

# **Análise de trajetórias de natação como ferramenta de avaliação de comportamento natatório em *Daphnia similis***

**Marcia Akari Yoshida**

## **BREVE INTRODUÇÃO**

(Parte do que está aqui foi apresentada já a vocês, então se quiserem, podem pular)

Testes ecotoxicológicos são ferramentas importantes na tomada de decisões, que podem ter sérias repercussões ambientais e/ou econômicas. O efeito medido em estudos com cladóceros (microcrustáceos) do gênero *Daphnia* é a letalidade, ou alguma outra manifestação que a anteceda, como o estado de imobilidade, por exemplo. Porém, o fato de uma substância não produzir efeitos letais não significa necessariamente que ela não seja tóxica aos organismos.

O comportamento dos indivíduos também pode afetar as variáveis demográficas fundamentais de sua população através da escolha de habitat, captura de presas e fuga de predadores, entre outros fatores. Alguns efeitos subletais resultantes da ação de agentes tóxicos em dafnínidos, por exemplo, podem se manifestar na forma de redução da taxa de filtração ou paralisia de apêndices natatórios.

Isso é ótimo ter um teste adicional que gere resultados relativamente rápidos de efeitos que contaminantes têm na natação desses organismos. Desta forma, este trabalho propõe testar se as mudanças no comportamento natatório de *Daphnia similis* provocadas por substâncias contaminantes podem ser detectadas e avaliadas por métodos de captura e de análise de trajetórias de natação.

## **OBJETIVO**

O objetivo específico desta fase dos experimentos é determinar se as configurações de filmagem influenciam no comportamento dos organismos. Deseja-se evitar ao máximo que as reações dos animais às condições de filmagem interfiram na sua reação ao contaminante.

Por exemplo, se em uma filmagem os organismos se comportaram fora do normal, eu tenho que saber se isso aconteceu por causa do contaminante.... ou por causa da luz que atraiu eles pra superfície, ou por falta de alimento, ou por que eles estavam com sono, ou por qualquer outro fator que não o contaminante! Nestas filmagens especificamente, foram considerados quatro fatores:

1. Tempo de aclimação dos animais nas cubetas (aquários)
2. Volume das cubetas
3. Cor da luz
4. Taxa de aquisição de imagens

Espera-se observar a influência desses fatores sobre os seguintes aspectos do comportamento natatório dos animais, que serão explicados melhor na parte sobre métodos de análise de trajetórias:

- Net-to-Gross Displacement Ratio (NGDR)
- Taxa de pulos
- Altura média das trajetórias

## MÉTODOS

Segue uma descrição dos processos de filmagem e obtenção de trajetórias:

### ***Daphnia similis***

*D. similis* é uma espécie de cladóceros zooplânctônicos comumente utilizada em testes ecotoxicológicos no Brasil. Os indivíduos dessa espécie têm em média de 0,5mm a 5,0mm e vivem em águas continentais (lagos, rios, represas) do mundo inteiro. Os organismos utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo setor de ecotoxicologia aquática da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), todos neonatos (i.e. com idade entre 6 e 24 horas) e provindos da mesma cepa (são todos clones provindos de reprodução assexuada).

### **Filmagens**

Os vídeos foram gravados em um sistema observacional, simplificado na figura 1, constituído de (i) iluminação incidente por uma lâmpada LED (Light Emitting Diode) de cor branca, (ii) filtro colorido, (iii) lente colimadora, (iv) cubeta (ou aquário) e (v) câmera filmadora com lente de aumento.

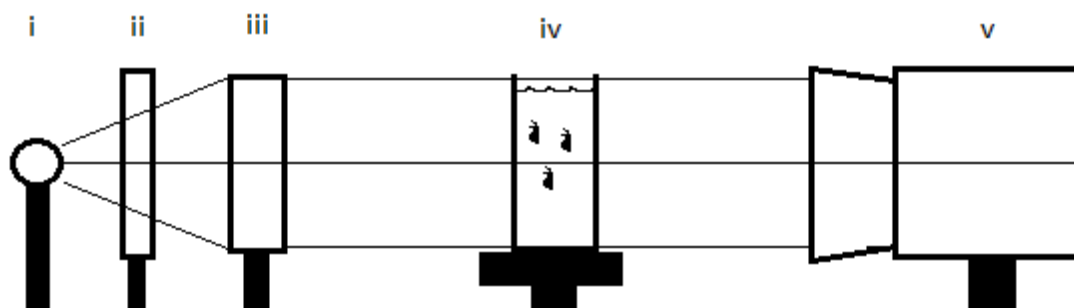


Figura 1: Desenho esquemático do sistema observacional onde: (i) Lâmpada LED branca; (ii) filtro de cor; (iii) lente colimadora; (iv) cubeta; (v) câmera

Em cada cubeta, foram colocados em média 6 animais por vídeo. A câmera grava a sombra gerada pelos organismos que interrompem os raios de luz que chegam até ela. Adicionalmente, para diminuir os efeitos de fontes externas de luz, a cubeta foi coberta por uma caixa perfurada para deixar passar apenas os raios de luz gerados pelo LED. Os componentes do sistema óptico variaram de acordo com os fatores e cada filmagem:

#### **1. Tempo de aclimação dos animais nos aquários**

É esperado que os organismos apresentem comportamento diferente assim que forem colocados nos aquários de filmagem (cubetas), pois estarão sendo introduzidos em um ambiente bem menos espaçoso do que o seu ambiente de cultivo. Por outro lado, depois de certo tempo se acostumando no novo ambiente (aclimação), pode ser que seu comportamento varie menos. Foram considerados dois tempos:

t0 : filmagem feita logo após os animais serem introduzidos na cubeta

t1 : filmagem feita após 15 minutos de aclimação na cubeta

É importante ressaltar que os animais filmados em t1 não são os mesmos que os filmados em t0. Após as filmagens em cada tempo, os animais foram devidamente descartados.

## **2. Volume das cubetas**

Também espera-se algum efeito do volume disponível para natação no comportamento das *Daphnias*, tanto pela influência nos encontros entre animais quanto nos encontros entre animais e paredes da cubeta. Neste experimento foram utilizados dois tamanhos:

v1: cubeta de 4,0ml (10mm de largura x 40mm de altura x 10mm de profundidade)

v2 : cubeta de 8,0ml (20x40x10mm)

## **3. Cor da luz**

Sabe-se que dafinídeos têm comportamento fototático (são atraídos pela luz), que difere de acordo com o comprimento de onda da luz (sua cor): são atraídos mais pela luz azul do que pela luz vermelha, por exemplo. Seria ideal utilizar uma cor de luz que não seja atraente aos organismos; portanto, aqui deseja-se saber qual a influência de duas cores de luz incidente:

R : cor vermelha, obtida utilizando-se um filtro de luz (ii) que permite apenas a incidência de luz vermelha na cubeta.

W : cor branca, obtida utilizando a lâmpada LED branca (i) sem o uso de filtros coloridos.

## **4. Taxa de aquisição de imagens**

A taxa de aquisição de imagens pode ser alterada nas configurações da câmera e se trata basicamente de quantas “fotos” são batidas por segundo. Dependendo desse fator, pode-se perder informações das trajetórias dos animais, o que faz os valores de velocidade dos animais variar, por exemplo. Os vídeos foram filmados em duas taxas:

10fps: 10 quadros por segundo

30fps: 30 quadros por segundo

Esses quatro fatores foram combinados para cada filmagem, de forma que cada combinação de tempo de aclimação, volume da cubeta e cor de luz tivesse três réplicas (figura 2). É importante citar que para cada réplica, sem haver troca de organismos, foram filmados dois vídeos: um a 10 fps e outro a 30fps. A taxa de aquisição de imagens, portanto, é dependente das réplicas.

Por exemplo, uma cubeta com organismos aclimatados por 15 minutos (t1), de 4,0ml de volume (v1), sob luz branca (W), foi filmada duas vezes, uma a 10fps e uma a 30fps, uma seguida da outra, porém não necessariamente nessa ordem. No total, foram obtidos 48 vídeos de aproximadamente 30 segundos cada um. Os vídeos foram filmados em ordem aleatória.



Em alguns casos, as imagens dos animais ficavam sobrepostas e suas trajetórias se cruzavam. Na impossibilidade de identificar qual indivíduo era qual antes e depois do encontro, as suas trajetórias foram consideradas diferentes antes e depois (figura 3). Por isso, o número de trajetórias encontradas varia de vídeo pra vídeo. Casos em que os indivíduos estavam imóveis ou presos na superfície da água não foram considerados.

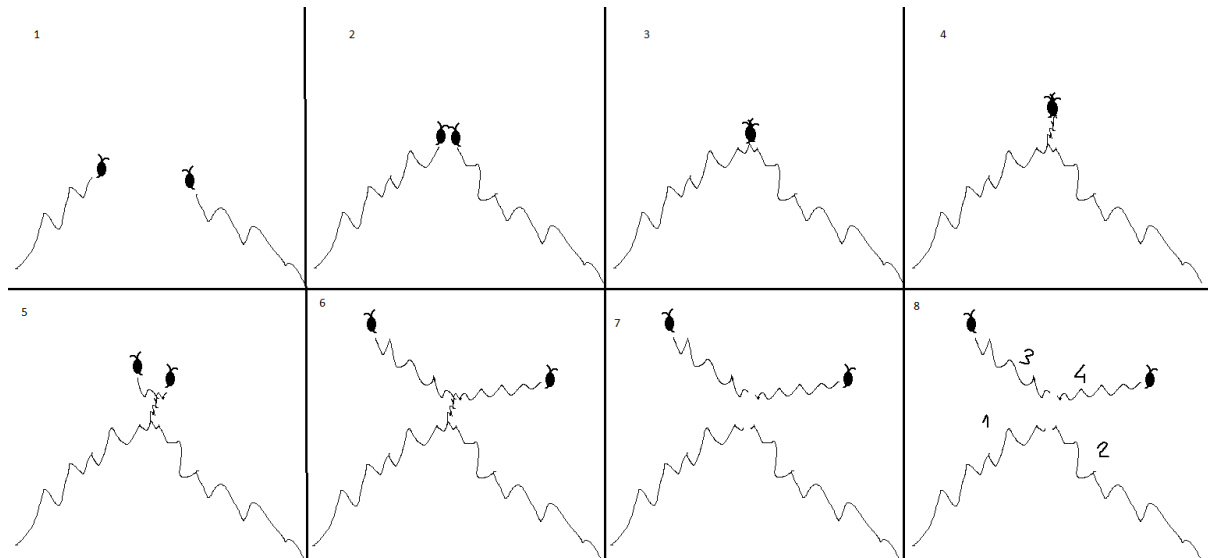


Figura 3: Exemplo de encontro de indivíduos na cubeta. No caso de as suas trajetórias se cruzarem por muito tempo de modo a impossibilitar a identificação dos animais, as duas trajetórias foram separadas em quatro.

### Cálculo de parâmetros

O TrackMate nos dá como output os dados de posições x e y de cada indivíduo em cada quadro. A partir desses dados, foram calculados o NGDR, a taxa de pulos e altura média de cada trajetória.

- Net-to-Gross Displacement Ratio (NGDR): índice de complexidade da trajetória, avalia a tortuosidade ou o quão a trajetória do animal se aproxima de uma linha reta (figura 4). Quanto menor o NGDR, mais complexa e cheia de curvas é a trajetória; o seu valor máximo é 1,0. Calculada dividindo-se o deslocamento do animal do começo ao fim do vídeo (net displacement) pela somatória das distâncias euclidianas totais percorridas pelo organismo (gross displacement).

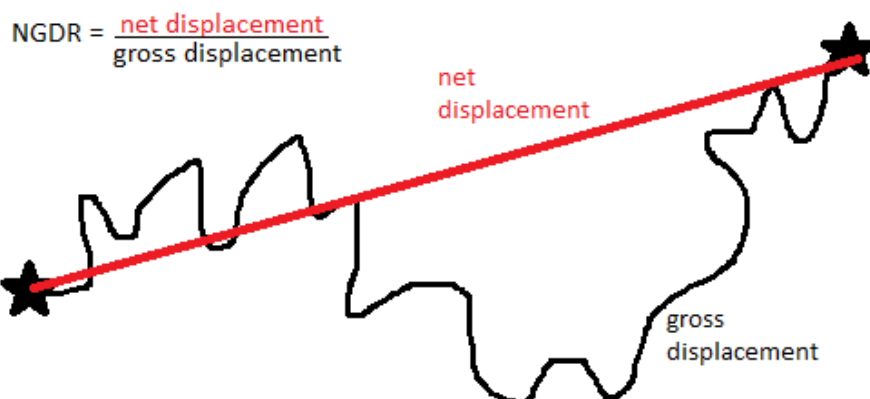


Figura 4: Exemplo de cálculo de NGDR

- Taxa de pulos: número de pulos por segundo de cada animal (ou trajetória), representa o número de “braçadas” que o indivíduo deu. Calculado plotando-se o gráfico da velocidade instantânea pelo tempo (figura 5). Os picos de velocidade foram considerados como “pulos” dos animais e foram calculados utilizando-se a função peakfind do matlab, com a condição de seus valores serem 1,5 vezes maior que a velocidade média.

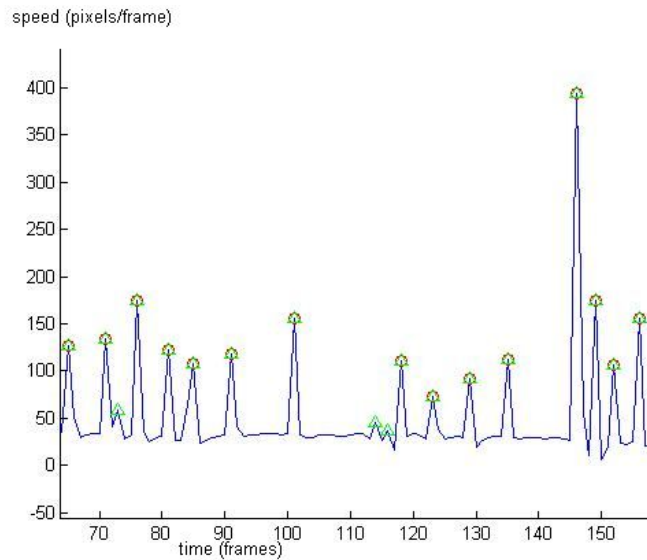


Figura 5: Exemplo de identificação de picos de velocidade (ou pulos) em uma trajetória. O programa Peakfind do matlab identifica os picos com valor maior do que 1.5 x a velocidade média da trajetória (pontos vermelhos). Os triângulos verdes não foram considerados como pulos.

- Altura média da trajetória: Esse parâmetro representa a imobilidade do organismo. Por natureza, os dafinídios tendem a se locomover verticalmente na coluna d’água; quando seus órgãos locomotores estão comprometidos, a altura média que alcançam diminui. O próprio TrackMate informa os dados médios de posição y para cada trajetória. Para se obter o valor de altura na cubeta, esses dados de posição y foram subtraídos do valor de y do fundo da cubeta (figura 6).

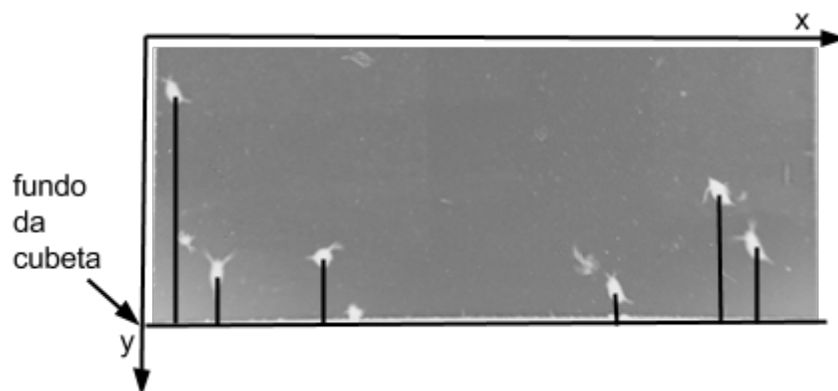


Figura 6: Exemplo de como foi calculada a altura média de cada trajetória.

## RESULTADOS ESPERADOS

No total, foram obtidas 346 trajetórias dos 48 vídeos. Em anexo estão as médias dos dados de NGDR, pulos e altura calculados para esses dados.

A partir do resultado das análises estatísticas destes dados, espera-se entender melhor a influência desses fatores na natação de *D. similis* e, consequentemente, planejar um design experimental adequado para as filmagens utilizando contaminantes.

## REFERÊNCIAS

Algumas referências bibliográficas que poderão ou não ser úteis no entendimento do trabalho. Por favor façam perguntas e me contem como estão indo as coisas em [marcia.yoshida@usp.br](mailto:marcia.yoshida@usp.br) ou no Laboratório de Sistemas Planctônicos (LAPS) no Instituto Oceanográfico (IO-USP sala 100)

1. Magalhães DP, Ferrão-Filho AS. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Australis* 2008; 12(03):355-381.
2. Dodson SI, Ryan S, Tollrian R, Lampert W. Individual swimming behavior of *Daphnia*: effects of food, light and container size in four clones. *Journal of Plankton Research* 1997; 19(10):1537-1552.
3. Moison M, Schmitt FG, Souissi S. Differences in feeding activity between females and males of *Temora longicornis*. *Ecological Research* 2013; 28:459-467.