of the latency parameter as a function of the circular length and the velocity at which the Movement Simulator traces the circular path. From left are the maps of errors for low ($V < 10$ cm/s), medium (10 cm/s $< V < 20$ cm/s) and high velocities ($V > 20$ cm/s), respectively. For each velocity three circular lengths were evaluated: small (152.2 cm), medium (328.2 cm) and large (500.0 cm).

e evoque as informações espaciais da experiência de nadar no labirinto aquático (Morris *et al.*, 1982; D'Hooge e De Deyn, 2001). Os animais passaram por quatro dias de treinamento conforme já descrito. No quinto dia, os animais receberam o anestésico local lidocaína no hipocampo.

As Figuras 14(a), (b) e (c) ilustram o caminho típico percorrido por um dos animais no primeiro, quarto e quinto dias de experimento, respectivamente. Ressal-

ta-se que os traçados dos caminhos percorridos pelos animais em cada um dos quatro dias dos experimentos são bastante similares.

A Figura 15 apresenta o gráfico do valor médio de latência, ou o período de tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma. As barras verticais representam o desvio padrão da média. Observa-se que durante os treinamentos, os animais rapidamente aprendem a localizar a plataforma, o que é constatado

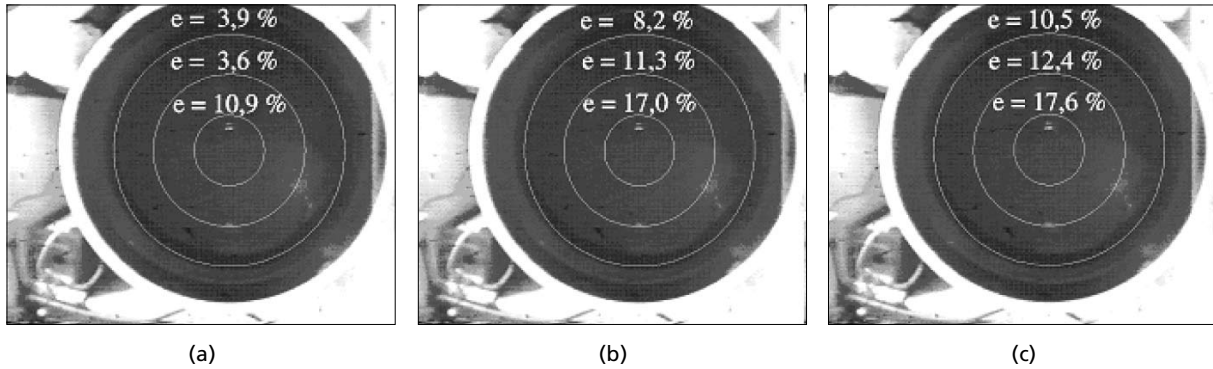


Figura 13. Erro percentual máximo na medição do parâmetro velocidade em função do comprimento da circunferência e da velocidade com que esta é traçada pelo Simulador de Movimentos. Da esquerda para a direita têm-se os mapas de erros para velocidades pequena ($V < 10 \text{ cm/s}$), média ($10 \text{ cm/s} < V < 20 \text{ cm/s}$) e grande ($V > 20 \text{ cm/s}$), respectivamente. Três movimentos circulares de diferentes comprimentos foram simulados para cada velocidade: 152,2 cm (pequeno), 328,2 cm (médio) e 500,0 cm (grande). **Figure 13.** Maximum percentage error of the velocity parameter as a function of the circular length and the velocity at which the Movement Simulator traces the circular path. From left are the maps of errors for low ($V < 10 \text{ cm/s}$), medium ($10 \text{ cm/s} < V < 20 \text{ cm/s}$) and high velocities ($V > 20 \text{ cm/s}$), respectively. For each velocity three circular length were evaluated: small (152.2 cm), medium (328.2 cm) and large (500.0 cm).

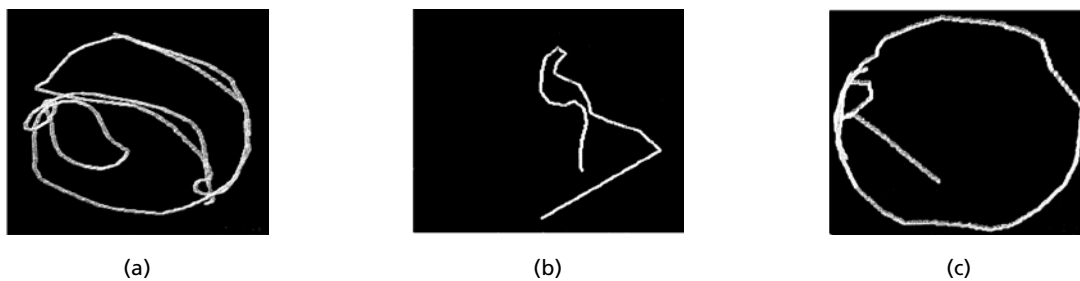


Figura 14. Exemplo dos caminhos percorridos por um dos animais no: (a) primeiro; (b) quarto e (c) quinto dia de experimento. **Figure 14.** Example of the animal path traced by the WAP in the: (a) first, (b) fourth and (c) fifth days of experiment.

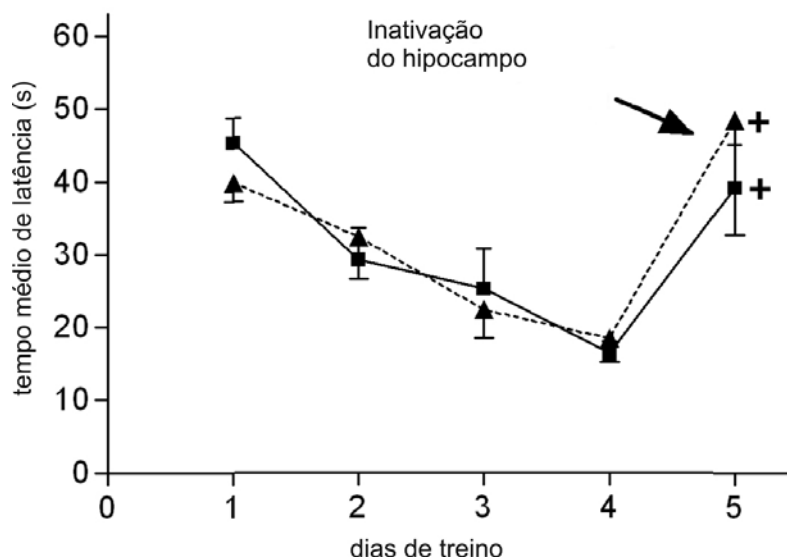


Figura 15. Evolução do tempo de latência dos experimentos realizados in vivo com os animais. **Figure 15.** Evolution of the latency period of the experiment performed "in vivo", using Wistar rats.

pela redução do período de tempo. Contudo, no quinto dia, após a aplicação da lidocaína, houve um aumento acentuado do período de latência.

Discussão

A partir dos mapas de erro apresentados nas Figuras 11, 12 e 13, as seguintes considerações podem ser feitas sobre o desempenho do WAP:

1. O erro percentual máximo apresentado pelo WAP, na medição de qualquer um dos três parâmetros (distância, latência e velocidade média), diminui com o aumento do raio do movimento. Movimentos realizados na periferia do tanque apresentam erros significativamente menores do que aqueles realizados na região central do tanque. Nos treinamentos iniciais, quando o animal tende a nadar na periferia do tanque, pode-se determinar com precisão (intervalo de confiança de 95%) o erro de medição apresentado pelo WAP. Contudo nos treinamentos posteriores, quando o aprendizado do animal aumenta, este se desloca ora em movimentos perpendiculares ao raio e ora em movimentos circulares, assim o erro final é a composição dos erros em cada ponto do movimento e é, por isso, de difícil determinação.
2. O erro percentual máximo aumenta com o aumento da velocidade, inviabilizando a utilização do protótipo em velocidades muito altas ($V > 30$ cm/s). O aumento do erro com o aumento da velocidade deve-se à taxa de amostragem do sistema que é de 1,7 quadros/s. Como este número é constante, com o aumento da velocidade de deslocamento do animal, menor é o número de pontos para o traçado do caminho percorrido. Esta limitação, contudo, está relacionada com a velocidade de processamento dos algoritmos e depende do microcomputador utilizado.
3. Os erros máximos apresentados pelo WAP, na medição de latência e velocidade média, atingiram valores altos em alguns casos: a latência, por exemplo, chegou a apresentar um erro máximo de 18% para pequenas distâncias e velocidade de deslocamento média ($10 < V < 20$ cm/s), que é uma faixa de velocidade típica de nado do animal. Os grandes erros apresentados pelo WAP, na medição de latência e velocidade média, para experimentos de curta duração (experimentos com duração inferior a 10 s), são devidos ao tempo de resposta do sistema: há um atraso variável de 1 a 2 s entre o clique do mouse e a resposta do sistema, causando

um impacto significativo (erro grande) na medição da latência quando o experimento é de curta duração e causando pouco ou nenhum impacto quando o experimento é de longa duração.

Outro aspecto que merece consideração, mesmo sendo raro, é o fato de que o animal pode algumas vezes mergulhar. Quando isso ocorre, o WAP pode ter dois comportamentos: 1) caso não exista nenhum ruído (reflexo da luz na água), o que é mais comum pois o animal mergulhou, o sistema irá localizar automaticamente a nova posição do animal quando esse retornar à superfície; 2) em havendo ruído, o sistema poderá considerar o ruído como sendo o animal, unindo o ponto de mergulho ao ruído e, quando esse retornar à superfície, unir o ponto de ruído ao animal no ponto em que este emergiu. Nesse último caso será necessário repetir o experimento.

Conclusão

Embora o labirinto aquático tenha sido desenvolvido por Morris há vários anos, trata-se de um experimento ainda muito utilizado nos dias de hoje nos principais laboratórios de farmacologia. Nesse trabalho apresentou-se o labirinto implementado para o Departamento de Farmacologia da UFPR e descreveu-se um novo programa, chamado WAP (*Water-maze Analysis Programme*), para auxiliar a análise do desempenho do animal nos experimentos. O WAP foi avaliado com um simulador de movimentos e demonstrou ser capaz de medir os parâmetros: distância percorrida, latência e velocidade média. O programa está licenciado pela GPL e disponível para toda a comunidade científica sem qualquer custo.

Alguns pequenos ajustes podem melhorar o desempenho do WAP, por exemplo: incorporar algumas das etapas de pré-processamento no device driver, tais como subtração de quadros, etiquetagem, cálculo de área, etc. Isso permitirá que um maior número de quadros possa ser processado por segundo. Contudo, é importante mencionar que tanto os testes com o simulador como os realizados com animais, demonstraram que uma taxa de 1,7 quadros/s é suficiente para rastrear os animais no tanque do labirinto aquático, cuja velocidade típica de nado é da ordem de 20 cm/s.

Observa-se que os sistemas equivalentes ao desenvolvido nesse trabalho são importados e de alto custo. Na ausência de recursos financeiros para aquisição de um sistema comercial, não foi possível a comparação de desempenho.

Referências

- Blanchette, J., Summerfield, M. (2004), C++ GUI Programming with Qt 3, New Jersey: Pearson Education.
- Brasil/ABNT-INMETRO-SBM (1998), Guia para a expressão da incerteza de medição [ISO GUM], 2ª Edição Brasileira. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, Instituto Nacional de Metrologia, Sociedade Brasileira de Metrologia.
- Castleman, K.R. (1996), Digital Image Processing, New Jersey: Prentice Hall.
- D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001), "Applications of the Morris water-maze in the study of learning and memory", *Brain Research Reviews*, v. 36, p. 60-90.
- Gonzalez, R.C., Woods, R.E. (2002), Digital Image processing, 2nd Ed., New Jersey: Prentice Hall.
- Lucas, L.A. (2001), Protótipo de um Sistema Automatizado para Coleta de Dados no Labirinto Aquático (Water-maze) através e Processamento Digital de Imagens, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial (CPGEI), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Curitiba.
- Marques Filho, O., Vieira Neto, H. (1999), Processamento Digital de Imagens, Rio de Janeiro: Brasport.
- Morris, R. (1984), "Developments of a water-maze procedure for studying spacial learning in the rat", *Journal of Neuroscience Methods*, London, v. 11, p. 47-60.
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., O'Keefe, J. (1982), "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions", *Nature*, v. 297, p. 681-683.
- Parker, J.R. (1996), Algorithms for Image Processing and Computer Vision, New York: John Wiley & Sons.
- Pun, T. (1980), "A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram", *Signal Processing*, v. 2, p. 223-237.
- Russ, J.C. (1992), The Image Processing Handbook. Boca Raton: CRC Press.
- Sonka, M., Hlavac, V., Boyle, R. (1995), Image Processing Analysis and Machine Vision, London: Chapman & Hall
- Spiegel, M.R. (1975), Estatística, Coleção Schaum, São Paulo: McGraw-Hill.

