Mauricio Watanabe Ribeiro

Desenvolvimento de ferramentas para o estudo do processamento de estímulos vocais em saguis-comuns

Natal

2015

INSTITUTO INTERNACIONAL
DE NEUROCIÊNCIAS
EDMOND E LILY SAFRA
Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia

Mauricio Watanabe Ribeiro

Desenvolvimento de ferramentas para o estudo do processamento de estímulos vocais em saguis-comuns

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia do Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Neuroengenharia.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Ferreira Pereira de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Lima Brasil

Natal

2015

Mauricio Watanabe Ribeiro
Desenvolvimento de ferramentas para o estudo do processamento de estímulos vocais em saguis-comuns/ Mauricio Watanabe Ribeiro. – Natal, 2015-
73 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Ferreira Pereira de Araújo

Dissertação (Mestrado) – INSTITUTO INTERNACIONAL DE NEUROCIÊNCIAS EDMOND E LILY SAFRA
Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia, 2015.

1. Sagui-comum. 2. Vocalização. 3. Eletrofisiologia. I. Profa. Dra. Mariana Ferreira Pereira de Araújo. II. Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra.

CDU 02:141:005.7

Mauricio Watanabe Ribeiro

Desenvolvimento de ferramentas para o estudo do processamento de estímulos vocais em saguis-comuns

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia do Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Neuroengenharia.

Profa. Dra. Mariana Ferreira Pereira de Araújo
Orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto Tenório de Carvalho Júnior
Convidado 1

Prof. Dr. Edgard Morya
Convidado 2

Natal
2015

Resumo

O sagui-comum é um pequeno primata arbóreo oriundo do Nordeste brasileiro, de fácil manuseio, ciclo de vida compacto e alta taxa de reprodução. Ele possui estrutura e comportamentos sociais similares aos dos humanos: criação cooperativa da prole, variado repertório vocal e alto índice de vocalização. O objetivo deste projeto foi desenvolver e avaliar ferramentas para o estudo das bases neurais da comunicação vocal em saguis. O projeto está dividido em três partes. Na primeira, foram feitas sessões de gravações de vocalizações emitidas espontaneamente pelos saguis que vivem no biotério do Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra (IIN-ELS). Estas vocalizações poderão ser usadas como estímulos em experimentos que investiguem o processamento vocal. Além disso, os parâmetros acústicos de dois tipos de vocalização foram comparados aos usados em um modelo computacional que gera "vocalizações virtuais". Foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros usados no modelo e os encontrados nas vocalizações gravadas. Desse modo, os parâmetros deste modelo devem ser calibrados para gerar estímulos virtuais mais próximos das vocalizações naturalmente emitidas pelos animais do biotério do IIN-ELS. Na segunda parte deste projeto, foi analisada a viabilidade do uso de microeletrodos de aço para o registro crônico de 6 regiões cerebrais do sagui. Os resultados sugerem que esses microeletrodos permitem registros viáveis por pelo menos 27 semanas. Eles poderão, portanto, ser usados em estudos futuros que envolvam o registro crônico de múltiplas áreas cerebrais durante tarefas de discriminação de estímulos auditivos. Na terceira e última parte deste projeto, foi desenvolvida uma caixa de condicionamento operante para saguis, projetada para apresentar estímulos sonoros. Esta caixa é altamente customizável e foi feita com equipamentos de baixo custo facilmente encontrados no Brasil, sendo controlada por uma placa Arduino cuja interação com o usuário é intermediada por uma interface gráfica feita para este propósito. As três ferramentas descritas neste projeto poderão ser usadas para o estudo do processamento de estímulos vocais e dos correlatos neurais da comunicação vocal em saguis.

Palavras-chaves: sagui-comum; caixa operante; vocalização; *Callitrix jacchus*; microeletrodos; aço inox; arduino.

Abstract

The common marmoset is a small arboreal primate native from Brazilian Northeast which is easy to handle, has a short life cycle and high reproduction rates. It has a social structure and behaviours that are similar to humans: cooperative breeding, a vast vocal repertoire and high rate of vocalization. The goal of this project was to develop and evaluate tools for studying the neural basis of vocal communication in marmosets. The project is divided into three parts. In the first part, spontaneous vocalizations uttered by the marmosets living at the bioterium of the Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience (ELS-IIN) were recorded. The obtained vocalizations will be available to be used as stimuli in future experiments investigating vocal processing. Moreover, the acoustic parameters of two types of vocalization were compared to those used in a computer model that generates "virtual vocalizations". There were significant differences between the parameters used in the model and those found in the recorded vocalizations. Thus, the parameters of this model should be calibrated in order to generate virtual stimuli closer to the naturally uttered by the animals in the bioterium of the ELS-IIN. In the second part of this project, the feasibility of the use of stainless steel microelectrodes for chronically recording six brain areas of marmosets was analyzed. The results suggest that these microelectrodes allow viable recordings for at least 27 weeks. They can therefore be used in future studies involving chronic recording of multiple brain areas during auditory stimuli discrimination tasks. In the third and final part of this project, an operant box for marmosets, designed to present auditory stimuli was developed. This equipment is highly customizable and was made with low-cost and readily available materials in Brazil. It is controlled by an Arduino board with the user interaction mediated by a graphic interface made for this purpose. The three tools described in this project can be used in the future for studying vocal stimuli processing and the neural correlates of vocal communication in marmosets.

Keywords: commom-marmoset; operant box; vocalization; *Callitrix jacchus*; arduino.

Sumário

1 Introdução . . . 1
1.1 Aspectos gerais dos saguis-comuns . . . 1
1.2 Os saguis como modelos animais . . . 2
1.3 Capacidades cognitivas . . . 4
1.4 Objetivos . . . 5
1.5 Organização do documento . . . 6
2 Gravação de vocalizações . . . 7
2.1 Introdução . . . 7
2.2 Materiais e métodos . . . 8
2.2.1 Gravação das vocalizações . . . 8
2.2.2 Análise das gravações . . . 9
2.3 Resultados e discussão . . . 9
2.4 Conclusão . . . 17
3 Viabilidade da gravação crônica da atividade extracelular de neurônios em saguis-comuns utilizando microeletrodos de aço inox . . . 19
3.1 Introdução . . . 19
3.2 Materiais e métodos . . . 20
3.2.1 Sujeitos . . . 20
3.2.2 Microeletrodos . . . 20
3.2.3 Implante dos microeletrodos . . . 20
3.2.4 Registro eletrofisiológico . . . 22
3.2.5 Análise de sinais . . . 22
3.3 Resultados e discussão . . . 23
3.4 Conclusão . . . 30
4 Caixa operante de baixo custo e personalizável utilizando *software* e *hardware* livres . . . 31
4.1 Introdução . . . 31
4.2 Materiais e métodos . . . 32
4.2.1 Caixa comportamental . . . 32
4.2.2 Barras retráteis . . . 34
4.2.3 Microcontrolador . . . 34
4.2.4 Sistema de som . . . 35
4.2.5 Sistema de entrega de recompensa . . . 36

4.2.6 Testes de acurácia 37
4.2.7 Interface gráfica 40
4.3 Estudo piloto 42
4.3.1 Sujeitos 42
4.3.2 Estímulos 43
4.3.3 Tarefa comportamental 44
4.4 Resultados 45
4.4.1 Análise de acurácia do sistema 45
4.4.2 Sistema de entrega de recompensa 48
4.4.3 Estudo piloto 49
4.5 Discussão 50
4.5.1 Conclusão 52
Conclusão 55

Referências 57

Anexos 67

Dedico esta dissertação a todos os seres sencientes que contribuíram para o sucesso desta empreitada, principalmente aos animais que foram utilizados nos experimentos. Em especial a Manu, que foi uma grande fonte de inspiração e foi quem me ofereceu esperanças de que este trabalho poderia ser bem-sucedido enquanto tudo parecia tão distante de seu fim.

Agradecimentos

Agradeço a todos que me ajudaram no decorrer destes dois anos para que este trabalho pudesse ser concluído com êxito. Começando pelo apoio recebido da profa. Dione para sair do caminho que me seria natural em busca de um sonho. Por toda a paciência necessária à profa. Mariana, que como orientadora teve que ensinar a um engenheiro as sutilezas necessárias para o manejo de animais silvestres e o ofício da escrita científica. E ao prof. Fabrício, que como coorientador ajudou com conselhos de engenharia para a montagem da caixa e com a estatística. E também ao prof. Edgard, por todo o apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço também toda a dedicação daqueles envolvidos com o bem-estar dos animais, a Valéria e o Alexandre. Coube ao Alexandre, além de preparar a comida e cuidar dos animais, a missão de dividir a cozinha comigo durante boa parte deste projeto.

Ao Philip, outro que teve que dividir espaço comigo, pois sempre baguncei sua sala e demandei muito de seu tempo para que as partes elétricas e mecânicas da caixa fossem fabricadas. Tenho que agradecê-lo ainda por todas as peças impressas em sua impressora 3D, que apesar de não terem sido utilizadas na versão final da caixa me fizeram ganhar muito tempo de estudo e horas de sono.

Agradeço a Juliani, Camila e Marcelo pelo imenso tempo despendido nas compras que eles fizeram para meus experimentos, uma ajuda tão valiosa e impensável na maior parte dos laboratórios que conheço.

Ao Denis, que me ajudou muito durante o primeiro ano de treinamento dos animais. E ao Firmino, que nos últimos 6 meses do projeto assumiu com maestria o treinamento dos animais, me possibilitando ter tempo para a elaboração deste manuscrito.

A todos os colegas de curso tenho que agradecer pela convivência enriquecedora, tanto do ponto de vista acadêmico quanto pessoal. Em especial a Camilona e Madé, que ouviram tantas angústias e lamentações durante este período, e a companheira de biotério, Kellyane.

A Lílian tenho que agradecer pela infinita paciência, amor e carinho durante nossa estadia em Natal. Também a Frida Kahlo, que entrou em nossas vidas e as encheu de pelos brancos. Por fim agradeço a meus pais, que me forneceram as condições necessárias para que eu pudesse alçar voos e sempre apoiaram minhas decisões.

"Proprietary software keeps users divided and helpless. Divided because each user is forbidden to redistribute it to others, and helpless because the users can't change it since they don't have the source code. They can't study what it really does. So the proprietary program is a system of unjust power."

Richard Stallman

Lista de ilustrações

Figura 1.1 – Sagui-comum 1
Figura 1.2 – Gráfico do número de publicações com saguis nos últimos anos 3
Figura 2.1 – Exemplos espectrogramas de vocalizações gravadas no biotério 10
Figura 2.2 – Exemplo de vocalizações extraídas das gravações feitas dentro da sala de experimento 11
Figura 2.3 – Comparação entre duas vocalizações do mesmo tipo gravadas no biotério e na sala de experimentos 11
Figura 2.4 – Sequência de extração dos parâmetros acústicos das amostras de vocalização Phee 13
Figura 2.5 – Sequência de extração dos parâmetros acústicos das amostras de vocalização Trill 14
Figura 2.6 – Comparações dos parâmetros dos Phees 15
Figura 2.7 – Comparações dos parâmetros dos Trills. 16
Figura 3.1 – Esquemático do local das matrizes e foto de uma matriz 21
Figura 3.2 – Número de unidades gravadas em cada animal (K e D) ao longo das semanas. 24
Figura 3.3 – Taxas de disparos neurais das unidades gravadas no decorrer do experimento. 26
Figura 3.4 – *Z-score* de um animal no decorrer do experimento. 27
Figura 3.5 – *Z-score* de um animal no decorrer do experimento. 28
Figura 3.6 – Amplitudes dos disparos neurais das unidades gravadas no decorrer do experimento. 29
Figura 3.7 – Formas de onda no decorrer das semanas 30
Figura 4.1 – Foto do aparato experimental completo 33
Figura 4.2 – Caixa comportamental 33
Figura 4.3 – Barras e saída de recompensa 34
Figura 4.4 – Esquema do circuito elétrico utilizado para tornar as barras sensíveis a toque 35
Figura 4.5 – Ligação do Arduino Mega e *Shield* 36
Figura 4.6 – *Shield* feito para ligação do *shield* de áudio e demais circuitos necessários para funcionamento da caixa. 37
Figura 4.7 – Sistema de recompensa 38
Figura 4.8 – Circuito elétrico do sistema de recompensa 39
Figura 4.9 – Interface Gráfica com Usuário 41
Figura 4.10 – Comparação entre os espectrogramas das vocalizações Trill e Phee gravadas e das criadas para o experimento 43

Figura 4.11–Histograma dos tempos decorridos entre o sinal direto recebido pelo equipamento de testes e o enviado pelo Arduino 46
Figura 4.12–Teste de gravação contínua do sinal com pulsos de 1 kHz 46
Figura 4.13–Exemplo de alteração da amplitude inicial do sinal para o teste de acurácia 47
Figura 4.14–Histograma dos tempos decorridos entre o envio do evento do áudio e o início de sua reprodução 48
Figura 4.15–Número de apertos por sessão de 30 min 49
Figura 4.16–Porcentagem de acertos por sessão de 30 min do animal M1 50
Figura 4.17–Porcentagem de acertos por sessão de 30 min do animal M2 51
Figura 4.18–Número de toques nas barras no *Prime Only* para animal M3 51
Figura 4.19–Porcentagem de acertos por sessão de 30 min do animal M3 52

Lista de tabelas

Tabela 3.1 – Coordenadas estereotáxicas da áreas-alvo de gravação. 21

1 Introdução

Este capítulo se inicia com uma descrição das principais características ecológicas e comportamentais dos saguis, seguida por um breve histórico do uso desta espécie como modelo animal em diversas áreas da biomedicina, com ênfase em estudos de Neurociências.

1.1 Aspectos gerais dos saguis-comuns

Os saguis-comuns *(Callithrix jacchus)* são pequenos primatas do Novo Mundo (Platyrrhines) originalmente encontrados no Nordeste do Brasil (RYLANDS *et al.*, 2009). Esses animais de pelagem cinza com detalhes castanhos e pretos são também conhecidos como saguis-de-tufo-branco, pois possuem tufos de pelos brancos em suas orelhas (Fig. 1.1).

Figura 1.1 – Sagui-comum

Fonte: Valéria Arboes

São animais onívoros, e boa parte de sua dieta é formada por goma extrudada de galhos de árvores, obtida graças a sua dentição especializada (COIMBRA-FILHO; MITTER-

MEIER, 1976; COIMBRA-FILHO; MITTERMEIER, 1977; GARBER, 1992). Além disso, eles se alimentam de frutos e pequenos animais, como insetos, pequenos pássaros e lagartos (STEVENSON; POOLE, 1976).

A família à qual pertence o sagui, a *Callithrichidae*, é conhecida por realizar diversas tarefas em cooperação, como a criação da prole, a vigilância cooperativa (KOENIG, 1994) e a coleta conjunta de grandes frutas (GARBER, 1997). A presença de múltiplas tarefas cooperativas ocorrendo simultaneamente na copa das árvores eleva a necessidade de coordenação entre os animais em um ambiente em que a visão é limitada. Essa limitação visual é contornada pela presença de uma comunicação vocal bastante desenvolvida (BURKART; FINKENWIRTH, 2015), caracterizada pela existência de um número elevado de tipos de vocalização, presentes tanto na natureza (BEZERRA; SOUTO, 2008) como em cativeiro (EPPLE, 1968).

Os saguis vivem em grupos de até 15 indivíduos, formados por adultos reprodutores e não reprodutores, jovens e infantes (MENDESPONTES; MONTEIRODACRUZ, 1995; KOENIG, 1995). Em geral, apenas à fêmea dominante é permitida a reprodução. A gestação dura 143-144 dias e normalmente produz gêmeos (TARDIF; SMUCNY, 2003). Todos os animais do grupo ajudam na tarefa da criação cooperativa da prole (ABBOTT *et al.*, 1997).

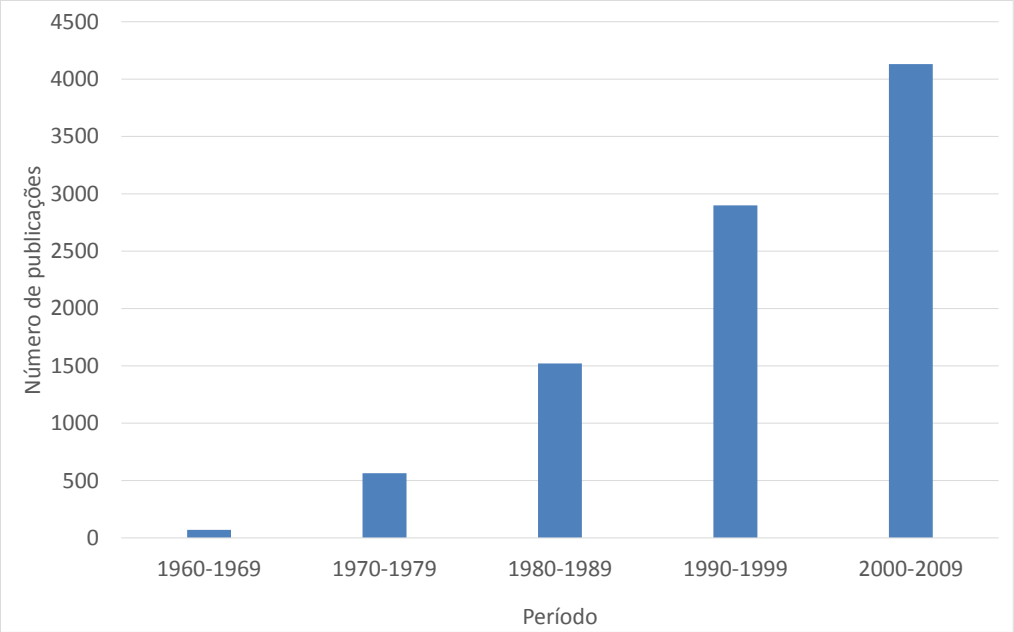
Outra fonte de comunicação social utilizada pelos saguis é a sinalização química. Eles possuem glândulas cutâneas que secretam ferormônios, localizadas no tórax logo abaixo do pescoço e na região circungenital (WISLOCKI, 1930). Os animais friccionam suas glândulas em galhos de árvores, liberando os ferormônios nesses locais (LAZARO-PEREA *et al.*, 1999). Essas sinalizações químicas podem apresentar um papel importante na demarcação de territórios, minimizando encontros possivelmente agressivos com outros grupos (GOSLING, 1982). Os animais conseguem, inclusive, diferenciar um indivíduo familiar e um desconhecido apenas pelo odor (SMITH, 2006). Além disso, os ferormônios liberados pela fêmea dominante induzem a supressão fisiológica da ovulação das fêmeas subordinadas (BARRETT *et al.*, 1990; ABBOTT *et al.*, 1997), e os animais podem reconhecer o estágio de ovulação de uma fêmea baseados apenas no seu odor (FERRIS *et al.*, 2004).

1.2 Os saguis como modelos animais

Os saguis estão sendo cada vez mais usados em estudos nas áreas da psicologia comparativa, neurociência cognitiva, biologia comportamental, etologia e medicina (YAMAZAKI; WATANABE, 2009). Tal aumento pode ser claramente observado pela comparação no número de artigos com saguis publicados nas últimas décadas (Fig. 1.2). Nesta seção, são apresentadas algumas razões para esse aumento.

Esses animais alcançam a maturidade sexual com 18 meses (ABBOTT; HEARN, 1978) e apresentam uma alta taxa de reprodução mesmo em cativeiro (TARDIF; SMUCNY, 2003), o que possibilita um rápido crescimento de colônias destinadas à pesquisa. Além disso, graças ao seu pequeno porte (250-400g) (ARAUJO *et al.*, 2000), os custos de manutenção com infraestrutura, alimentação e enriquecimento de viveiros e biotérios são muito menores do que os necessários para a criação de outros primatas não humanos normalmente usados em pesquisas nas áreas da biomedicina e neurociências, como os do gênero *Macaca* (ABBOTT *et al.*, 2003).

Figura 1.2 – Gráfico do número de publicações com saguis nos últimos anos



Fonte: produzido pelo autor com base no número total de citações envolvendo *C. jacchus* na Primate Lit Bibliographic Database for Primatology, desenvolvida e mantida pelo serviço de bibliotecas do Centro de Pesquisa com Primatas de Wisconsin, atualizado até 20 novembro, 2010 (acessado em 07/03/2015).

Mesmo pequenos, os saguis possuem fisiologia, genética e metabolismo mais similares aos dos humanos do que roedores, porcos e cachorros. Por esse motivo, esses animais tem sido muito utilizados como segunda espécie (a primeira em geral são os roedores) na verificação da segurança de novas drogas antes dos testes pré-clínicos em humanos (SMITH *et al.*, 2001).

Saguis também têm sido extensivamente utilizados no estudo de doenças infecciosas devido a sua sensibilidade a um grande número de vírus, bactérias e parasitas responsáveis por essas doenças em humanos (MANSFIELD, 2003). Seu uso como modelo animal para

doenças respiratórias é creditado à homologia com humanos não encontrada em modelos com roedores, principalmente na arquitetura do pulmão e seu padrão de ramificação (CURTHS *et al.*, 2014).

O sagui possui um cérebro relativamente grande (2.7% do seu peso corpóreo), proporcional ao dos humanos (2% do peso), e muito maior que o de ratos (0.5%) (ABBOTT *et al.*, 2003). Muitos aspectos da anatomia neural de primatas comumente utilizados em pesquisa, como os macacos rhesus, estão também presentes nos saguis, como córtex cerebral e cerebelo grandes e bem desenvolvidos (ABBOTT *et al.*, 2003). Essas características permitiram a criação de modelos para doenças neurodegenerativas como Parkinson (ESLAMBOLI, 2005), Alzheimer (BAKER *et al.*, 1993) e Huntington (KENDALL *et al.*, 1998). Para a doença de Parkinson, por exemplo, o sagui já foi utilizado para testar diferentes conjuntos de medicamentos e seus efeitos sobre a discinesia (MARATOS *et al.*, 2001; JACKSON *et al.*, 2007) e para teste de tratamento inovador utilizando estimulação da medula espinhal (SANTANA *et al.*, 2014).

Além disso, essa espécie possui diversas características comportamentais e cognitivas semelhantes às dos humanos, como um sistema de criação cooperativa da prole (BURKART *et al.*, 2009), alta dependência da comunicação vocal (EPPLE, 1968; BEZERRA; SOUTO, 2008; BURKART; FINKENWIRTH, 2015) e ações altruístas, como fornecer ativamente alimento a outro animal sem receber nada em troca (BURKART *et al.*, 2007). Além disso, como esses animais se mantêm muito comunicativos sob condições adequadas de criação em cativeiro, eles podem servir como um excelente modelo para estudos sobre o comportamento vocal e seus respectivos mecanismos neurais (WANG *et al.*, 2005).

Nos últimos anos foram elaboradas técnicas que permitiram o uso de saguis para a criação das primeiras linhas transgênicas de primatas não humanos (SASAKI *et al.*, 2009; OKANO *et al.*, 2012). Projetos em andamento, como o mapeamento genético dos saguis (WORLEY *et al.*, 2014) e o ambicioso objetivo de mapear o cérebro dessa espécie (OKANO; MITRA, 2014), indicam que a utilização dos saguis em diversas áreas, em especial nas neurociências, deve aumentar nos anos vindouros. A seguir, são apresentadas as principais características cognitivas desses animais e sua importância na área da neurociência cognitiva.

1.3 Capacidades cognitivas

Os saguis possuem capacidades cognitivas consideráveis, tanto no campo da cognição física, que lida com objetos inanimados e suas relações de causalidade espaçotemporal, quanto na cognição social, que lida com seres animados e suas ações intencionais, percepções e conhecimento (HUBER; VOELKL, 2009).

Esses animais utilizam mapas cognitivos para localizar comida e são capazes de representar objetos de maneira abstrata (HUBER; VOELKL, 2009). Diversos estudos sugerem que eles são capazes de representar mentalmente a existência e o movimento de objetos fora de seu campo de visão (MENDES; HUBER, 2004; CACCHIONE; BURKART, 2012), diferenciar quantidades (STEVENS *et al.*, 2007) e compreender relações espaciais complexas (HALSEY *et al.*, 2006). Além disso, apesar de não haver registros na natureza, esses animais também conseguem aprender a usar ferramentas para adquirir comida em cativeiro (YAMAZAKI *et al.*, 2011). Paradigmas clássicos de memória operacional e espacial também já foram testados em saguis, sendo possível treinar os animais para obter um desempenho bom e estável nesses testes (PEARCE *et al.*, 1998; SPINELLI *et al.*, 2004; TSUJIMOTO; SAWAGUCHI, 2002; CROFTS *et al.*, 1999). Como esses animais apresentam desempenho estável em variados testes cognitivos, eles podem ser utilizados em estudos que investiguem a evolução e o funcionamento de circuitos neurais responsáveis por essas habilidades cognitivas (ROBERTS *et al.*, 1992; MACLEAN *et al.*, 2001; BAREFOOT *et al.*, 2003; CLARKE, 2004; CLARKE *et al.*, 2011; NAKAKO *et al.*, 2013).

Acredita-se que a criação compartilhada da prole tenha surgido de maneira independente nos saguis e nos seres humanos, fazendo deles ótimos modelos animais para estudos sobre consequências psicológicas e cognitivas da criação cooperativa (BURKART; FINKENWIRTH, 2015). Diversos trabalhos também indicam que esses animais são capazes de se beneficiar de influências sociais que ajudam no aprendizado sobre alimentos desconhecidos e novas técnicas de forrageamento (BROWN *et al.*, 2004; HUBER; VOELKL, 2009). Outras formas de aprendizado social, como a imitação, também já foram relatadas em saguis, tanto em laboratório (BUGNYAR; HUBER, 1997) como na natureza (GUNHOLD *et al.*, 2014).

Até o momento, os mecanismos neurais responsáveis pelas capacidades cognitivas dos saguis, especialmente as sociais, são pouco conhecidos. Diversos estudos de registro eletrofisiológico com saguis anestesiados detalharam bastante a anatomia e a fisiologia do seu sistema visual, como por exemplo Rosa *et al.* (2009). Em recentes trabalhos com animais despertos, tendo sua cabeça fixada, demonstrou-se que é possivel utilizar técnicas como "*eye-tracking*" para verificar o deslocamento do olho ao observar figuras de paisagens e rostos, além de ser possível ensinar e avaliar os saguis em tarefas de controle da fixação e discriminação de padrões de orientação, o que indica que esses animais serão cada vez mais utilizados para estudos sobre o processamento visual (MITCHELL *et al.*, 2014), contribuindo para o entendimento de vários aspectos relacionados à percepção e representação de objetos no espaço.

A estrutura anatômica das vias envolvidas com processamento auditivo dos saguis também já foi descrita (AITKIN; PARK, 1993). Diversos estudos sugerem que as estruturas e funções do córtex auditivo são generalizáveis entre os primatas (BENDOR; WANG,

2006). Como os saguis se mantêm muito comunicativos em condições adequadas de criação em cativeiro, eles podem servir como um excelente modelo para estudos que visem investigar os mecanismos neurais envolvidos no comportamento vocal (WANG *et al.*, 2005). Até o momento, porém, as bases neurais da comunicação vocal em saguis são pouco conhecidas. Vários trabalhos investigaram o processamento passivo de vocalizações em saguis (p.ex. (WANG; KADIA, 2001; LU *et al.*, 2001; DECHARMS; MERZENICH, 1996; WANG *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2005; REMINGTON *et al.*, 2012). Esses estudos, no entanto, pouco informam sobre os mecanismos envolvidos na percepção vocal e como ela se relaciona à produção vocal.

1.4 Objetivos

Este trabalho insere-se dentro de uma linha de pesquisa que visa estudar as bases neurais da comunicação em saguis-comuns. Neste projeto foram desenvolvidas as técnicas e ferramentas necessárias para treinar saguis em uma tarefa de discriminação de sons parecidos com suas vocalizações. Os objetivos específicos foram separados em:

1. Coleta de exemplares de vocalizações espontâneas emitidas pelos saguis do biotério do Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra (IIN-ELS), para escolha de estímulos a serem utilizados na tarefa de discriminação auditiva.

2. Verificação da qualidade e estabilidade de registro eletrofisiológico crônico feito com microeletrodos de aço inoxidável implantados em diversas regiões do cérebro do sagui.

3. Construção de uma caixa de condicionamento operante para saguis, projetada para a tarefa de discriminação de estímulos auditivos.

1.5 Organização do documento

No capítulo 2 serão apresentados dados obtidos a partir da gravação de trocas de vocalizações entre os animais que vivem no biotério do IIN-ELS, comparando as estruturas das amostras gravadas com dados da literatura para verificação da semelhança dos dados coletados com os presentes em modelos de vocalizações virtuais. No terceiro capítulo serão abordados aspectos relativos à qualidade do sinal neural gravado em saguis não anestesiados e sem restrição de movimento no decorrer de 27 semanas. No quarto capítulo abordaremos nossa proposta de caixa operante para saguis.

2 Gravação de vocalizações

2.1 Introdução

Os saguis possuem um vasto repertório vocal, produzindo pelo menos 13 tipos diferentes de chamados (BEZERRA; SOUTO, 2008). Cada tipo é emitido em contextos sociais específicos e está associado a determinados comportamentos. Os chamados de contato, por exemplo, são usados para monitorar a localização dos membros de um grupo, ajudando a manter a coesão entre os indivíduos. Chamados de alarme ou alerta são emitidos quando conspecíficos de outro grupo ou potenciais predadores são avistados. Outros tipos de chamado são emitidos durante interações sociais específicas entre membros de um grupo, como durante comportamentos afiliativos (EPPLE, 1968; BEZERRA; SOUTO, 2008). Na natureza, as vocalizações de contato Twitter, Trill e Phee são as mais pronunciadas em momentos de descanso, seja este solitário ou em grupo (BEZERRA; SOUTO, 2008). Estudos realizados em cativeiro mostram ainda que em geral essas três vocalizações, somadas com uma vocalização denominada de Trillphee, correspondem a cerca de 75% das vocalizações emitidas pelos animais (DIMATTINA; WANG, 2006).

O Twitter (Fig.2.1c) é caracterizado por uma série de pequenas sílabas (EPPLE, 1968; BEZERRA; SOUTO, 2008) ou frases (DIMATTINA; WANG, 2006) de curta duração, com larga variação para cima da modulação da frequência, separadas por pequenos intervalos (0,10-0,15s). É uma vocalização utilizada em situações de estresse e de descanso, tanto solitário quanto comunitário (BEZERRA; SOUTO, 2008).

O Phee (Fig.2.1a) é observado em diversas situações, sendo mais conhecido por ser um chamado de isolamento (EPPLE, 1968). Ele pode ser pronunciado uma única vez ou em séries de até 5 sílabas (ou frases), tendo uma pequena variação em sua frequência, que fica ao redor de 7kHz, e uma maior variação na modulação de sua amplitude de uma pronúncia para outra (EPPLE, 1968; DIMATTINA; WANG, 2006; BEZERRA; SOUTO, 2008).

Já o Trill (2.1b) é uma vocalização pronunciada com baixa intensidade, às vezes descrita como uma vocalização realizada com a boca quase fechada. Possui também uma frequência central por volta dos 7kHz, mas apresenta uma certa modulação ao redor desta frequência central. Sua característica peculiar ao ouvido humano é a grande semelhança com um cantar de pássaros (EPPLE, 1968; DIMATTINA; WANG, 2006; BEZERRA; SOUTO, 2008). Esta vocalização é frequentemente utilizada durante a procura por comida e em descanso, tanto solitário quanto social (BEZERRA; SOUTO, 2008).

Por fim, o Trillphee (Fig.2.1d) é uma vocalização que começa como um Trill e se transforma em um Phee. As características de duração e intensidade da pronúncia são as mesmas de um Phee. A transição em geral ocorre nos 60% iniciais do chamado (DIMATTINA; WANG, 2006).

Vocalizações de saguis-comuns são estímulos complexos. Existem, inclusive, diferenças na estrutura de um mesmo chamado emitido por indivíduos diferentes. Essas diferenças podem sinalizar a identidade do indivíduo que emite o chamado (JONES *et al.*, 1993). É desafiador, portanto, determinar quais propriedades acústicas de cada chamado evocam respostas neurais auditivas no indivíduo receptor, e quais parâmetros são necessários para a sua discriminação e categorização.

Para contornar tais limitações, foram elaborados modelos computacionais, denominados vocalizações virtuais, a partir da extração de parâmetros acústicos das vocalizações Twitter, Phee e Trillphee de 8 indivíduos (DIMATTINA; WANG, 2006). Esses modelos permitem a manipulação de diversos parâmetros relacionados a cada tipo de vocalização, para gerar diversas vocalizações sem a presença dos ruídos normalmente encontrados nas gravações. Com base nestes modelos se poderia, por exemplo, criar um paradigma experimental no qual se realiza o registro eletrofisiológico simultâneo de diversas regiões cerebrais dos saguis enquanto eles realizam uma tarefa de discriminação de Phees e Trills virtuais, que, além de serem das vocalizações mais trocadas entre esses animais, ainda possuem uma estrutura física semelhante de faixa estreita ao redor de uma frequência central.

É possível, no entanto, que exista uma variação intraespecífica desses chamados. Nesse caso, os parâmetros utilizados nas vocalizações virtuais podem ser representativos do grupo estudado, mas não da espécie. Portanto, para que esse modelo possa ser amplamente utilizado em estudos de neurofisiologia em saguis, é necessário verificar se os parâmetros acústicos estão dentro da variação natural que ocorre em diferentes grupos de saguis.

Neste trabalho, foram gravadas vocalizações emitidas pelos saguis presentes no biotério do Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra (IIN-ELS). A partir dessas gravações, foram retiradas cerca de 50 amostras de Trills e Phees que poderão ser utilizadas como estímulos em estudos futuros de eletrofisiologia e comunicação social. Além disso, a estrutura desses Phees e Trills foram comparadas aos parâmetros utilizados no modelo de vocalização virtual para esses chamados (DIMATTINA; WANG, 2006).

2.2 Materiais e métodos

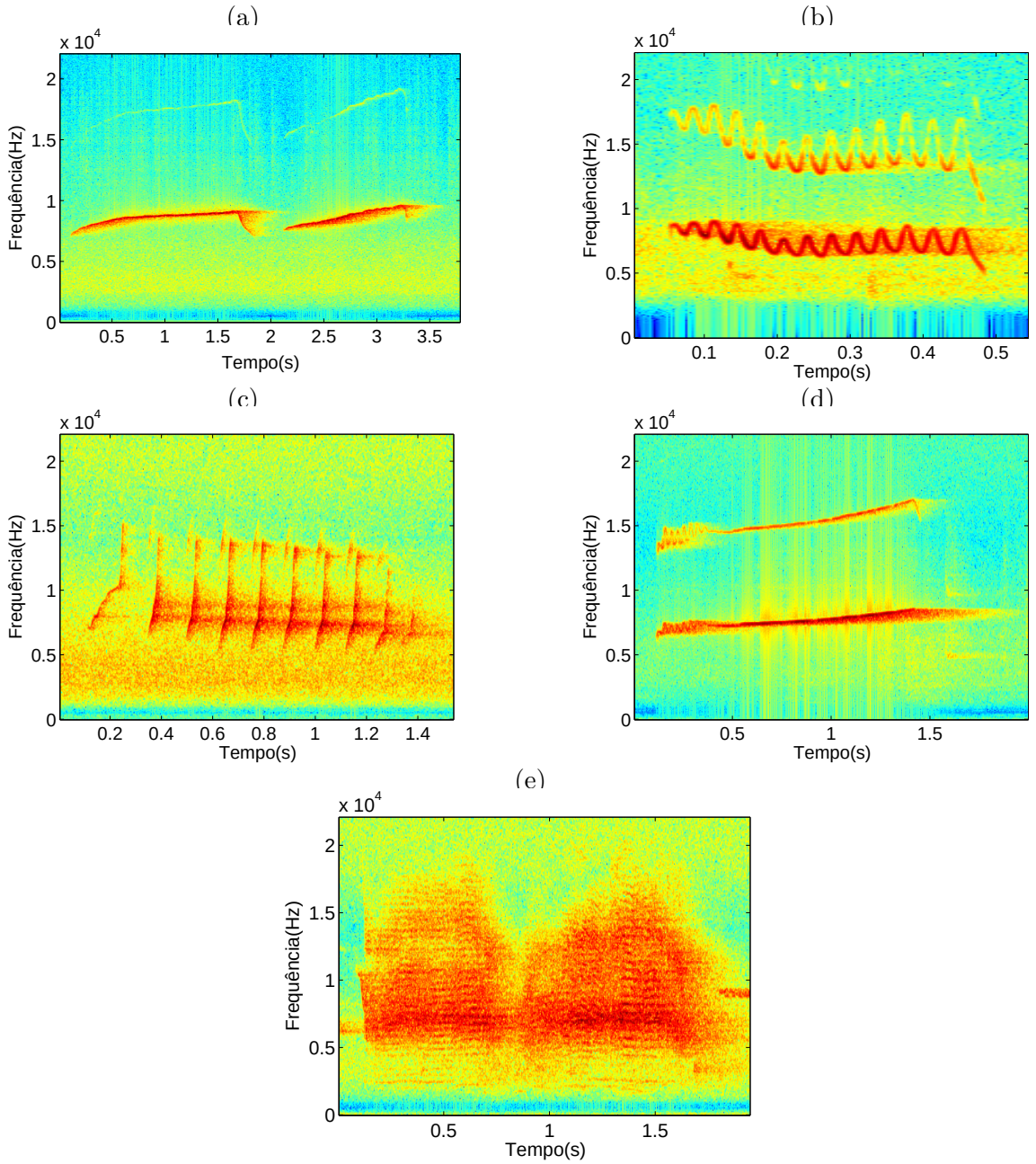
2.2.1 Gravação das vocalizações

As vocalizações espontâneas de diversos saguis foram gravadas durante um mês (19/02/2014 a 12/03/2014) dentro do biotério do IIN-ELS. Este biotério é aberto, com ciclo de luz natural e temperatura ambiente, e possui 22 gaiolas (1 m x 1 m x 1,1 m) com proteção contra chuva e luz solar direta. Em cada gaiola estão alojados entre 1 e 3 animais. Os animais não sofreram nenhum tipo de restrição alimentar ou de água durante o período dos experimentos. As gravações foram feitas durante o dia. No início de cada sessão de gravação, um microfone direcional (K6, Senheiser) foi posicionado em um tripé com uma parábola (Universal Telinga, Telinga), a cerca de 20 cm de uma das gaiolas do biotério, e a cada 2 horas ele era reposicionado a 20 cm de outra gaiola. O microfone foi conectado a um pré-amplificador (4x4 Mobile USB Audio/Midi, M-Audio). O sinal captado foi gravado através do programa Fast Track Pro (M-Audio) e amostrado a 44100 Hz. Esse mesmo aparato de aquisição de dados foi utilizado para gravar vocalizações espontâneas de animais durante a realização de experimentos em campo aberto e durante procedimentos veterinários. Todos os procedimentos foram previamente aprovadas pelo comitê de ética para uso de animais da Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (protocolo 03/2013).

2.2.2 Análise das gravações

As análises foram realizadas com auxílio do programa XBAT v7 (Cornell Lab. of Ornithology). As amostras de som gravadas foram submetidas a um tratamento de filtro passa-baixa butterworth 3kHz, avaliadas com base no aspecto visual de seu espectrograma e na audição do sinal gravado e comparadas com os dados presentes na literatura (EPPLE, 1968; BEZERRA; SOUTO, 2008; DIMATTINA; WANG, 2006) para serem caracterizadas por tipo. O espectrograma é um gráfico que apresenta a intensidade por meio do escurecimento do traçado, com as faixas de frequência no eixo vertical e o tempo no eixo horizontal. As amostras selecionadas foram aquelas em que não havia sobreposição entre duas ou mais vocalizações nem ruídos de fundo que atrapalhassem sua identificação auditiva pelo pesquisador ou que causassem distorções em seu espectrograma. Os tamanhos da janela de análise das frequências, sua sobreposição e o filtro utilizados foram idênticos aos utilizados por DiMattina e Wang (2006), para permitir uma comparação mais fidedigna entre os sinais.

Figura 2.1 – Exemplos espectrogramas de vocalizações gravadas no biotério

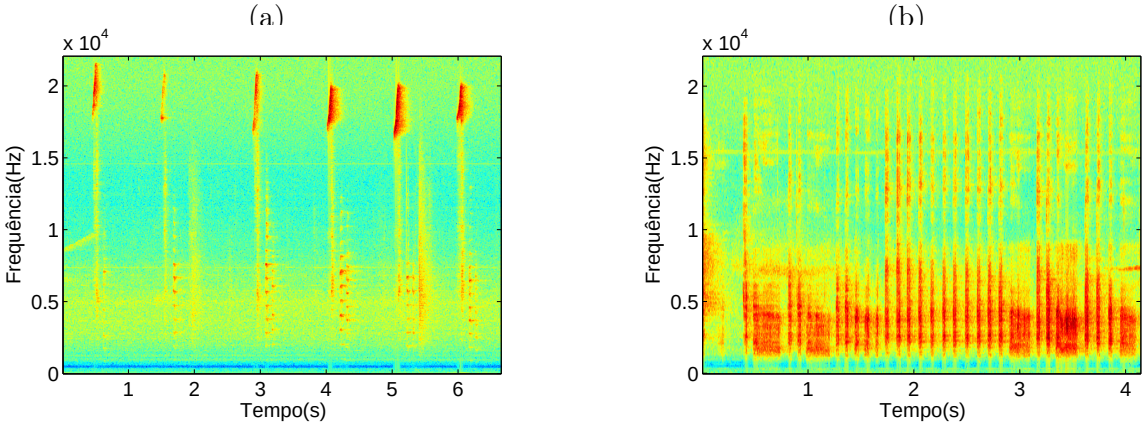


Espectrogramas de vocalizações gravadas no biotério. No eixo vertical encontram-se as frequências, no eixo horizontal o tempo decorrido. A intensidade de cada frequência para cada janela de tempo analisada é representada de acordo com as cores em que se apresentam, indo das cores frias para as quentes conforme o aumento da intensidade. Assim, o azul indica as menores intensidades, e o vermelho as maiores. Fig. 2.1b Trill, Fig. 2.1a Phee, Fig. 2.1c Twitter, Fig. 2.1d Trillphee e Fig. 2.1e Chamado de filhote. Fonte: o autor

2.3 Resultados e discussão

No total, foram realizadas 20 horas de gravações espontâneas no biotério. Durante esse período, diversos chamados, todos já descritos na literatura, foram registrados. A Fig. 2.1 mostra alguns exemplos dessas vocalizações. Foram também realizados 51 registros durante procedimentos experimentais e veterinários, totalizando 4,5 horas de gravação (exemplos na Fig. 2.2).

Figura 2.2 – Exemplo de vocalizações extraídas das gravações feitas dentro da sala de experimento



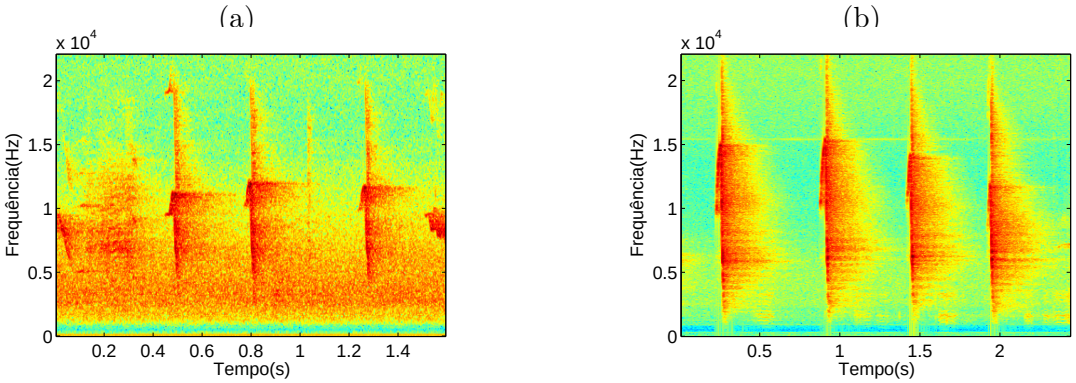
Espectrogramas de vocalizações gravadas no biotério. No eixo vertical encontram-se as frequências, no eixo horizontal o tempo decorrido. A intensidade de cada frequência para cada janela de tempo analisada é representada de acordo com as cores em que se apresentam, indo das cores frias para as quentes conforme o aumento da intensidade. Assim, o azul indica as menores intensidades, e o vermelho as maiores. A Fig. 2.2a mostra uma vocalização denominada Egg, e a Fig. 2.2b uma vocalização Chatter, sendo ambas emitidas em situações de estresse moderado (EPPLE, 1968; BEZERRA; SOUTO, 2008). Fonte: o autor

Foi encontrada uma grande variedade de vocalizações nas gravações feitas no biotério (exemplos na Fig. 2.1). Muitas vezes, no entanto, as vocalizações continham muito ruído ou eram muito baixas para serem utilizadas para reprodução em algum estudo com *playback*. Já as gravações feitas fora do biotério apresentam menor incidência de ruídos e menores sobreposições com outras vocalizações (Fig. 2.3), o que as torna melhores para possíveis utilizações em reprodução para algum estudo posterior. Fora do biotério, no entanto, foram encontradas apenas as vocalizações Phee, Twitter e vocalizações de estresse. Apesar da menor variedade nas gravações feitas fora do biotério a menor quantidde de ruídos permitiu o isolamento de algumas vocalizações de estresse que não puderam ser isoladas nas gravações feitas dentro do biotério, como o Chatter (Fig. 2.2b). Além disso, as gravações na sala de experimentos foram feitas na presença de um único animal por sessão, o que permitiu a obtenção de um conjunto

de vocalizações emitidas por um determinado animal. Esses dois métodos foram, portanto, utilizados de forma combinada para aumentar o repertório de vocalizações coletadas.

Para verificar a semelhança entre os parâmetros da estrutura sonora usada no modelo de vocalizações virtuais e os das vocalizações coletadas no nosso centro de pesquisa, comparamos os dados de 46 Trills e 48 Phees que não apresentavam interferências de outras vocalizações ou grandes ruídos com os dados fornecidos por DiMattina e Wang (2006). Nas amostras de vocalizações Phee, foi feita uma Transformada Rápida de Fourier (FFT, na sigla em inglês), com 1024 pontos de janela e sobreposição de 3/4 (Fig. 2.4a). A partir dessa FFT, foi extraída, a cada intervalo de tempo, a frequência que apresentava a maior potência, como pode ser visto na linha preta da Fig. 2.4b. Após a obtenção da estrutura da primeira harmônica dessas vocalizações obteve-se o valor médio das frequências (Fc) e a duração das vocalizações (Fig. 2.4). Processo semelhante foi utilizado nas vocalizações Trill, com uma FFT de janela de 512 pontos e sobreposição de 3/4 (Fig. 2.5a), extração da fundamental como a frequência com maior potência em cada instante de tempo (Fig. 2.5c) e obtenção dos parâmetros de duração e tempo desta estrutura (Fig. 2.5). O sinal da fundamental foi dividido então em um sinal de variação lenta, obtido a partir da aplicação de um filtro passa-baixa de 10 Hz (Fig. 2.5d), e um sinal de modulação ao redor dele, que foi obtido pela subtração do sinal lento do sinal original (Fig. 2.5e). A partir do valor médio das frequências de modula-

Figura 2.3 – Comparação entre duas vocalizações do mesmo tipo gravadas no biotério e na sala de experimentos

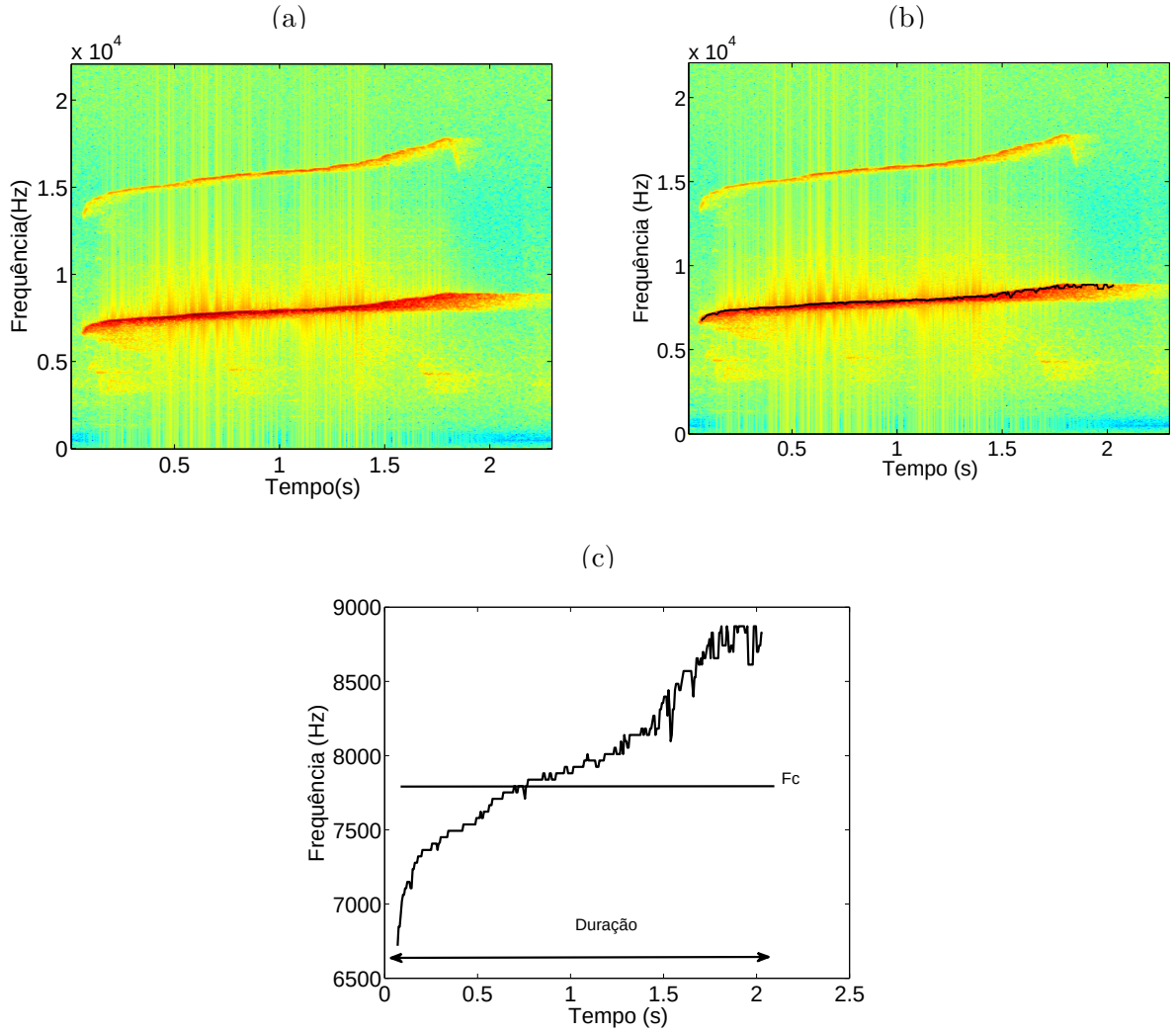


Espectrogramas de vocalizações gravadas no biotério. No eixo vertical encontram-se as frequências, no eixo horizontal o tempo decorrido. A intensidade de cada frequência para cada janela de tempo analisada é representada de acordo com as cores em que se apresentam, indo das cores frias para as quentes conforme o aumento da intensidade. Assim, o azul indica as menores intensidades, e o vermelho as maiores. A Fig. 2.3a é uma vocalização Tsik gravada no biotério, e a Fig. 2.3b é um Tsik gravado dentro da sala de experimentos. É possível verificar que o espectrograma da Fig. 2.3b apresenta a uma região de maior potência (em vermelho), referente a vocalização, mais concentrada do que a Fig. 2.3a. Fonte: o autor

ção desse sinal de variação rápida (Fig. 2.5f), foi obtido o valor da frequência da modulação (fmod) da vocalização Trill ao redor do sinal de variação lenta. O teste t de Student foi usado para comparar os dados obtidos aos utilizados no modelo de vocalizações virtuais (Fig. 2.6 e Fig. 2.7). É importante frisar que os tamanhos da janela da FFT, sua sobreposição e o filtro utilizados foram idênticos aos utilizados por DiMattina e Wang (2006), para permitir uma comparação mais fidedigna entre os sinais.

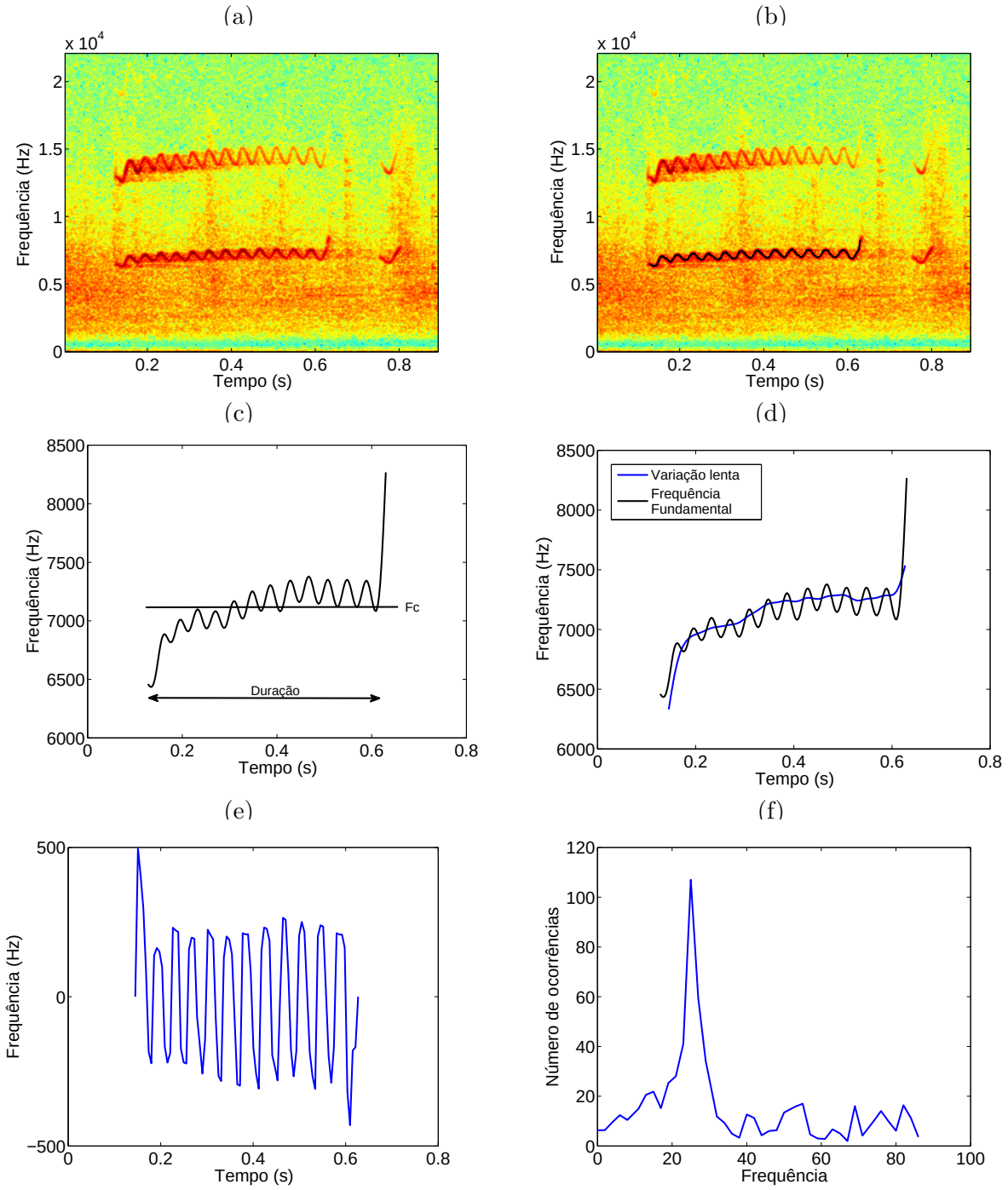
A comparação dos parâmetros acústicos do Trill e Phee indicou diferenças significativas entre os dados obtidos e os utilizados no modelo de vocalizações virtuais. Especificamente, foram encontradas diferenças na duração [$t(113) = 2.03$; $p < .001$] (Fig. 2.7a), na Fc [$t(1044) = 4.47$; $p = .045$] (Fig. 2.7b), e na modulação [$t(260) = 8.38$; $p < .001$] (Fig.2.7c) dos Trills. Além disso, foram encontradas diferenças na Fc [$t(1550) = 8.25$; $p < .001$] dos Phees (Fig.2.6b). A duração dos Phees foi o único parâmetro acústico que não variou significativamente entre os grupos analisados [$t(49) = 0.25$; $p = .80$](Fig.2.6a). Portanto, os parâmetros acústicos dos Phees e Trills emitidos pelos saguis do IIN-ELS diferem dos utilizados no modelo de vocalizações virtuais (DIMATTINA; WANG, 2006).

Figura 2.4 – Sequência de extração dos parâmetros acústicos das amostras de vocalização Phee



Na Fig. 2.4a há um exemplo de amostra de Phee presente nas vocalizações gravadas. A linha preta na Fig. 2.4b representa o sinal de maior potência em cada janela daquela FFT. Na Fig. 2.4c os parâmetros Frequência central (Fc) e Duração são explicitados. Fonte: o autor

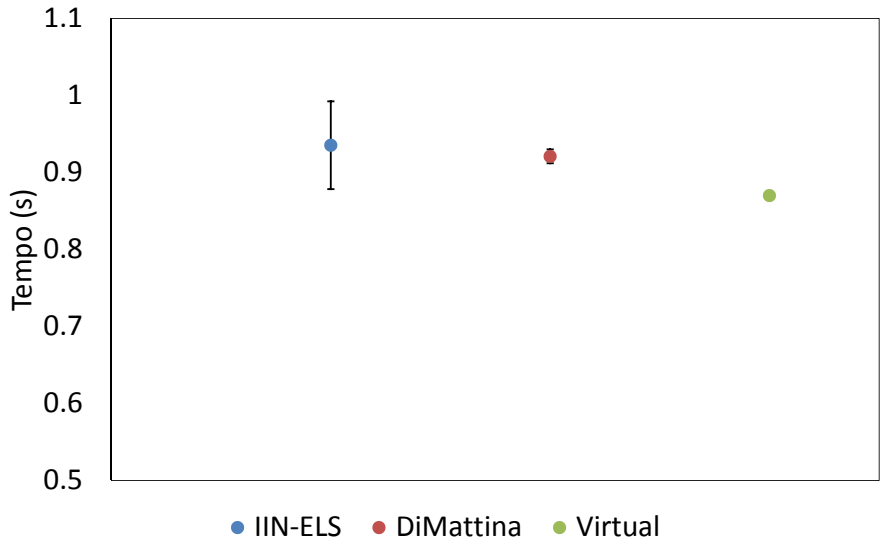
Figura 2.5 – Sequência de extração dos parâmetros acústicos das amostras de vocalização Trill



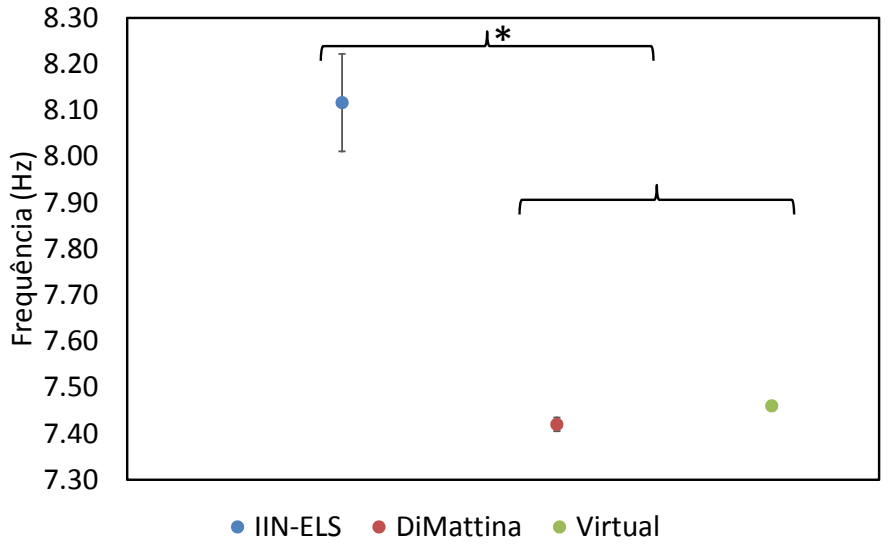
Na Fig. 2.5a há um exemplo de amostra de Trill presente nas vocalizações gravadas. A linha preta na Fig. 2.5b representa o sinal de maior potência em cada janela daquela FFT. Na Fig. 2.5c os parâmetros Frequência central (Fc) e Duração são explicitados. A Fig. 2.5d mostra em azul o sinal de variação lenta extraído do sinal obtido na Fig. 2.5a. Na Fig. 2.5e encontra-se o sinal de variação rápida do sinal obtido na Fig. 2.5a e na Fig. 2.5f a FFT do sinal de variação rápida. Fonte: o autor

Figura 2.6 – Comparações dos parâmetros dos Phees

(a)



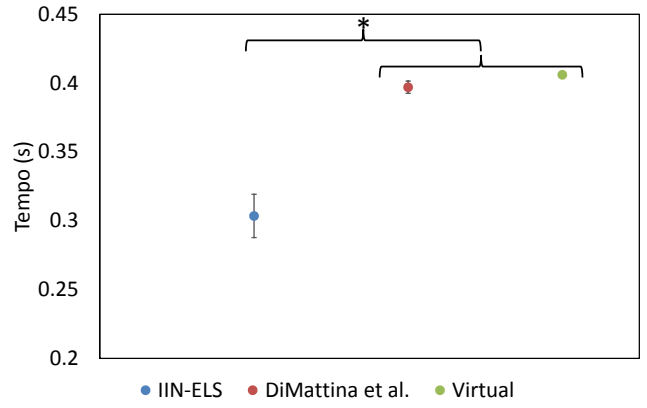
(b)



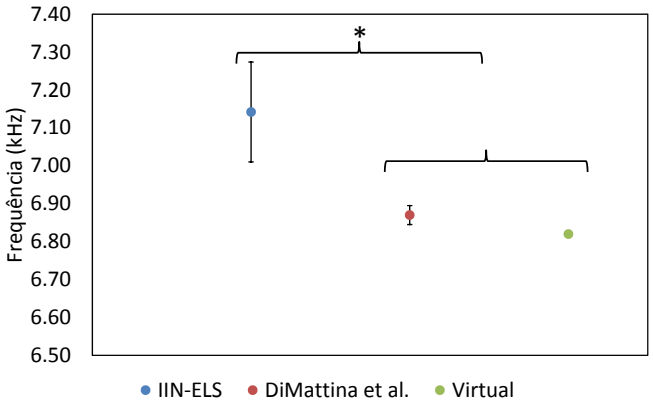
Comparação entre a duração (2.6a), a frequência central média (2.6b) dos Phees coletados no IIN-ELS, dos coletados por DiMattina e Wang (2006) e do modelo de vocalização virtual por eles proposto. As barras indicam o erro padrão. *($p<.05$). Fonte: o autor

Figura 2.7 – Comparações dos parâmetros dos Trills.

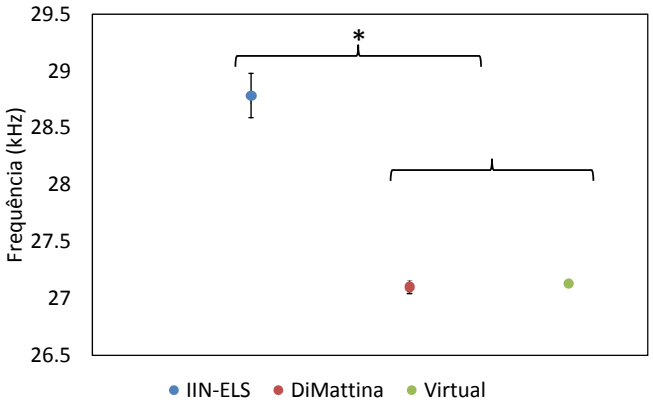
(a)



(b)



(c)



Comparação entre a duração (2.7a), a frequência central média (2.7b) e a frequência de modulação (2.7c) dos Trills coletados no IIN-ELS, dos coletados por DiMattina e Wang (2006) e do modelo de vocalização virtual por eles proposto. As barras indicam o erro padrão. *($p<.05$). Fonte: o autor

2.4 Conclusão

Neste estudo foram realizadas gravações de vocalizações emitidas por saguis dentro do biotério de primatas do IIN-ELS e durante procedimentos experimentais e veterinários visando principalmente à extração de amostras representativas de vocalizações Phee e Trill para obtenção de parâmetros físicos dessas vocalizações. As amostras obtidas poderão ser usadas em estudos futuros que investiguem o processamento de sinais auditivos naturais e complexos e os mecanismos neurais envolvidos na comunicação vocal.

Além disso, modelos virtuais dessas vocalizações poderão ser utilizados para criar amostras de som com menor ruído e maior controle da variabilidade de seus parâmetros acústicos, facilitando o estudo dos principais aspectos representativos desses estímulos complexos. Para isso, alguns parâmetros utilizados no modelo virtual proposto por DiMattina e Wang (2006) deverão ser ajustados de acordo com os parâmetros encontrados nas gravações feitas no biotério do IIN-ELS.

3 Viabilidade da gravação crônica da atividade extracelular de neurônios em saguis-comuns utilizando microeletrodos de aço inox

3.1 Introdução

A aquisição de sinais neurais pode ocorrer tanto através de métodos invasivos quanto de métodos não invasivos. As técnicas não invasivas, como o eletroencefalograma (EEG), são capazes de capturar o sinal neural por fora do crânio e, portanto, podem ser facilmente utilizadas em qualquer sujeito, não necessitando de cirurgias. Estes sinais refletem a soma da atividade de diversos neurônios, apresentando uma resolução temporal relativamente alta, mas uma baixa resolução espacial (GERVEN *et al.*, 2009). Além disso, essas técnicas permitem o estudo da atividade elétrica da superfície cortical, mas não de núcleos cerebrais profundos. As técnicas invasivas, como os implantes de eletrodos, por outro lado, permitem a gravação da atividade de neurônios únicos com grande resolução espacial e temporal (WALDERT *et al.*, 2009). A gravação de sinais neurais de múltiplos neurônios presentes em diversas áreas corticais e subcorticais é fundamental para a obtenção de modelos realísticos do funcionamento das redes neurais envolvidas em determinado comportamento (NICOLELIS; RIBEIRO, 2002). Por esse motivo, estudos de eletrofisiologia em animais normalmente utilizam técnicas de registro invasivas. Muitos destes estudos, no entanto, restringem o movimento dos animais durante o registro eletrofisiológico para diminuir o ruído e melhorar a captação do sinal neural. A restrição, no entanto, pode influenciar o comportamento e desempenho dos animais em diversas tarefas. Já foi demonstrado, por exemplo, que a restrição de movimentos altera o comportamento vocal de saguis (ELIADES; WANG, 2008a). Por esses motivos, estudos eletrofisiológicos envolvendo cognição social e comunicação vocal em saguis devem, preferencialmente, ser realizados em animais livres, sem restrição de movimentos.

Outro desafio no desenvolvimento das técnicas invasivas é a busca por eletrodos que proporcionem amostragens por longos períodos. Estudos anteriores mostraram que, em geral, após poucos meses a qualidade do sinal decai consideravelmente e eventualmente cessa por completo (HOOGERWERF; WISE, 1994; TURNER *et al.*, 1999; ROUSCHE; NORMANN, 1998). Este decaimento pode ocorrer devido a fatores abióticos, como corrosão do eletrodo (PRASAD *et al.*, 2014; SANKAR *et al.*, 2014), ou devido a interação entre o tecido cerebral e os eletrodos. Foi demonstrado que, por exemplo, ocorre uma resposta inflamatória após o

implante no tecido que circunda os eletrodos, que resulta em seu encapsulamento progressivo (PRASAD *et al.*, 2014; BIRAN *et al.*, 2005; GRIFFITH; HUMPHREY, 2006). Diferentes tipos de eletrodos podem interagir de diferentes maneiras com o tecido cerebral, levando a diferenças na qualidade do sinal gravado por longos períodos de tempo.

A completa caracterização do sinal e da estabilidade de diferentes tipos de eletrodos ao longo do tempo é, portanto, essencial para o futuro desenvolvimento de microeletrodos duradouros. Até o momento, a maior parte dos dados provêm de estudos com roedores (PRASAD *et al.*, 2014; PRASAD *et al.*, 2012; FREIRE *et al.*, 2011), e não existem trabalhos que façam essa avaliação especificamente em saguis. O objetivo deste trabalho foi, portanto, investigar a viabilidade do uso de microeletrodos de aço para o registro crônico simultâneo de diversas regiões corticais e subcorticais do sagui. Essa avaliação foi feita pela caracterização e comparação do sinal neuronal registrado em 2 saguis-comuns ao longo de 27 semanas após o implante bilateral de matrizes de microeletrodos de aço.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Sujeitos

Dois saguis machos (350-450 g) foram utilizados neste estudo. Cada animal foi mantido em uma gaiola (1 m x 1 m x 1,1 m) de um biotério aberto, com ciclo de luz natural e temperatura ambiente. As gaiolas deste biotério possuem uma cobertura para proteção contra chuva e luz solar direta. Os animais não sofreram nenhum tipo de restrição alimentar ou de água durante o período dos experimentos. Foram disponibilizadas duas refeições diárias (8:00 e 15:00), compostas por ração, goma arábica, larva de tenébrio *(Tenebrio molitor)*, carnes, laticínios, ovos, tubérculos, grãos, verduras e frutas, além de acesso *ad libitum* à água. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo comitê de ética para utilização de animais da Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (Protocolo 08/2011).

3.2.2 Microeletrodos

Em cada animal, 2 matrizes de microeletrodos com 27 canais de registro foram implantadas simetricamente, uma em cada hemisfério. Cada matriz foi projetada para atingir simultaneamente 6 áreas do cérebro do animal: Cortéx Motor Primário (M1), Putamen (PUT), Córtex Somatossensorial Primário (S1), Núcleo Talâmico Ventrolateral (VL), Núcleo Talâmico Ventroposterior Lateral (VPL) e Núcleo Subtalâmico (STN) (Fig. 3.1, tabela 3.1). Essas matrizes eram compostas por fios de aço inoxidável (50 μm de diâmetro) com um espaçamento mínimo de 300 μm entre eles.

Figura 3.1 – Esquemático do local das matrizes e foto de uma matriz

(a) (b)

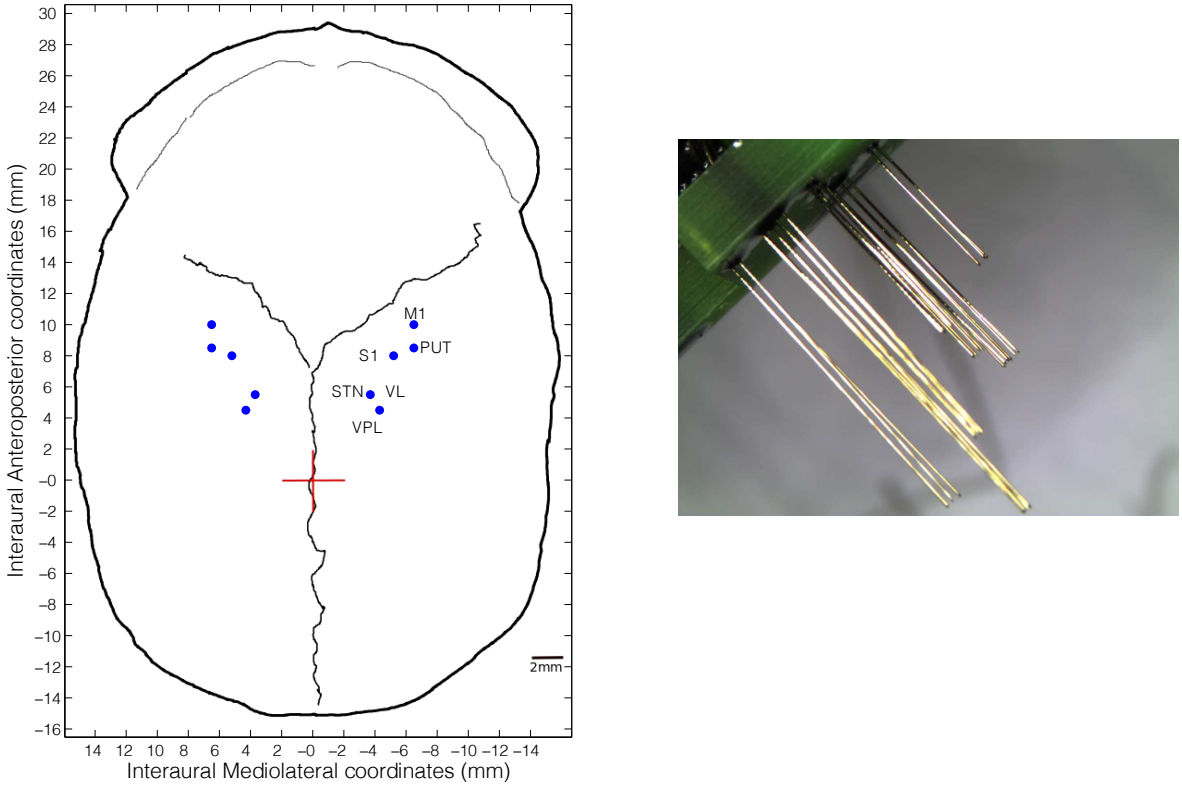


Fig. 3.1a Desenho esquemático do crânio do sagui (visão superior) com as coordenadas anteroposterior (AP) e mediolateral (ML) das áreas-alvo (mostradas em azul). Fig. 3.1b Exemplo de uma matriz de microeletrodos. Grupos de eletrodos (fios de aço) com comprimentos e localizações distintos foram projetados para atingir diferentes regiões cerebrais. Fonte da Fig. 3.1a: o autor. Fonte da Fig. 3.1b: Maxwell Santana

Tabela 3.1 – Coordenadas estereotáxicas da áreas-alvo de gravação.

Área	AP (mm)	ML (mm)	DV(mm)
M1	10,0	6,5	14,4
PUT	8,5	6,5	11,5
S1	8,0	5,2	15,6
VL	5,5	3,7	10,0
VPL	4,5	3,7	7,3
STN	5,5	3,7	7,3

As coordenadas anteroposterior (AP) e mediolateral (ML) estão em relação à linha interaural e a dorsoventral(DV) é a profundidade em relação ao topo do crânio.

3.2.3 Implante dos microeletrodos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em animais profundamente anestesiados. A anestesia foi induzida com cloridrato de cetamina (10-20 mg/kg) e mantida por isoflurano (1,5 - 5%, 1 - 1,5 L/min O2). Os saguis foram posicionados em um aparelho estereotáxico, e uma incisão foi feita na parte medial da cabeça para expor o crânio. Pequenos orifícios foram feitos no crânio, onde parafusos foram inseridos para suporte mecânico e aterramento dos eletrodos. Craniotomias foram então feitas sobre as regiões-alvo (Tabela 1). A dura-mater foi cuidadosamente removida, e as matrizes foram lentamente inseridas, para minimizar sangramentos e danos ao tecido cerebral. Acrílico dental foi usado para fixar os eletrodos aos parafusos e ao crânio.

3.2.4 Registro eletrofisiológico

As sessões de registro eletrofisiológico começaram a ser feitas uma semana após a cirurgia de implante das matrizes. Os registros foram feitos por 27 semanas e foram realizados com os animais acordados e se movendo livremente em um campo aberto (45 x 45 x 45 cm).

No início de cada sessão de registro, os animais foram anestesiados (isoflurano a 5%), e as matrizes de eletrodos foram conectadas a um sistema de aquisição de dados neurais, o Omniplex® (Plexon Inc., Texas, EUA). Esse sistema permite registrar, simultaneamente e em cada eletrodo, potenciais de campo local e potenciais de ação. Para a obtenção dos potenciais de ação, o sinal obtido em cada eletrodo foi amplificado (100x), filtrado com um filtro passa-altas de 600 Hz e digitalizado a 40 kHz em períodos de 0,8 ms ao redor de eventos que passaram de um limiar estabelecido pelo pesquisador. Durante o registro (on-line), unidades neurais com uma relação de sinal-ruído acima de 2,5 foram identificadas e classificadas. Essa seleção foi posteriormente validada por análises off-line (Offline Sorter v3.3.2, Plexon Inc., Texas, EUA), de acordo com dois critérios principais: estereótipo das formas de onda (determinado por um modelo de forma de onda média e análise de componentes principais) e intervalo entre os disparos dos potenciais de ação dos neurônios (*spikes*) ($<$ 0,1% de disparos em intervalos menores que 1 ms).

3.2.5 Análise de sinais

A qualidade do sinal eletrofisiológico registrado e sua consistência ao longo das semanas de registro foram avaliadas através da comparação do sinal obtido nas sessões de registro feitas nas 1ª, 4ª, 14ª e 27ª semanas após o implante dos microeletrodos. Foram usadas 3 medidas de comparação: número total de unidades registradas em cada sessão, taxa média de disparos e amplitude pico a pico de cada unidade. A taxa média de disparos dos potenciais

de ação (*spikes*/s) de cada neurônio foi obtida através da divisão do número de disparos pelo tempo total da sessão de gravação. A amplitude pico a pico foi determinada como a diferença entre o maior e o menor valor encontrado para a forma de onda representativa (média) de cada unidade. O teste de Friedman foi usado para comparar a taxa de disparos e a amplitude das unidades registradas ao longo das semanas. As análises estatísticas foram realizadas para cada área cerebral em que foram gravados ao menos 3 neurônios em pelo menos 3 períodos analisados. O critério de significância foi estabelecido em $p < .05$. Foi realizada uma análise *post hoc* nos resultados das análises através do teste de Wilcoxon com uma correção de Bonferroni, resultando num nível de significância de $p < .0083$.

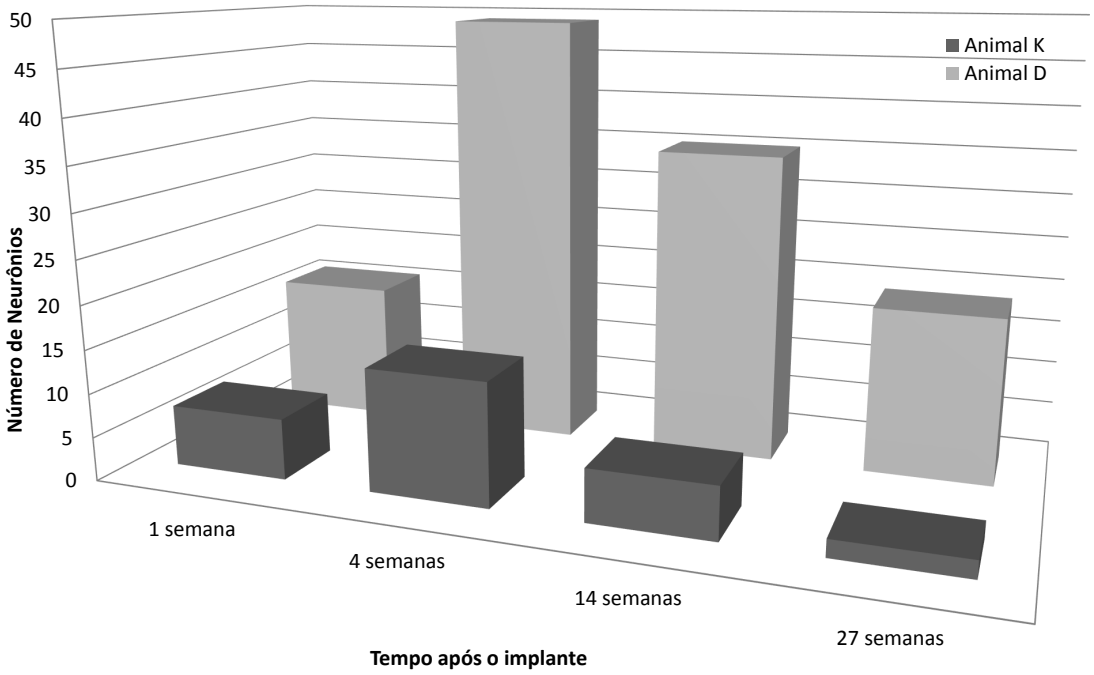
3.3 Resultados e discussão

No presente estudo, microeletrodos de aço inoxidável foram implantados em 2 saguis-comuns. A atividade neural foi gravada durante 27 semanas, e a qualidade e estabilidade do sinal ao longo do tempo foi estabelecida a partir de 3 parâmetros: número total, taxa média de disparos e amplitude pico a pico das unidades gravadas nas 1ª, 4ª, 14ª e 27ª semanas após o implante.

Em ambos os animais, o número total de unidades registradas 4 semanas após o implante dobrou (no animal K, de 6 para 14 unidades) ou triplicou (no animal D, de 15 para 48 unidades) em relação à primeira semana. Nas semanas subsequentes (14ª e 27ª), o número de neurônios diminuiu. No final da 27ª semana, havia um decréscimo de 92,8% (animal K) e 66,7% (animal D) no número total de unidades em comparação com a 4ª semana (Fig. 3.2). Esses resultados indicam que, em ambos os animais, houve um pico no número de unidades registradas na 4ª semana após o implante. Esse pico foi seguido por um contínuo decréscimo no número de neurônios gravados.

Esse padrão foi previamente descrito em estudos com diversas espécies e diferentes tipos de eletrodos (PRASAD *et al.*, 2014; PRASAD *et al.*, 2012; FREIRE *et al.*, 2011) e, possivelmente, resulta de uma resposta inflamatória do cérebro à presença dos eletrodos (BIRAN *et al.*, 2005; SZAROWSKI *et al.*, 2003). Após o implante, as células de defesa do sistema nervoso (principalmente microglia e astrócitos) são localmente ativadas e progressivamente depositadas ao redor dos eletrodos, formando uma cápsula isolante (MOSHAYEDI *et al.*, 2014). Essa encapsulação causaria um aumento gradual na impedância do eletrodo ao longo do tempo, resultando em um aumento inicial seguido por um decréscimo contínuo no número de unidades registradas (KRALIK *et al.*, 2001). Esse decréscimo pode também ser reflexo de morte neuronal, que pode ser induzida pela ativação microglial (BIRAN *et al.*, 2005). Alguns estudos, entretanto, sugerem que a resposta inflamatória do tecido cerebral não tem

Figura 3.2 – Número de unidades gravadas em cada animal (K e D) ao longo das semanas.



correlação com a variação no número de unidades registradas ao longo do tempo e que outros fatores, como sangramento intraparenquimal ou deterioração do eletrodo podem explicar melhor esse fenômeno (PRASAD *et al.*, 2012). Análises histológicas futuras do tecido cerebral dos 2 animais utilizados neste estudo podem ajudar a resolver essa questão.

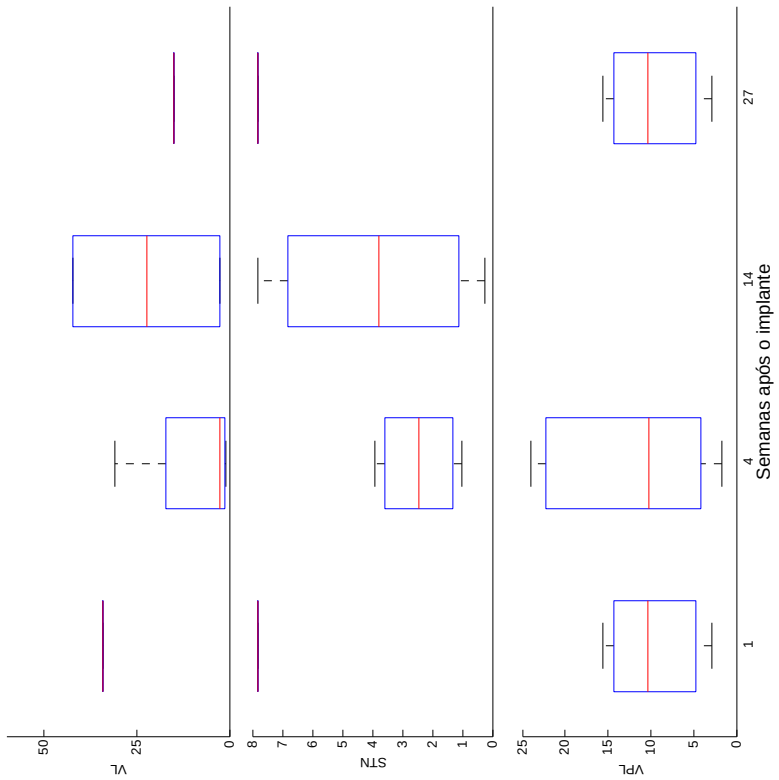
Apesar das mudanças no número de unidades gravadas no decorrer do tempo, não houve diferenças significativas na taxa média de disparos dos neurônios registrados em cada uma das áreas cerebrais analisadas: VL, STN e VPL para o animal K (Fig3.3a) e M1, PUT, S1, VL e STN para o animal D (Fig. 3.3b). Na Fig. 3.4 são apresentadas as taxas médias de disparo relativas (*Z-score*) das unidades no decorrer do tempo para todas as áreas gravadas do animal D. O *Z-score* de cada neurônio foi calculado com base na sua média de disparos por *bin* (100 ms) naquela semana. Já na Fig. 3.5 as análises das taxas médias de disparos de cada uma das regiões analisadas foram feitas entre os neurônios de cada região a cada *bin*, mostrando uma constância nas diferenças de taxas de disparos entre os neurônios no decorrer das semanas. Do mesmo modo, a amplitude pico a pico global das unidades registradas foi relativamente estável no decorrer das semanas. No animal K, a amplitude não variou significativamente no decorrer do tempo (Fig. 3.6a). No animal D, a amplitude média foi significativamente menor na primeira semana, subindo a partir da 4ª semana após o implante [$\chi^2(3)$=28.040, p<.001]. Ela então permaneceu relativamente estável nas semanas subsequentes (Fig. 3.6b). Na Fig. 3.7 é retratado um exemplo de amplitude de uma unidade

gravada no M1 do animal D no decorrer das semanas.

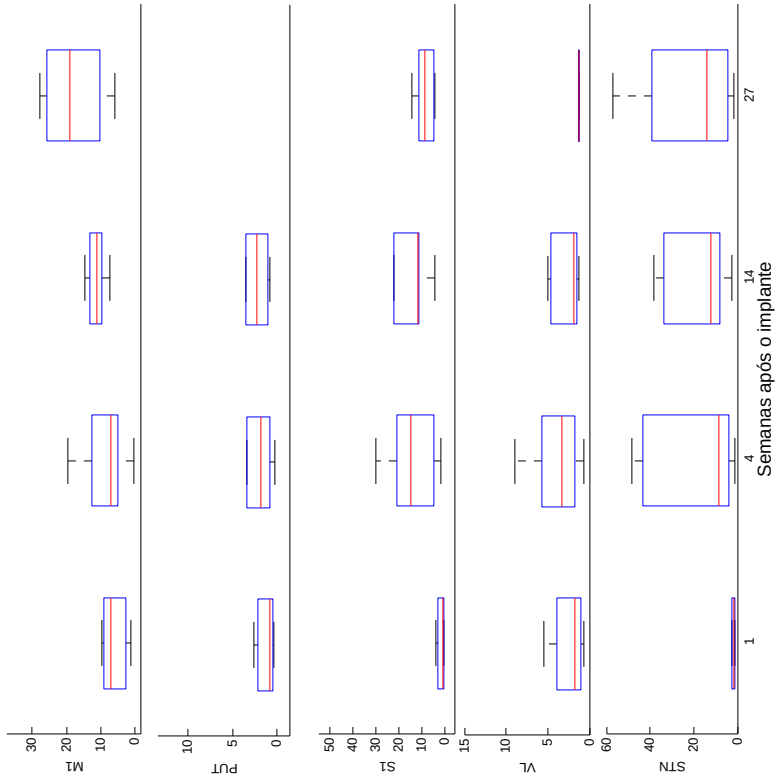
Esses resultados indicam que, apesar do contínuo decréscimo no número de unidades após a 4ª semana, o sinal que ainda podia ser registrado permaneceu relativamente estável ao longo do tempo. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente para matrizes de silício (ROUSCHE; NORMANN, 1998) e de platina/iridio (PRASAD *et al.*, 2014). Outro estudo, no entanto, reportou uma diminuição da taxa média de disparos ao longo do tempo em registros feitos no córtex motor de ratos com microeletrodos de tungstênio (FREIRE *et al.*, 2011). As diferenças entre os resultados podem estar relacionadas a diferenças nos procedimentos cirúrgicos ou a diferenças no material e forma de fabricação da matriz dos microeletrodos. Trabalhos futuros são necessários para determinar as causas da redução no número de neurônios gravados e como diferenças na fabricação dos eletrodos ou nos procedimentos cirúrgicos podem afetar a qualidade do sinal gravado por longos períodos.

Figura 3.3 – Taxas de disparos neurais das unidades gravadas no decorrer do experimento.

(a)

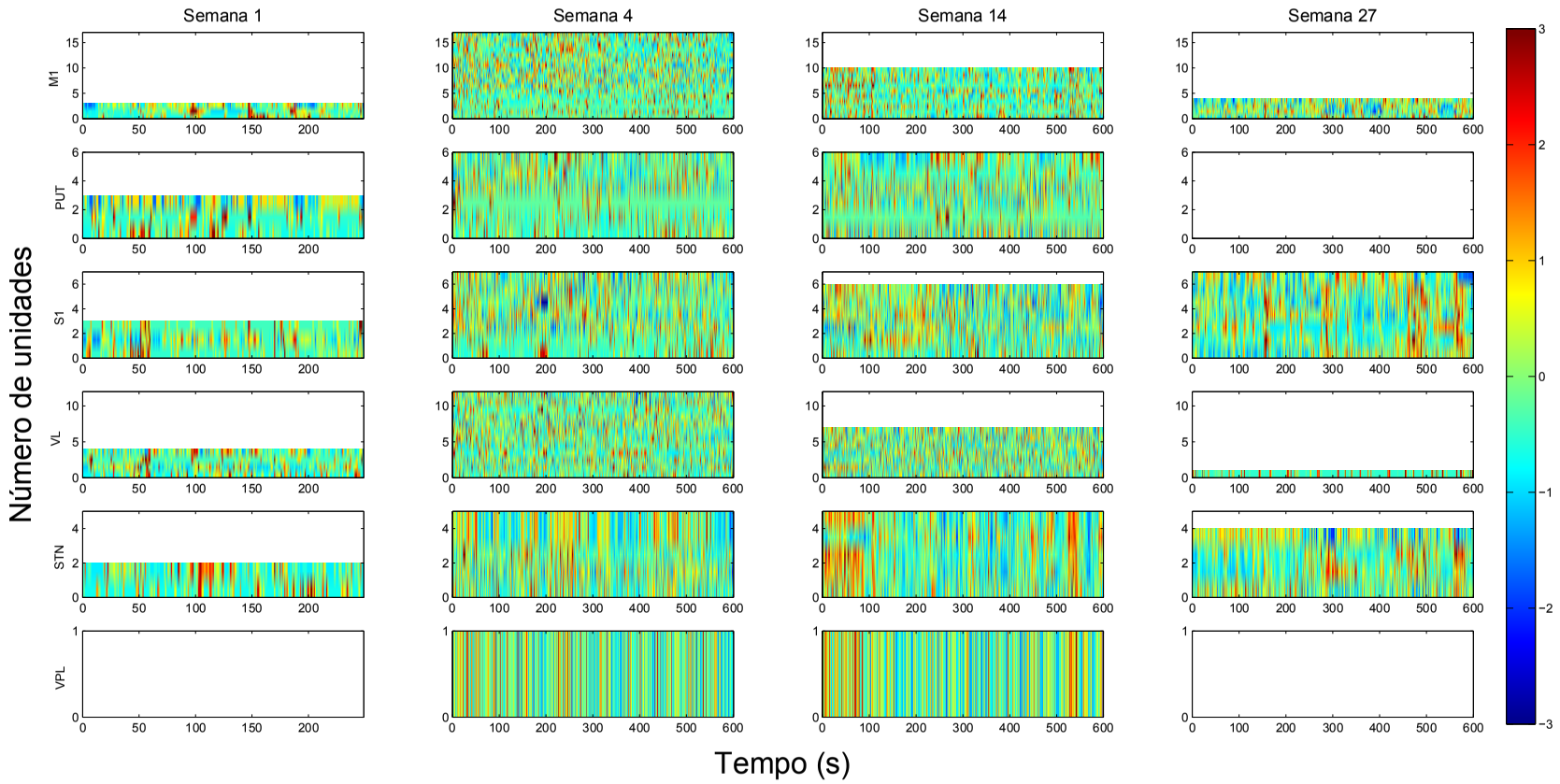


(b)



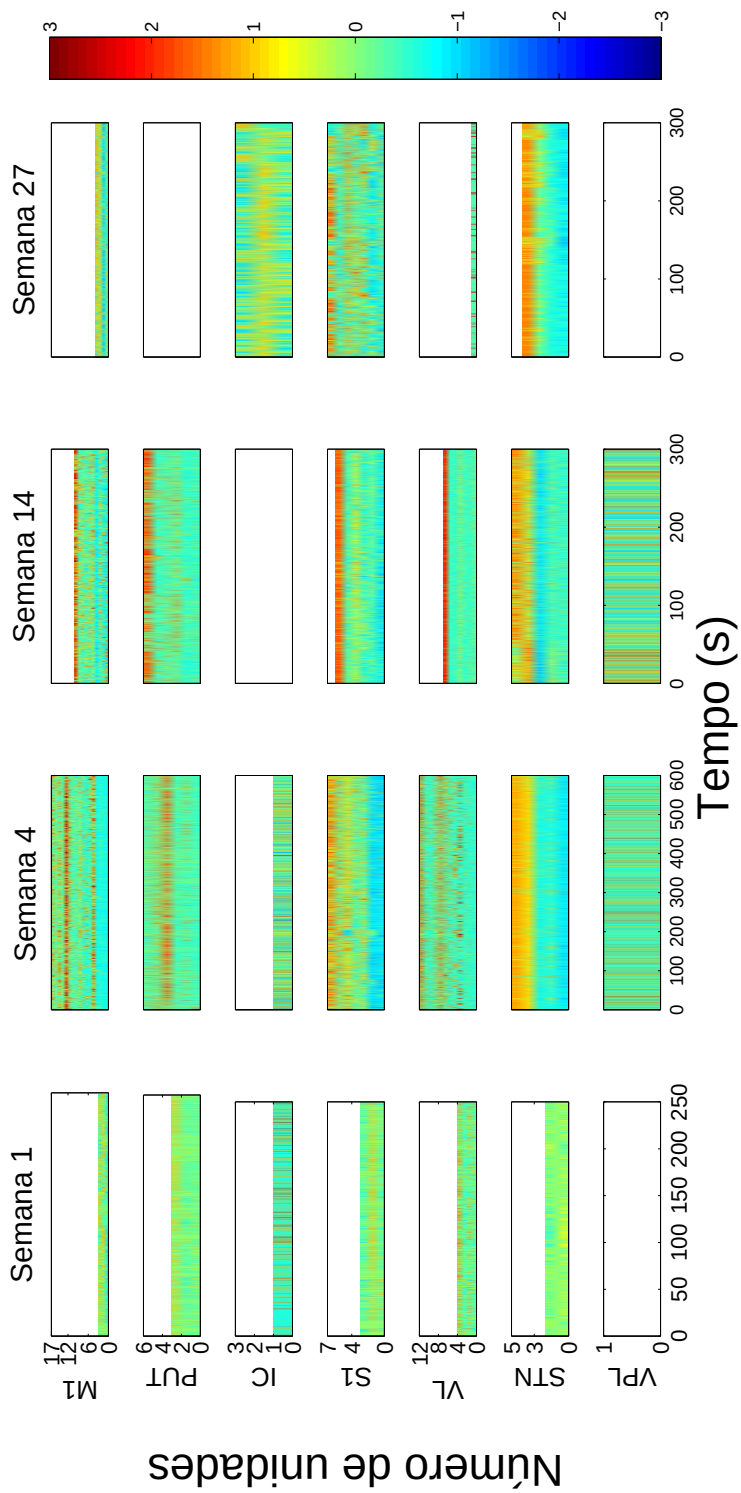
Box-plots das taxas de disparos de todas as unidades de VL, STN e VPL do animal K (3.3a) e todas as unidades do M1, PUT, S1, VL e STN do animal D (3.3b).

Figura 3.4 – *Z-score* de um animal no decorrer do experimento.



Z-escore das taxas de disparos das unidades registradas em cada região cerebral do animal D durante as sessões de gravação nas 1ª, 4ª, 14ª e 27ª semanas após o implante. Fonte: o autor

Figura 3.5 – *Z-score* de um animal no decorrer do experimento.



Z-escore das taxas de disparos das unidades registradas em cada região cerebral do animal D em cada instante de tempo durante as sessões de gravação nas 1ª, 4ª, 14ª e 27ª semanas após o implante. Fonte: o autor

Figura 3.6 – Amplitudes dos disparos neurais das unidades gravadas no decorrer do experimento.

(a) (b)

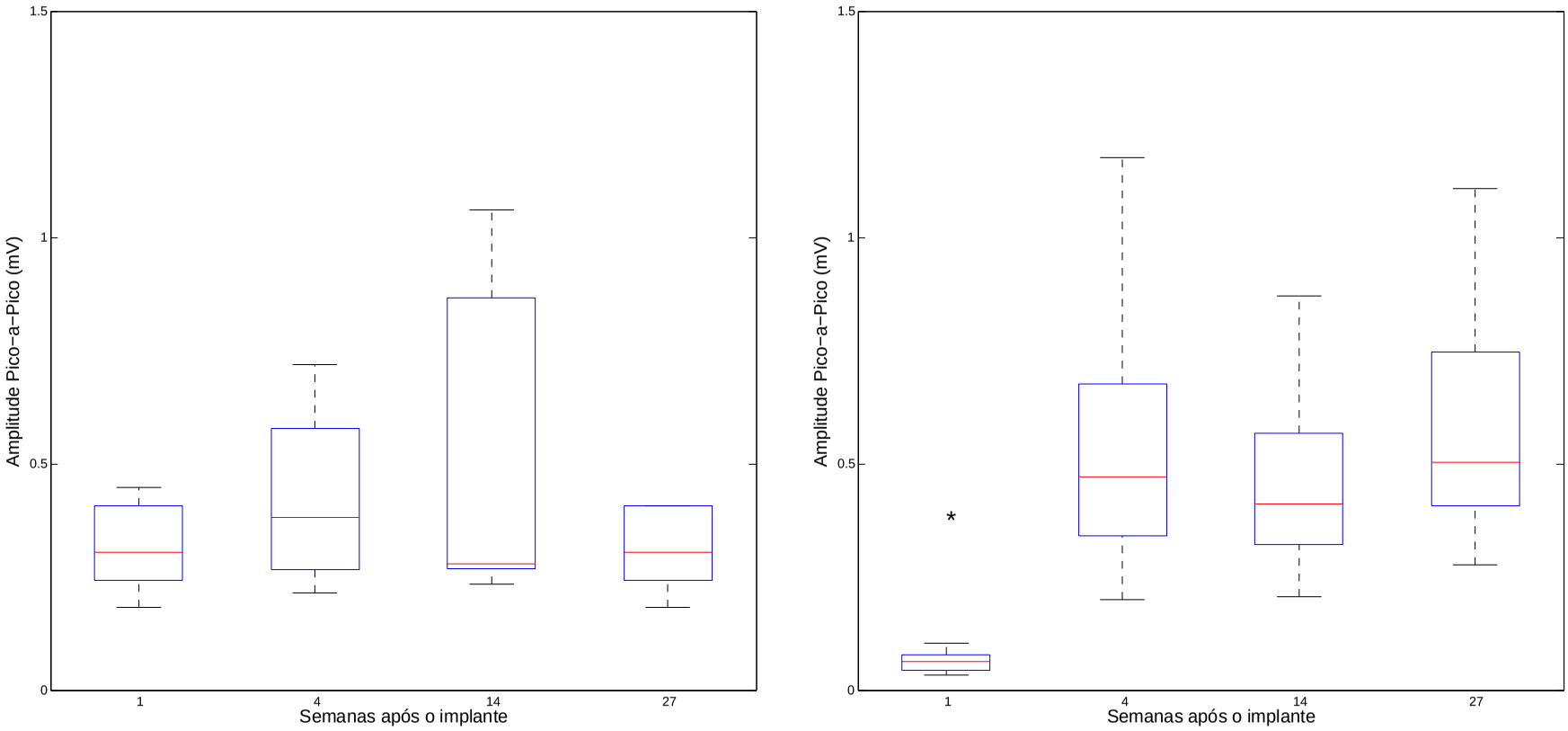


Fig. 3.6a e Fig. 3.6b, Amplitude média das unidades gravadas em cada animal no decorrer do tempo de implante *(p<.001).

Figura 3.7 – Formas de onda no decorrer das semanas

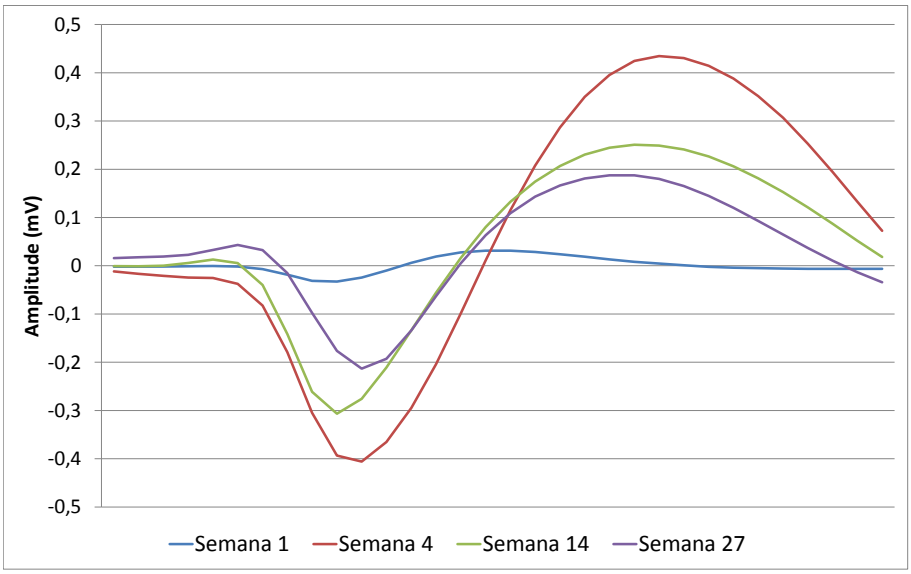


Fig. 3.7 Exemplo de forma de onda gravada em um mesmo canal do M1 do animal D no decorrer das semanas.

3.4 Conclusão

Os resultados descritos no presente estudo indicam que, apesar do decréscimo no número de unidades registradas no decorrer do tempo, implantes crônicos de aço inox podem ser utilizados em saguis não sujeitos a restrições de movimento para registro simultâneo de diversas regiões corticais e subcorticais por pelo menos 27 semanas, possibilitando o registro de diferentes áreas cerebrais durante a execução de tarefas comportamentais. Esses microeletrodos poderão, portanto, ser usados em estudos futuros que envolvam registros crônicos de múltiplas áreas cerebrais durante tarefas de discriminação de estímulos auditivos (Cap. 4) e em estudos de comunicação vocal em condições menos artificiais.

4 Caixa operante de baixo custo e personalizável utilizando *software* e *hardware* livres

4.1 Introdução

Nos capítulos anteriores foram abordados aspectos relativos à presença cada vez maior dos saguis em diversas áreas de pesquisa, com ênfase nos estudos em neurociências. Neste capítulo retomamos o aspecto da utilização desses animais como modelo para pesquisas relacionadas ao processamento auditivo.

Muitos estudos envolvendo o processamento neural de vocalizações trabalham com animais sob anestesia ou sob restrição de movimento, por exemplo, Wang e Kadia (2001, 2001), Lu *et al.* (2001), DeCharms e Merzenich (1996), Wang *et al.* (1995), Wang *et al.* (2005), Remington *et al.* (2012), o que pode diminuir suas respostas neurais e tornar menos natural o seu comportamento. Nessas condições, as respostas neurais registradas quase sempre refletem apenas um processamento passivo do estímulo sonoro. Além disso, a restrição física altera o comportamento dos saguis, que vocalizam muito menos nessas condições (ELIADES; WANG, 2008b). Existem, também, alguns estudos eletrofisiológicos em animais livres (ELIADES; WANG, 2008a; ROY; WANG, 2012). Nesses estudos, no entanto, vários parâmetros e variáveis experimentais não podem ser controlados.

Para o completo entendimento do processamento neural de vocalizações, portanto, é interessante criar cenários intermediários, onde animais acordados e sem restrição de movimentos possam realizar tarefas cujas variáveis experimentais possam ser facilmente controladas e manipuladas. Nesse contexto, o uso de caixas de condicionamento operante pode ser uma boa opção de paradigma experimental. Caixas de condicionamento operante, também conhecidas como caixas de Skinner, consistem em uma câmara onde o animal é condicionado a responder a um estímulo para receber uma recompensa. A disponibilidade desse tipo de aparato para pequenos primatas é muito limitada e não existe uma caixa operante comercialmente disponível para discriminação de estímulos sonoros para esses animais.

Neste capítulo são apresentados os passos adotados para a elaboração de uma caixa operante baseada no microprocessador Arduino. Além disso, é descrito um estudo comportamental piloto para testar o uso do aparato pelos saguis. Com esses itens em mãos, será possível a reprodução e adaptação desse equipamento para as necessidades de outros pesquisadores, de maneira rápida e barata.

Quando se inicia uma linha de pesquisa nova, não há parâmetros definidos para que se saiba a melhor configuração para que os animais possam realizar as tarefas de maneira satisfatória. É de se esperar, portanto, uma grande variabilidade e muitas tentativas até se encontrar um bom paradigma de treinamento. Assim, a possibilidade de trocar peças de maneira rápida e barata é fundamental para esse tipo de empreendimento em fase inicial, o que pode fazer dos equipamentos baratos e de código aberto um diferencial.

Há no mercado atualmente diversos tipos de microcontroladores que poderiam realizar as tarefas necessárias para uma caixa de condicionamento operante, mas entre os fabricantes, as placas Arduino possivelmente possuem a maior abrangência de uso, tendo uma imensa comunidade ao seu redor que compartilha pela Internet diversos esquemas de *hardware*, códigos de *softwares* e tutoriais gratuitos, provavelmente devido a sua filosofia de código aberto (tanto em *hardware*, quanto em *software*) (D'AUSILIO, 2012). Além dos microcontroladores, existem placas chamadas de *shields*, que podem ser facilmente conectadas à placa Arduino para expandir suas capacidades. Ainda devido a sua filosofia de *hardware* de código-fonte aberto, muitas outras empresas, além da Arduino, projetam inúmeros *shields* para as mais variadas funções, como controlar motores, realizar conexões sem fio, tocar músicas e permitir o uso de sensores.

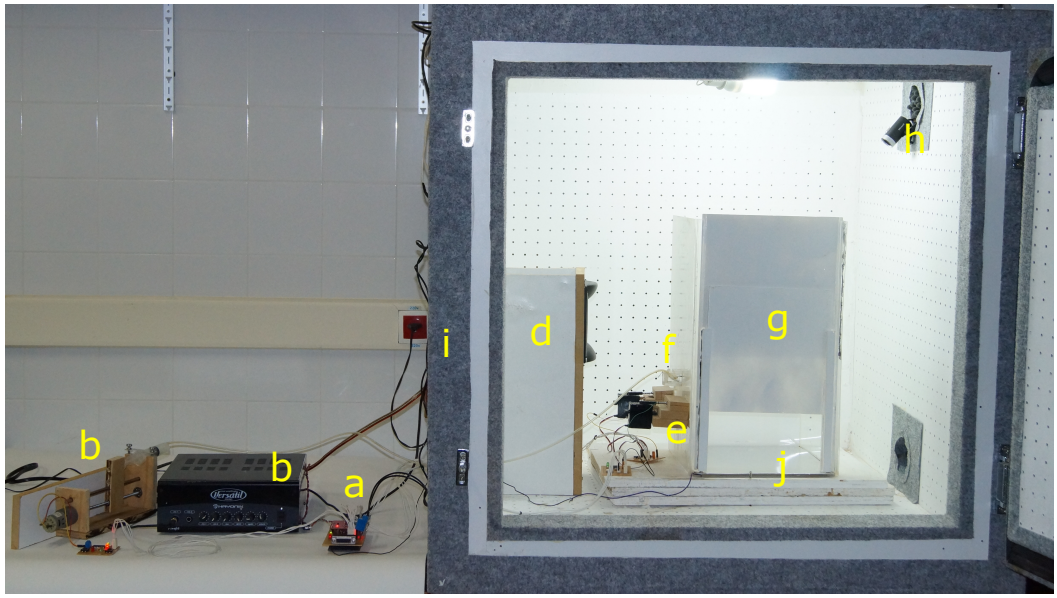
4.2 Materiais e métodos

O aparato é composto por uma caixa comportamental conectada a uma placa do microcontrolador Arduino ATMega2560, um *shield* para tocar som e um *shield* produzido no laboratório para a ligação com as barras de resposta da caixa comportamental e com a caixa de som (Fig. 4.1).

4.2.1 Caixa comportamental

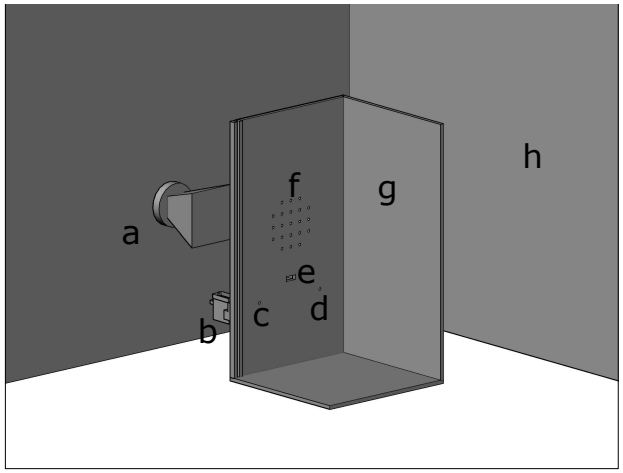
A caixa comportamental (25 cm x 25 cm x 45 cm), feita com acrílico transparente, tem uma porta deslizante em uma das paredes para a entrada e saída do animal (Fig. 4.1g). Na parede adjacente há dois orifícios simetricamente dispostos (Fig. 4.2c,d) para permitir a entrada e saída de barras retráteis sensíveis ao toque (Fig. 4.2b). Entre eles existe um outro orifício para a saída da recompensa (Fig. 4.2e), e do lado de fora da caixa de acrílico foi colocada uma colher, dentro de um receptáculo, onde a recompensa é depositada (Fig. 4.3). Acima do orifício da recompensa foram feitos pequenos furos para facilitar a passagem do som (Fig. 4.2f). Três paredes foram pintadas de branco para diminuir a distração dos animais com a parte exterior à câmara. Uma caixa acústica (D220Ti, JBL) foi colocada do lado de fora numa altura de 20 cm a partir do chão, para ficar próximo à altura da cabeça do animal,

Figura 4.1 – Foto do aparato experimental completo



(a) Arduino Mega com *shields*, (b) Sistema de recompensa, (c) Amplificador de som, (d) Caixa de som, (e) Barras retráteis, (f) Receptáculo da recompensa, (g) Caixa comportamental, (h) Câmera, (i) Caixa de isolamento acústico, (j) Placa de alumínio ligada ao terra do Arduino. Fonte: o autor

Figura 4.2 – Caixa comportamental



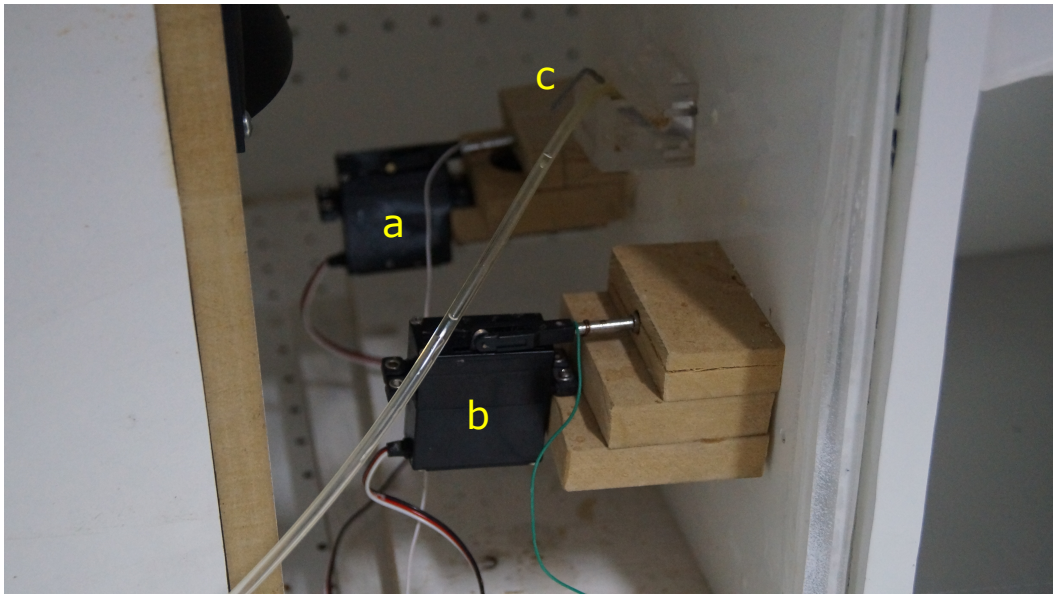
(a) Caixa de som, (b) Barras retráteis, (c) e (d) Orifícios para saída das barras retráteis, (e) Saída da recompensa, (f) Orifícios para passagem de som, (g) Caixa de acrílico, (h) Caixa de isolamento acústico. Fonte: o autor

em coincidência com os furos (Fig. 4.2f). Todos esses equipamentos foram colocados dentro de uma câmara de atenuação de som com paredes duplas (90 cm x 90 cm x 90 cm, CS caixas acústicas) para minimizar a interferência de ruídos vindos de fora (Fig. 4.1i e Fig. 4.2b).

4.2.2 Barras retráteis

Duas barras retráteis foram feitas a partir de barras metálicas de 0,6 cm de diâmetro e 6,5 cm de comprimento. Cada barra é movida por um servomotor (Futaba S-148 com um kit de conversão linear EMS para Futaba S-148 e S-3151) apoiado em uma base de madeira (Fig. 4.3). Estas barras foram projetadas para serem acionadas a partir do toque do animal, enviando um sinal para o Arduino através do circuito da Fig. 4.4.

Figura 4.3 – Barras e saída de recompensa

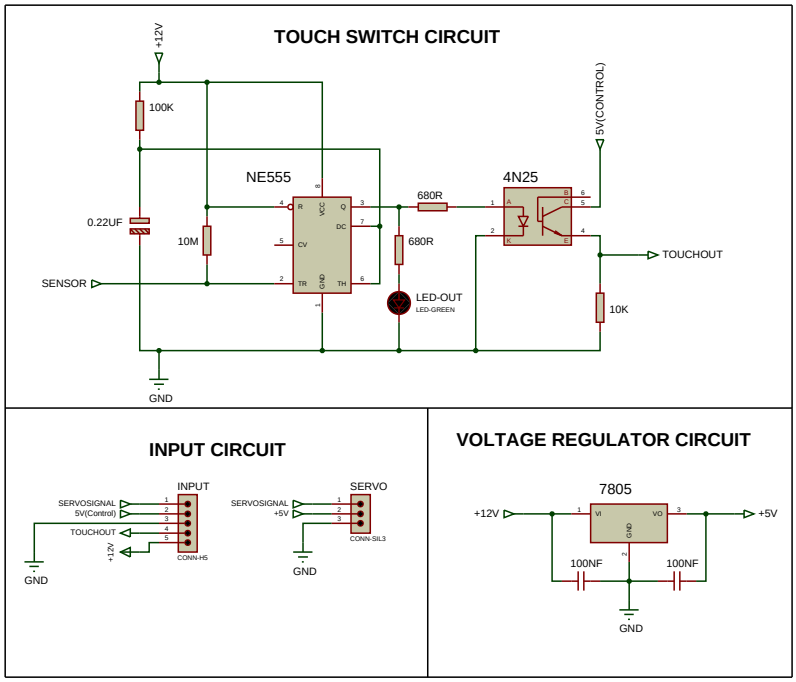


(a) e (b) Barras retráteis e (c) Receptáculo para recompensa. Fonte: o autor

4.2.3 Microcontrolador

Há mais de 20 modelos de placas Arduino disponíveis atualmente. Dentre suas diferenças, está o número de portas digitais de entrada/saída (E/S) usadas para a troca de sinais entre o microcontrolador e outros equipametos. Neste trabalho, a nossa escolha foi pelo Arduino Mega 2560, pois essa placa possui 54 portas de E/S digitais (as outras placas apresentam em geral entre 10 e 14 portas).

Figura 4.4 – Esquema do circuito elétrico utilizado para tornar as barras sensíveis a toque



Fonte: Elaborado por Philip César Lima da Silva, Técnico em eletrônica do IIN-ELS

O *shield* para reprodução de som (MP3 Player Shield, SparkFun) utiliza 10 portas; a comunicação serial com o computador via cabo USB ocupa mais 2 portas; as alavancas retráteis ocupam 6 portas (1 para cada servomotor, 1 para receber o sinal de cada barra e 1 para enviar a energia para o conjunto do servo mais a barra) e o sistema de entrega de recompensa ocupa 1 porta. Com essa configuração 19 portas seriam utilizadas, não sendo portanto possível a utilização de versões mais comuns do Arduino, como o UNO, que possui 14 portas de E/S digitais.

Foi criado também um cabo para conexão com um sistema de registro eletrofisiológico (14 sinais e um cabo terra), que poderá servir para sincronizar o sinal neural gravado com os eventos ocorridos durante uma tarefa comportamental. Há ainda portas disponíveis para adição de outros periféricos no futuro, como sensores de passagem (*beam-breakers*).

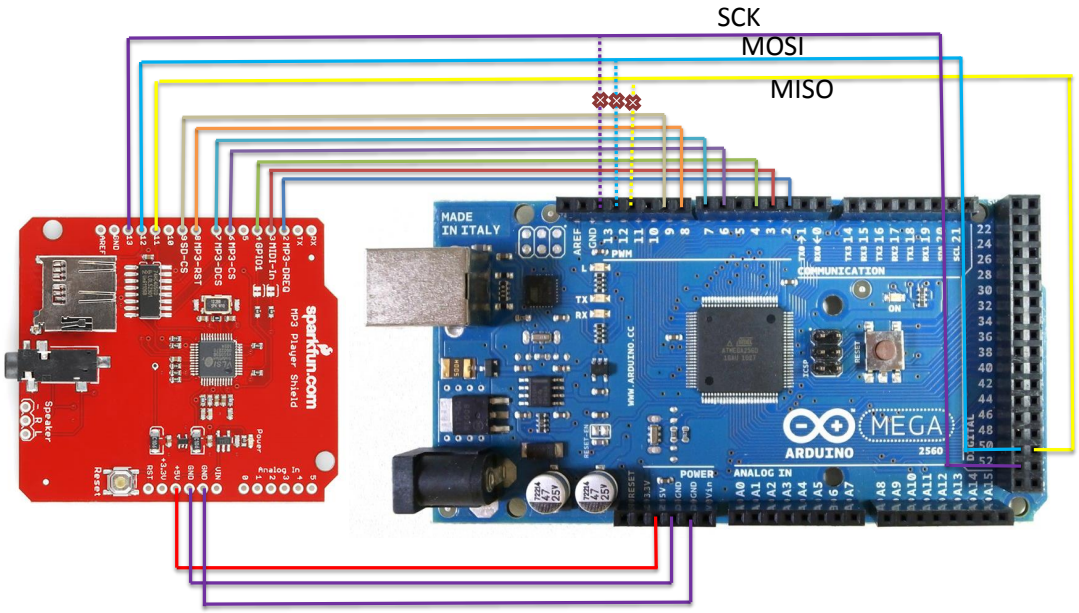
4.2.4 Sistema de som

Para adicionar a funcionalidade de reprodução de som ao aparato, foi utilizado um *shield* que pode ler arquivos de som gravados em um cartão de memória e tocá-los a partir de comandos recebidos pelo Arduino. A comunicação entre o Arduino e esse *shield* é feita

através do protocolo de interface periférica serial (SPI, *Serial Peripheral Interface*). Esse protocolo exige ao menos 3 portas para a comunicação: a porta de saída do dispositivo mestre e entrada do dispositivo escravo (MOSI, ***M**aster **O**utput, **S**lave **I**nput*), a porta de entrada do dispositivo mestre e saída do dispositivo escravo (MISO, ***M**aster **I**nput, **S**lave **O**utput*) e o "*Clock*" serial que define os tempos entre as trocas de informação (SCK).

As portas utilizadas para este protocolo são diferentes no Arduino Uno (11, 12 e 13) e no Arduino Mega (51, 50 e 52) (Fig. 4.5), e portanto foi necessária uma adaptação para que esse *shield* pudesse ser empilhado sobre o Arduino Mega. Nossa escolha foi por criar um *shield* intermediário (Fig. 4.6) que fizesse a ligação entre as portas 11, 12, 13 e as portas 51, 50 e 52, respectivamente, e contivesse os circuitos de apoio para o funcionamento da caixa operante. Como resultado foi possível empilhar o *shield* sobre o Arduino, mas foi necessário utilizar 13 portas para o *shield* de som em vez das 10 originalmente necessárias.

Figura 4.5 – Ligação do Arduino Mega e *Shield*

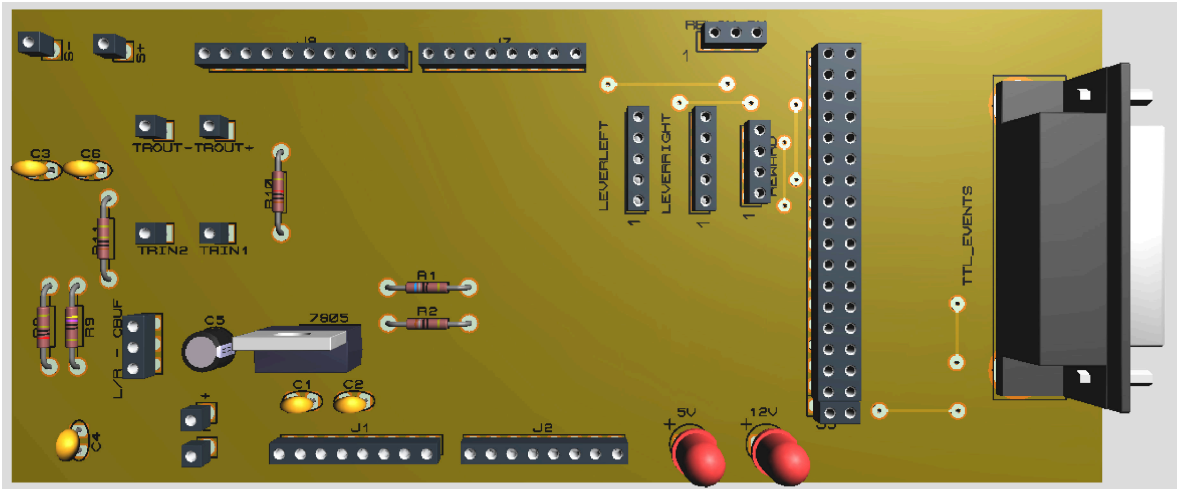


Destaque para as as portas 11, 12 e 13 (MISO, MOSI e SCK), que devem ser ligadas distantes de seu local de origem. Fonte: o autor

4.2.5 Sistema de entrega de recompensa

O sistema de entrega de recompensa foi desenvolvido para liberar uma pequena quantidade de recompensa líquida em uma colher colocada entre as barras retráteis. Em nossos testes a recompensa utilizada foi uma mistura de banana com leite e sacarose.

Figura 4.6 – *Shield* feito para ligação do *shield* de áudio e demais circuitos necessários para funcionamento da caixa.



Fonte: Elaborado por Philip César Lima da Silva, técnico em eletrônica do IIN-ELS

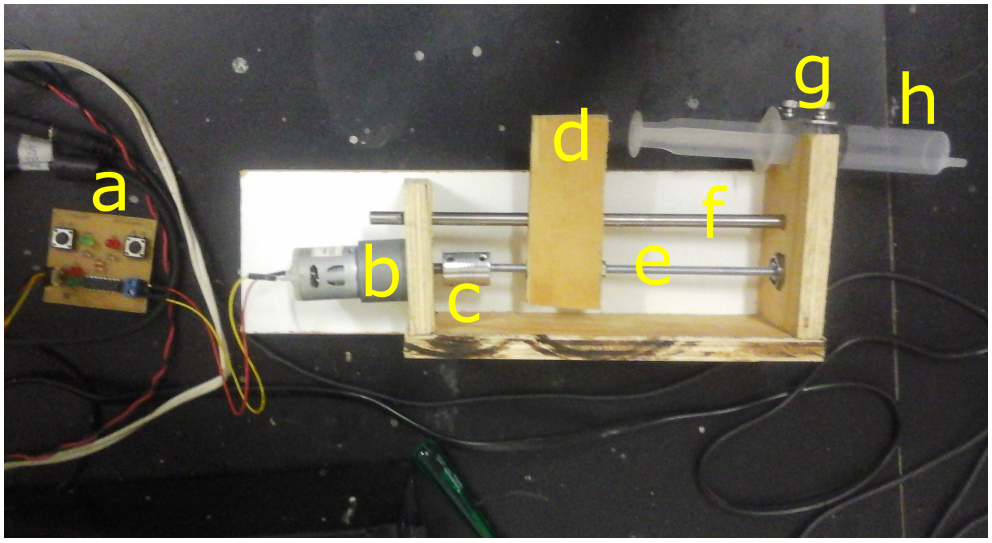
O presente sistema de entrega de recompensa é composto por uma estrutura de madeira que dá suporte a uma seringa e a um motor DC (AKIYAMA 12V/44RPM, Neoyama). O motor DC (Fig.4.8b) é conectado a uma barra roscada (Fig. 4.8e) de 5 mm através de um acoplamento metálico flexível (Fig. 4.8c) que possui um artefato móvel retangular de madeira (Fig. 4.8d) responsável por pressionar a seringa (Fig. 4.8h). Para fornecer um segundo apoio ao artefato de madeira e mantê-lo na direção correta, foi adicionada uma barra lisa acima da barra roscada (Fig. 4.8f) para guiar o artefato que pressiona a seringa.

Durante os experimentos, o motor gira no sentido horário, pressionando o êmbolo da seringa e liberando assim a recompensa. No entanto, antes e após o experimento é preciso que ele rode no sentido contrário, retornando a uma posição inicial, para possibilitar a colocação e retirada da seringa. Para realizar essa inversão na rotação do motor, foi utilizado um CI L293D e 2 botões que permitem o ajuste manual da posição do artefato que pressiona a seringa (Fig. 4.8a). A alimentação do motor DC é feita através de uma fonte externa (VS 1280, Hayama). O acionamento automático do motor é realizado através de um sinal enviado por uma das portas digitais do Arduino.

4.2.6 Testes de acurácia

Em futuras aplicações nas quais animais com implantes de eletrodos, como os descritos no Cap. 3, realizem uma tarefa no aparato proposto, será necessário o envio de sinais para

Figura 4.7 – Sistema de recompensa



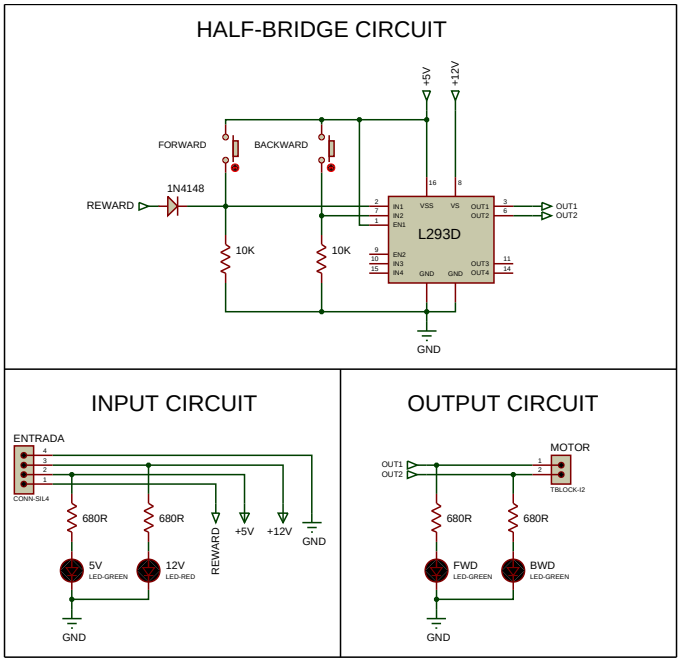
(a) Circuito elétrico para acionamento do motor, (b) Motor DC, (c) Acoplamento flexível, (d) Peça móvel que pressiona o êmbolo da seringa, (e) Barra roscada, (f) Barra lisa, (g) Fixação da seringa e (h) Seringa para recompensa. Fonte: o autor

marcar as atividades ocorridas e sincronizá-las com os registros neurais. Apesar de outros estudos já terem demonstrado que o Arduino possui baixa latência e grande confiabilidade para leitura e envio de sinais para outros equipamento através da Lógica Transistor-Transistor (TTL, *"**T**ransistor-**T**ransistor **L**ogic"*), que possui uma lógica binária para os níveis 0V e 5V (D'AUSILIO, 2012), foram realizados testes com o aparato proposto e o código-fonte usado para sua operação utilizando o sistema de aquisição de dados neurais Omniplex® (Plexon Inc., Texas, EUA), com uma taxa de amostragem de 40 kHz na placa de entrada digital.

Foram realizados três testes para verificar a acurácia de tempos de operação do microcontrolador nesta configuração. O primeiro teste foi feito para medir o tempo entre dois acionamentos de portas, como entre o evento que liga ou desliga a luz da caixa e o envio do TTL correspondente para o sistema de aquisição de dados neurais. Este teste foi realizado a partir do cálculo da diferença entre o tempo decorrido entre o evento de toque enviado pelo Arduino e o evento de funcionamento do sistema de recompensa. Ele pode ser considerado conservador para o cálculo desejado, já que, após o toque na barra ser lido pelo Arduino, ele envia um sinal para a Omniplex®, na sequência aciona o sistema de recompensa e depois envia o sinal de que o sistema foi ligado.

O segundo teste foi projetado para verificar a diferença entre o toque na barra sensível a toque, seu reconhecimento pelo Arduino e o envio de TTL para a Omniplex®. Para

Figura 4.8 – Circuito elétrico do sistema de recompensa



Fonte: Elaborado por Philip César Lima da Silva, técnico em eletrônica do IIN-ELS

realizar este teste, as saídas dos circuitos sensores de toque de cada barra foram conectadas às portas do Arduino, que fazem as suas leituras (portas 26 e 30 para barras esquerda e direita, respectivamente), e a um circuito integrado (CI) 74HC04 cuja saída foi ligada diretamente a uma porta de entrada digital da Omniplex®. A presença desse CI foi necessária para compatibilizar a saída em nível alto (5V) do sensor de toque com a leitura de borda de descida da Omniplex®. É importante frisar que o tempo de transição da borda para descida, segundo o fabricante do CI, é de no máximo 139 ns/V, o que resulta em um tempo máximo de 695 ns para o envio deste dado para a Omniplex®, que utiliza uma taxa de amostragem de 0,025ms, sendo portanto considerado como um evento instantâneo para efeito de cálculo de tempo.

O terceiro teste foi motivado pelo fato de que a reprodução de som, apesar de controlada pelo Arduino, é realizada por um microcontrolador externo, presente no *shield* de áudio, e é executada por uma função presente em uma biblioteca criada para este *shield* pelo fabricante e a comunidade Arduino. Para realizar este teste, o *shield* foi conectado à placa de testes de *headstages* da fabricante da Omniplex®, que é utilizada para testar o funcionamento de partes do equipamento através da aquisição de um sinal de som reproduzido em algum dispositivo, como o computador que controla o equipamento. Para os testes de tempo

decorrido, foram utilizados tanto um código-fonte simplificado no Arduino, que reproduzia arquivos com tons puros de 1 kHz quanto, posteriormente, os sons utilizados na tarefa com seu código-fonte correspondente.

4.2.7 Interface gráfica

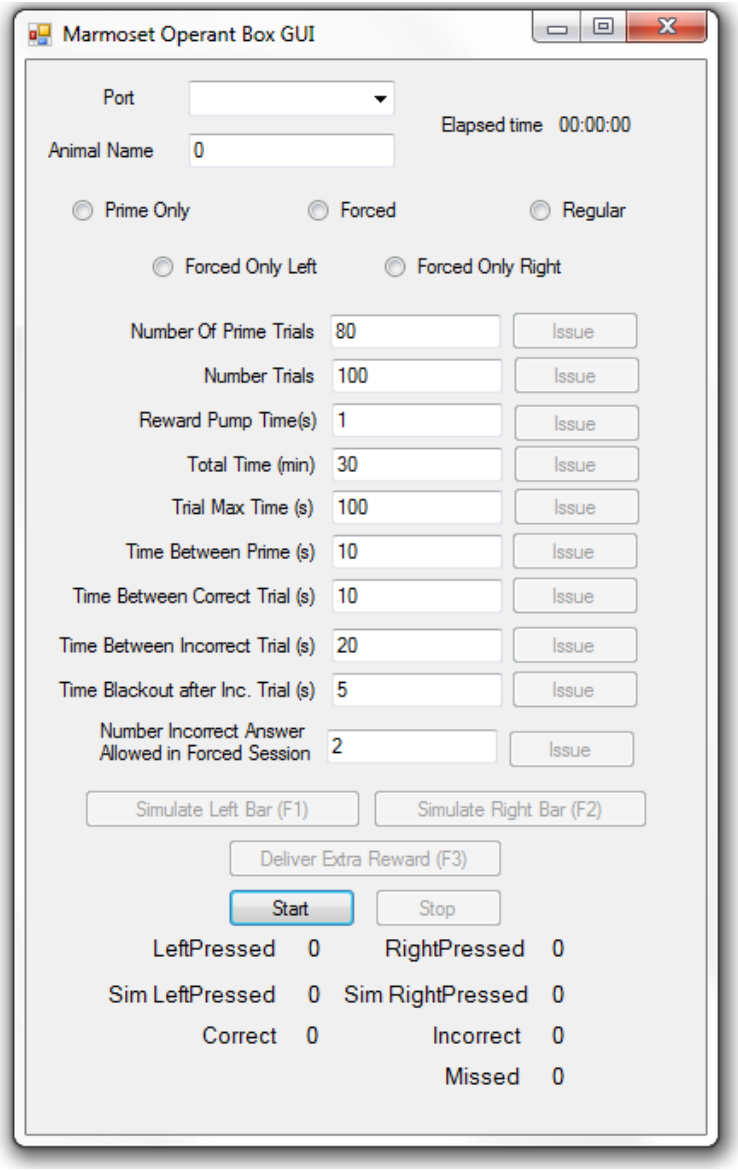
Uma Interface Gráfica com o Usuário (GUI, Graphic User Interface) foi desenvolvida em Visual Basic, através do Visual Studio 2013 (Montain View, EUA, Microsoft) para facilitar a interação entre o usuário e o microcontrolador. O programa estabelece uma conexão com a placa do Arduino Mega 2560 e controla as sessões de treino e experimento, possibilitando o acompanhamento do andamento das sessões e também a alteração dos principais parâmetros do experimento em tempo real. Adicionalmente, durante cada sessão experimental, um arquivo com os parâmetros do experimento e as respostas dos animais é gerado automaticamente para posterior análise. A tela dessa interface é mostrada na Fig. 4.9.

A primeira caixa da GUI é "Port", uma caixa de combinação de preenchimento obrigatório onde deve ser escolhida a porta a qual o Arduino está conectado. Logo abaixo, há uma caixa de texto para a inserção do nome do animal. Esta informação é utilizada para formar o nome do arquivo de registro de cada sessão, no formato: "NomedoAnimal - AnoMêsDia", que é preenchido por valores separados por vírgula (extensão ".csv", *comma-separated values*).

Existem 5 tipos de sessão experimental que podem ser escolhidos nesse programa: "*Prime Only*", "*Forced*", "*Regular*", "*Forced Only Left*" e "*Forced Only Right*", representados pelos 5 botões de opção abaixo do campo "*Animal Name*". Nas sessões "*Prime Only*", a cada tentativa apenas uma barra é projetada para o interior da caixa comportamental. Nas sessões "*Forced*", as duas barras são projetadas para o interior da caixa após a apresentação de um estímulo auditivo. Caso o animal faça a escolha incorreta, a mesma tentativa se repete até que o animal escolha a opção correta. As sessões "*Regular*" são similares às "*Forced*", sem a repetição das tentativas incorretas. As sessões "*Forced Only Left*" e "*Forced Only Right*" foram criadas para situações em que um animal passe a escolher apenas uma das barras em todas as tentativas da tarefa. Caso ele passe a escolher apenas a barra direita, por exemplo, ele poderá ser treinado por algum tempo na "*Forced Only Left*", em que, em todas as tentativas, apenas o estímulo que deve ser associado à barra esquerda é apresentado. Do mesmo modo, caso o animal desenvolva preferência pela barra esquerda, ele poderá ser treinado na "*Forced Only Right*". Antes do início de cada sessão experimental, o usuário deve selecionar uma dessas 5 opções.

Existem, ainda, os botões "*Simulate Left Lever* (F1)" e "*Simulate Right Lever* (F2)", que simulam o toque em uma das barras (esquerda ou direita, respectivamente), e o botão

Figura 4.9 – Interface Gráfica com Usuário



Fonte: o autor

"*Deliver Extra Reward* (F3)", que libera uma dose extra de recompensa. Como indicado no rótulo destes botões, as teclas "F1", "F2" e "F3" podem ser utilizadas como atalhos para estas ações, que podem ser particularmente úteis durante o início do treinamento dos animais, quando eles devem aprender a associar o toque na barra com o recebimento de recompensa. As simulações de aperto são gravadas no arquivo de log com rótulo diferente dos toques que de fato foram feitos pelo animal e mostrados em campos diferentes da GUI para acompanhamento em tempo real.

Existem, ainda, 10 caixas de texto que contêm valores relativos às configurações da sessão: "*Number Of Prime Trials*" (quantas tentativas iniciais devem ocorrer no modo "*Prime*" nas sessões "*Forced*" e "*Regular*"), "*Number of Trials*" (quantidade de tentativas com duas barras nas sessões "*Forced*" e "*Regular*"), "*Reward Pump Time*" (tempo, em segundos, que o motor da bomba de recompensa deve ficar ligado), "*Total Time*" (tempo máximo, em minutos, que deve durar uma sessão), "*Trial Max Time*" (tempo máximo, em segundos, de uma tentativa), "*Time Between Prime*" (tempo, em segundos, entre o final de uma tentativa do tipo "*Prime*" e a próxima), "*Time Between Correct Trials*" (tempo, em segundos, entre uma tentativa correta e a próxima), "*Time Between Incorrect*" (tempo, em segundos, entre uma tentativa incorreta, ou perdida, e a próxima), "*Time Blackout after Inc. Trial* (s)" (tempo no qual a luz da caixa ficará apagada após uma resposta errada), e "*Number Incorrect Answer Allowed in Forced Session*" (onde se insere o número de erros que podem ser cometidos numa sessão do tipo "*Forced*" antes de ser apresentada apenas a barra correta ao animal).

Uma sessão experimental começa quando o usuário aperta o botão "*Start*". Cada sessão pode terminar automaticamente de duas maneiras: quando se atinge o número máximo de tentativas ou o tempo máximo estabelecido. Além disso, é também possível finalizar uma sessão apertando o botão "*Stop*".

Os principais dados e respostas dos animais também podem ser acompanhados em tempo real na GUI. O campo "*Elapsed time*", localizado na porção superior da interface, indica o tempo decorrido desde o início da sessão. Na porção inferior da GUI existem 7 campos que indicam quantas vezes o animal escolheu as alavancas esquerda ("*Left Pressed*") e direita ("*RightPressed*"), quantas tentativas foram simuladas ("*Sim Left Pressed*" e "*Sim Right Pressed*"), a quantidade total de escolhas corretas ("*Correct*"), incorretas ("*Incorrect*") e tentativas sem resposta ("*Missed*").

4.3 Estudo piloto

Um estudo piloto para determinar se os saguis poderiam ser treinados para utilizar a caixa operante apresentada neste estudo foi realizado. Os animais foram treinados a tocar a barra esquerda ao ouvir um estímulo sonoro parecido com uma vocalização Phee ou a barra direita ao ouvir um estímulo sonoro parecido com uma vocalização Trill para receber uma recompensa.

4.3.1 Sujeitos

Duas saguis fêmeas (300-350 g), M1 e M2, foram treinadas em uma tarefa de discriminação de estímulos auditivos 6 vezes por semana (30 minutos por dia), desde os primeiros protótipos deste aparato experimental. Após a finalização do aparato um novo animal macho, M3, foi introduzido no estudo para avaliar o tempo de adaptação dos animais ao aparato e protocolo propostos. Eles tiveram acesso *ad libitum* à água e foram alimentados duas vezes ao dia, assim como ocorria antes do início do estudo. As sessões experimentais foram realizadas pela manhã (8:00-12:00) antes de os animais receberem a primeira refeição. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal da AASDAP (Protocolo 03/2013).

4.3.2 Estímulos

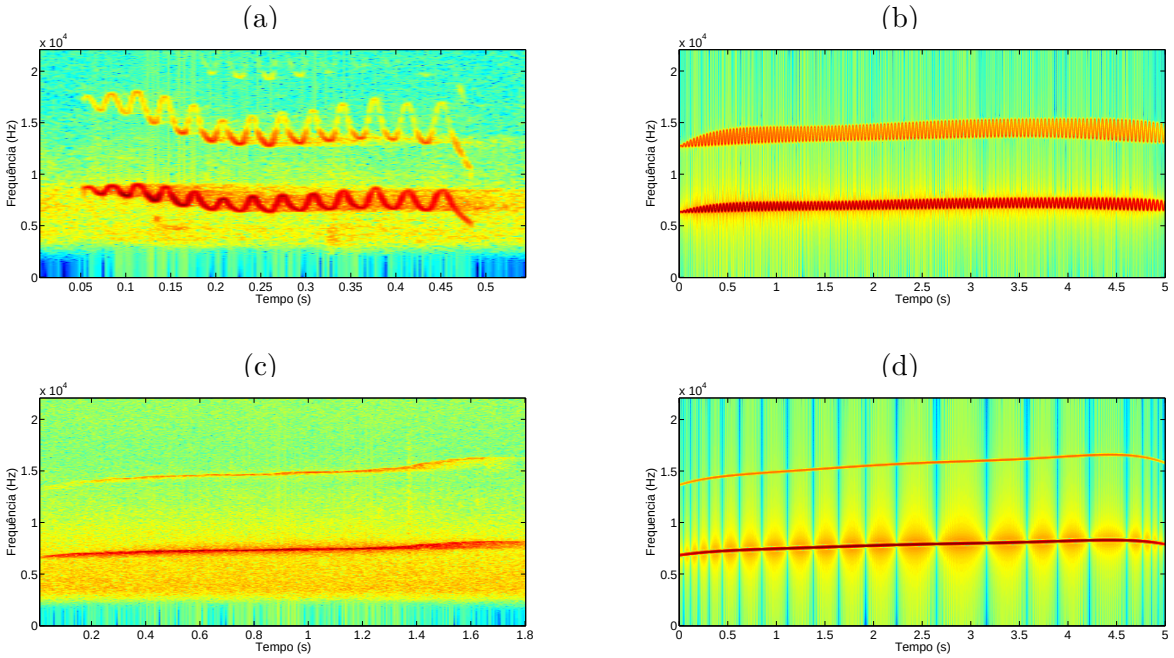
O par de estímulos sonoros usados na tarefa de discriminação auditiva foi gerado a partir do modelo de vocalização virtual proposto por DiMattina e Wang (2006). Este modelo, além de permitir a produção de vocalizações sem ruídos, nos possibilita ainda alterar alguns de seus parâmetros. Os parâmetros da frequência central do Trill e do Phee e a frequência de modulação do Trill foram ajustados para que os estímulos gerados ficassem mais próximos às vocalizações gravadas no biotério (capítulo 2). Em relação ao tempo, foi decidido que os dois estímulos deveriam ser homogêneos e mais longos, adotando 5 s para cada um deles (Fig. 4.10).

4.3.3 Tarefa comportamental

Antes das sessões de treino, foram realizadas sessões de habituação. Nessas sessões, os animais foram treinados a entrar na caixa operante, onde tinham acesso a pedaços de *marshmallow* que eram colocados nas barras, no local de entrega da recompensa, e na parede da caixa adjacente a esses locais. O tempo de permanência de cada animal dentro da caixa operante aumentou gradualmente em cada sessão de habituação, até uma sessão durar 30 minutos.

Após o período de habituação, iniciamos as sessões de treinamento. Na primeira etapa do treinamento, os animais foram treinados a tocar em uma das duas barras de resposta para receber uma pequena quantidade de recompensa. Em cada tentativa, apenas uma das barras era projetada para o interior da caixa, e a recompensa era entregue manualmente aos animais sempre que eles estavam próximos dela (tentativa simulada). Além disso, a mesma quantidade de recompensa era automaticamente entregue aos animais sempre que eles encostavam na barra. Se os animais não encostassem na barra em 100 s, ela era retraída, e uma nova tentativa

Figura 4.10 – Comparação entre os espectrogramas das vocalizações Trill e Phee gravadas e das criadas para o experimento



Na Fig. 4.10a há um exemplo de espectrograma de uma gravação da vocalização Trill feita no biotério do IIN-ELS, com duração de aproximadamente 0,5 s, já na Fig. 4.10b há o espectrograma da vocalização virtual parecida com Trill, mas com 5 s de duração. Na Fig. 4.10c há um exemplo de espectrograma de uma gravação da vocalização Phee feita no biotério do IIN-ELS, com duração de aproximadamente 1,8 s, já na Fig. 4.10d há o espectrograma da vocalização virtual parecida com Phee, mas com 5 s de duração. Fonte: o autor

se iniciava. Esta etapa do treinamento era escolhida no GUI ao selecionar a opção "*Prime Only*".

Para seguir para a segunda etapa do treinamento, os animais precisavam associar o toque na barra ao recebimento da recompensa, o que foi estabelecido como pressionar ao menos 50 vezes as barras por 3 sessões consecutivas de 30 minutos. Na segunda etapa, um estímulo auditivo (Trill ou Phee virtual) sempre era apresentado antes de os animais terem acesso às barras. Os animais foram treinados para pressionar a barra esquerda ao ouvir uma vocalização Trill, e a barra direita ao ouvir uma vocalização Phee. A segunda etapa era escolhida no GUI ao selecionar "*Forced*" e caracterizava-se pela repetição de uma tentativa errada por até o número de vezes estabelecido no campo "*Number Incorrect Answer Allowed in Forced Session*".

Nas sessões do tipo "*Regular*", a cada tentativa os estímulos Phee ou Trill eram apresentados de forma pseudorandômica, ou seja, sem a repetição do mesmo estímulo após

uma resposta incorreta, como ocorre nas sessões "*Forced*". Após a taxa de acerto dos animais ser considerada acima do aleatório em sessões do tipo "*Forced*", eles passaram para as sessões do tipo "*Regular*".

4.4 Resultados

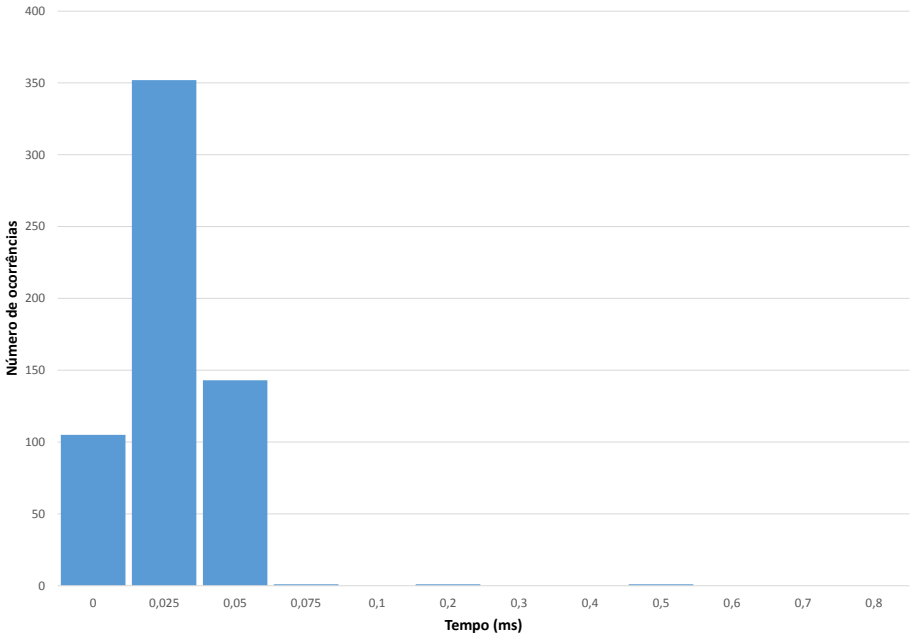
4.4.1 Análise de acurácia do sistema

O intuito do primeiro teste foi verificar se há diferenças significativas entre o acionamento de duas portas digitais do Arduino, o que ocorre entre ligar o sistema de entrega de recompensa e o envio da TTL para a Omniplex®. Foram realizadas 97 medições, com base nos tempos de 3 sessões de treinamento de diferentes animais, a partir do tempo entre o envio do evento de toque na barra pelo Arduino, o acionamento do sistema de recompensa e o envio do sinal de que o sistema foi acionado. O resultado destes testes mostrou que o tempo decorrido nunca é maior do que 0,025ms, o que equivale a uma unidade de tempo de captura do equipamento de testes.

O objetivo do segundo teste foi verificar o tempo decorrido entre o instante em que o animal toca na barra e o momento em que de fato o Arduino envia um sinal TTL para a Omniplex®. Foram realizadas 632 tentativas no decorrer de 3 sessões de 30 minutos de cada um dos 3 animais do estudo piloto. Os intervalos de tempo decorridos entre o equipamento de testes receber o sinal direto do circuito sensor de toque foram entre 0,000ms e 0,475ms, com um valor médio de 0,028ms e desvio padrão de 0,025ms. O histograma da distribuição dos valores das diferenças (Fig. 4.11) mostra que o valor mais provável para o ocorrência desta diferença de tempo é de 0,025ms. Nas duas ocorrências de valores acima de 0,075ms, foi possível verificar pelo vídeo gravado das sessões que o animal ficou com o dedo apoiado dentro do orifício de onde sairia a barra, provavelmente em contato com ela no momento em que o movimento de saída se iniciou e, portanto, este tempo foi possivelmente maior, pois o toque na barra ocorreu entre s comando de iniciar o movimento da barra e o Arduino iniciar a leitura da porta que recebe o sinal da barra. Entendemos, no entanto, que este atraso pode ser considerado irrelevante, dado que em geral os estudos avaliam os registros de potenciais de ação em janelas de tempo (*bins*) de 10 ms a 100 ms (CHAPIN *et al.*, 1999; ROMANSKI; GOLDMAN-RAKIC, 2002; DIMATTINA; WANG, 2006; ARAUJO *et al.*, 2012).

O terceiro teste almejou verificar a sincronização de um evento de início da reprodução do som com seu início efetivo. Este teste foi realizado em duas etapas. Na primeira foram utilizados tons puros de 1 kHz, com 44.100 pontos por segundo, gerados no *software* MatLab 2013 (The MathWorks Inc., EUA). Neste teste preliminar, foi gravado o sinal contínuo a fim

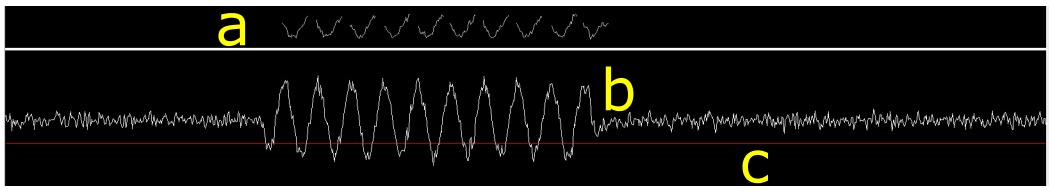
Figura 4.11 – Histograma dos tempos decorridos entre o sinal direto recebido pelo equipamento de testes e o enviado pelo Arduino



Fonte: o autor

de verificar se o áudio gerado seria lido de maneira consistente, ou seja, se cada ciclo de 10 pulsos de onda de 1 kHz seria gravado como 10 sinais que ultrapassaram o limiar definido, conforme exemplificado na Fig. 4.12.

Figura 4.12 – Teste de gravação contínua do sinal com pulsos de 1 kHz

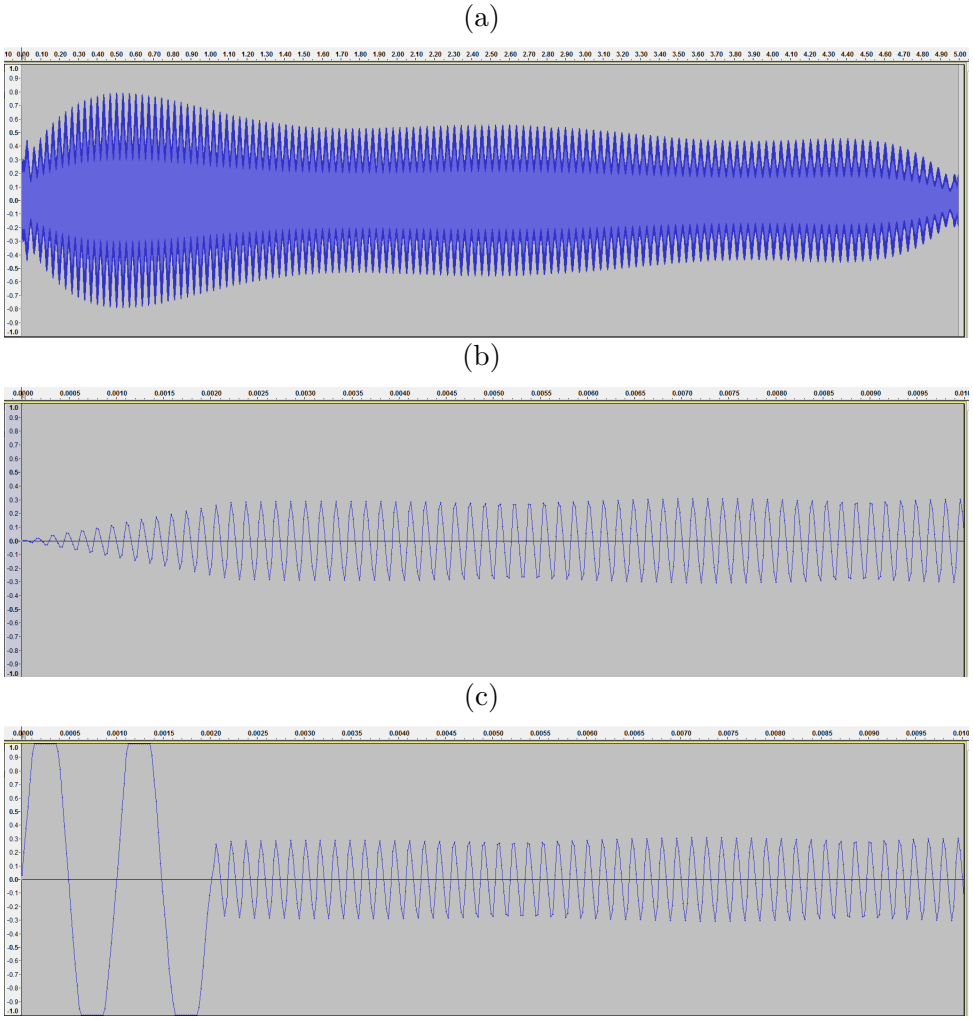


A figura mostra 1 pulsos de 10 ciclos de ondas de 1 kHz. A linha 4.12a mostra um conjunto de 10 formas de onda do sinal 4.12b que ultrapassaram o limiar estabelecido na linha 4.12c. Fonte: o autor

Após este teste, houve a confirmação de que os pulsos de 1 kHz são sempre gravados, ou seja, após 40 reproduções de pulsos de 10 ondas, havia 400 unidades de tempo nas quais o sinal havia ultrapassado o limiar estabelecido. Os testes realizados na sequência utilizaram o código-fonte do programa da caixa operante, sendo os sinais sonoros utilizados para o

estudo piloto alterados com o programa Audacity (web.audacityTeam.org) nos primeiros milissegundos para que em vez do aumento inicial de volume usual (Fig. 4.13b), houvesse 2 ondas de 1 kHz (Fig. 4.13c), de maneira que o tamanho do arquivo se mantivesse igual ao utilizado no estudo, mas garantindo que o sinal seria reconhecido pela Omniplex® já em seu início, o que seria mais difícil de obter com o aumento gradual da amplitude (*fade in*).

Figura 4.13 – Exemplo de alteração da amplitude inicial do sinal para o teste de acurácia

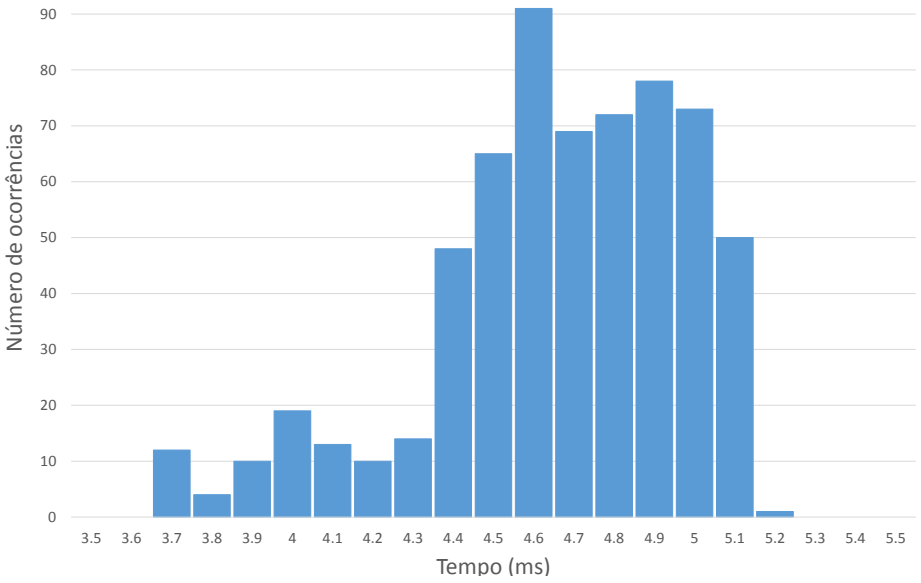


Na Fig. 4.13a a amplitude do sinal de 5 s do Trill está plotada. Na Fig. 4.13b a amplitude dos primeiros 10 ms é destacada, para dar ênfase ao aumento gradual do sinal sonoro em seu início. Na Fig. 4.13c os primeiros 2 ms do sinal original foram trocados por 2 ondas de 1 kHz de frequência para os testes de acurácia. Fonte: o autor

O tempo entre o evento enviado para o equipamento de teste e a captura do primeiro sinal de som que ultrapassou o limiar estabelecido, em 629 tentativas ocorridas em 3 sessões de cada um dos 3 animais envolvidos no estudo piloto, apresentou um valor médio de 4,607 ms, com um desvio padrão de 0,326 ms. O histograma que mostra a distribuição das diferenças

de tempos é apresentado na Fig. 4.14. Esse tempo pode ter que ser levado em consideração em trabalhos futuros em que se faça o registro de atividades neurais ao sincronizar o evento recebido do Arduino com o momento do início efetivo da reprodução do áudio.

Figura 4.14 – Histograma dos tempos decorridos entre o envio do evento do áudio e o início de sua reprodução



Fonte: o autor

4.4.2 Sistema de entrega de recompensa

Dada a importância da entrega imediata da recompensa após o animal responder corretamente a um estímulo, o *software* controlador da caixa operante foi desenvolvido de maneira a iniciar a entrega da recompensa logo após a percepção de que o animal havia tocado a alavanca correta. Com base nos resultados descritos acima (Cap. 4.2.6), o tempo máximo para o Arduino reconhecer um toque na barra nunca é maior que 0,475ms e o tempo entre esse reconhecimento e o início do funcionamento do sistema de recompensa nunca ultrapassa 0,025ms, ou sejam o sistema é iniciado em menos de 1 ms após o animal tocar a alavanca correta, o que foi considerado rápido o suficiente para o experimento.

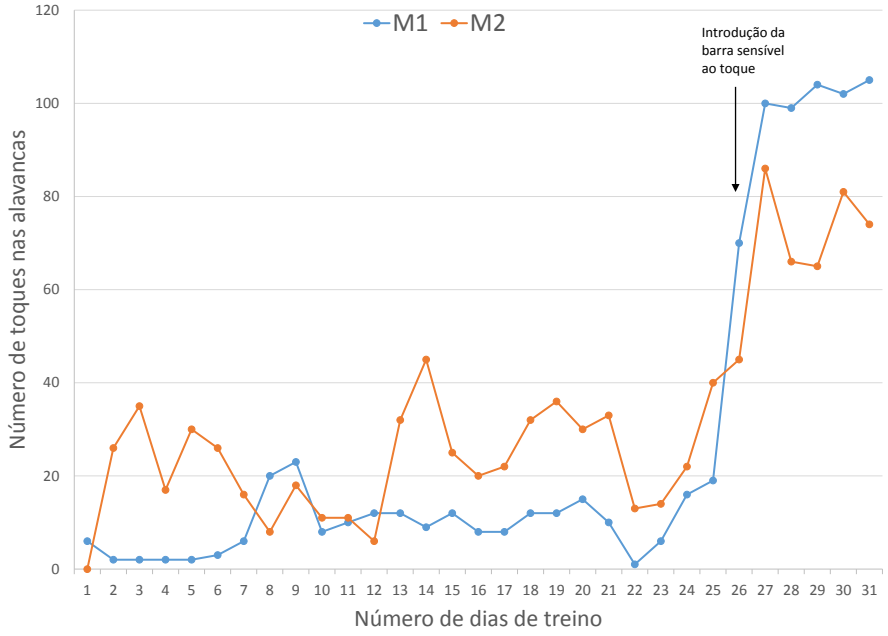
Assim que o sistema de recompensa é ativado, seu motor DC se aciona, e o êmbolo da seringa é então pressionado pelo tempo estabelecido no campo *Reward Pump Time (s)*. Um teste de fidelidade da quantidade de recompensa foi realizado utilizando o tempo de 1,1 s de acionamento do motor, tempo que foi definido experimentalmente para maximizar o número

de apertos dos animais nas primeiras sessões. Foram realizados 110 acionamentos do sistema de recompensa e se obteve uma massa média de 0,18 ml de recompensa por acionamenot, com um desvio padrão de 0,06 ml.

4.4.3 Estudo piloto

Dois animais, M1 e M2, que já vinham sendo treinados desde as primeiras versões da caixa experimental, passaram a tocar mais de 70 vezes a barra em sessões de 30 minutos de *"Prime Only"* após a introdução de barras sensíveis a toque no aparato (Fig. 4.15).

Figura 4.15 – Número de apertos por sessão de 30 min



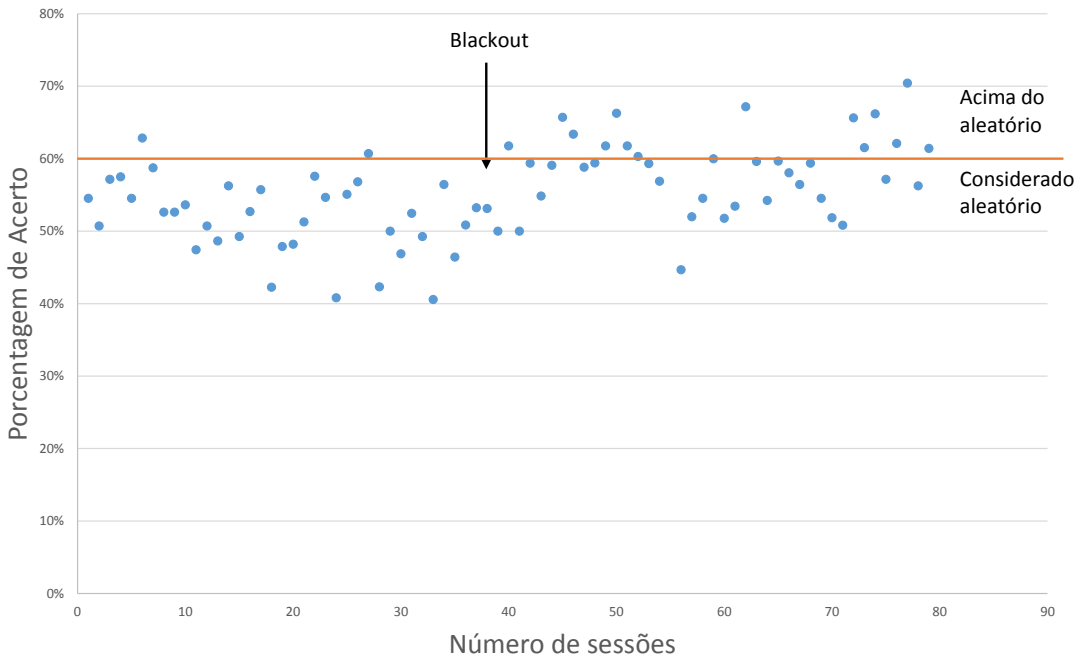
Fonte: o autor

Após 3 dias consecutivos com mais de 50 respostas, os animais passarampara a etapa de treinamento "*Forced*". Após 37 dias de treinamento, foi introduzida, uma punição positiva de um período de 5 s de escuro (*Blackout*) após cada erro. Essa punição teve resultados distintos nos animais. O animal M1 apresentou uma melhora no seu desempenho (Fig. 4.16). Já no animal M2, isso causou uma queda acentuada no seu desempenho, pois ele passou a pressionar apenas a alavanca esquerda após cerca de 2 semanas com essa punição (Fig. 4.17).

Para determinar se os animais tiveram desempenho acima do aleatório, sua taxas de acerto foram comparadas com a distribuição binomial com chance 50%. Para efeitos de comparação as taxas de acerto foram então confrontadas com o limiar de 60% (ao menos

30 acertos em 50 tentarivas)[X∼ B(50,0.5), P(X=30)=.04] nas Fig. 4.16 e 4.17. Em 6 das 8 sessões, da sessão 72 à sessão 80, o animal M1 apresentou um desempenho acima do aleatório (Fig. 4.16).

Figura 4.16 – Porcentagem de acertos por sessão de 30 min do animal M1



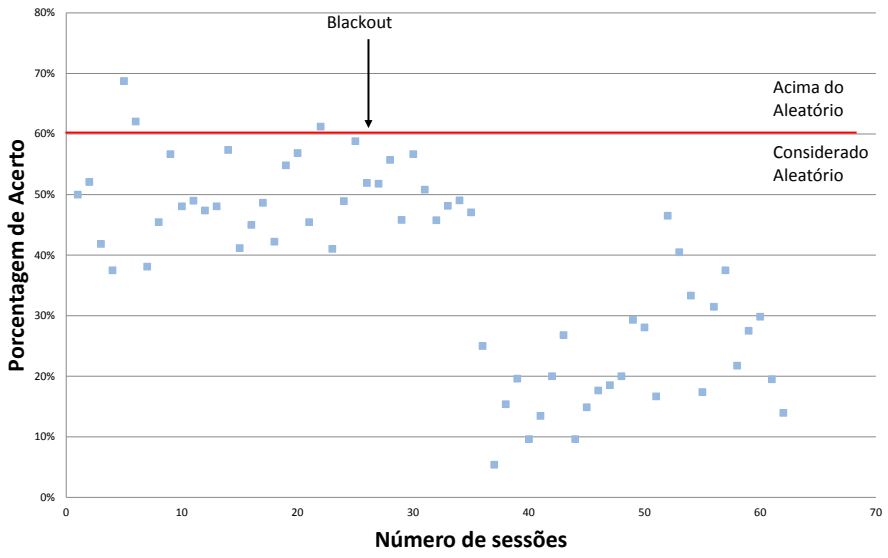
O limiar entre o aleatório e o acima do aleatório foi definido com base na distribuição binomial para 50 ou mais tentativas (f(30,50,0.5)=0.04). Fonte: o autor

O animal M3 passou a ser treinado após o estabelecimento do aparato em sua forma final. Ele passou por um período de 4 semanas de habituação com a caixa, após o qual levou 4 semanas para atingir 3 sessões consecutivas em que ele pressionou mais de 50 vezes a alavanca (Fig. 4.18). Em seguida iniciou seu treinamento no modo "*Forced*", mas até a conclusão deste trabalho não havia atingido um desempenho acima do aleatório (Fig. 4.19).

4.5 Discussão

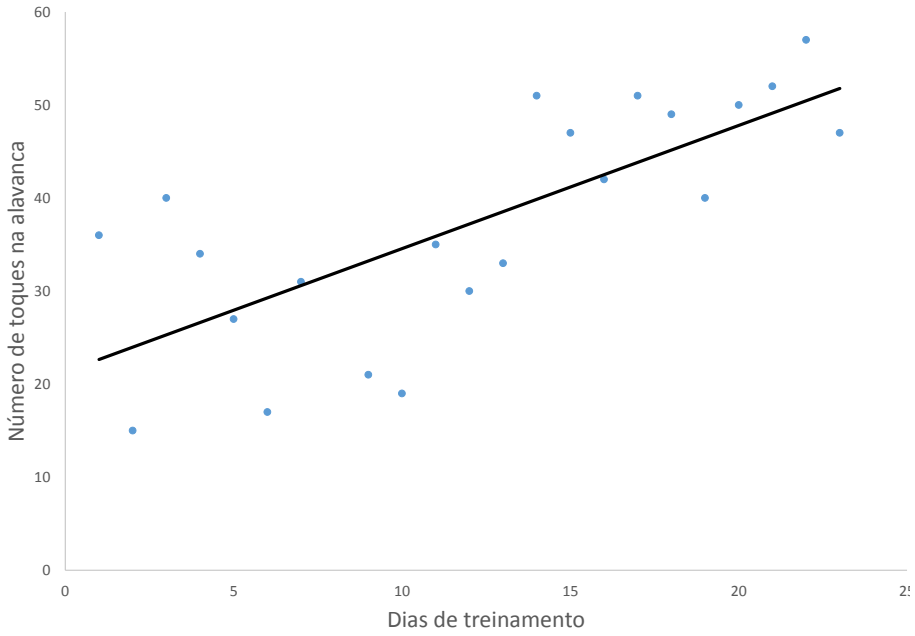
Os resultados apresentados mostram que os microcontroladores Arduino, apesar de serem componentes baratos, podem ser utilizados para a elaboração de equipamentos com grande acurácia, como a caixa comportamental proposta neste trabalho.

Figura 4.17 – Porcentagem de acertos por sessão de 30 min do animal M2



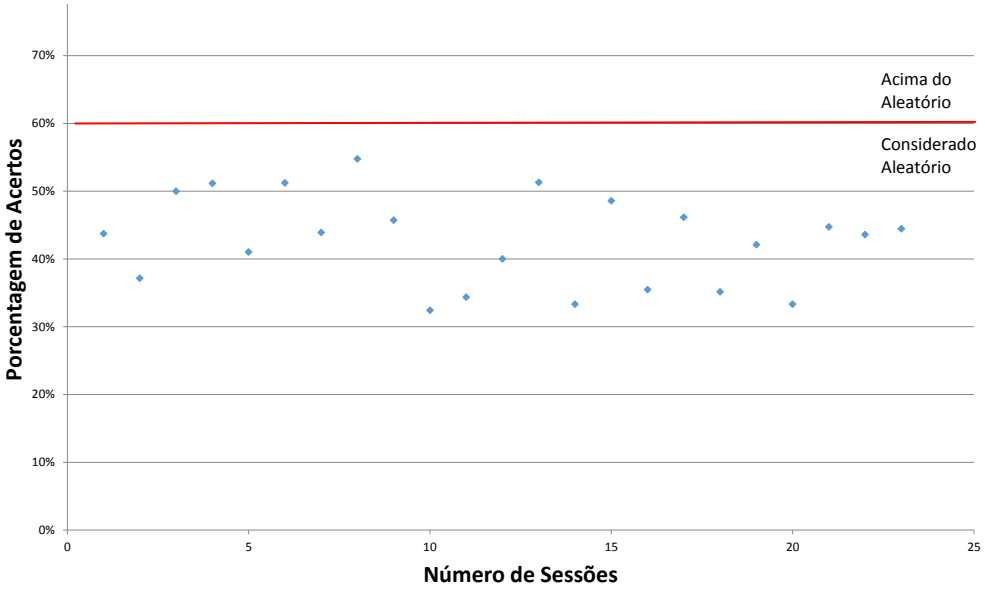
Fonte: o autor

Figura 4.18 – Número de toques nas barras no *Prime Only* para animal M3



Fonte: o autor

Figura 4.19 – Porcentagem de acertos por sessão de 30 min do animal M3



Fonte: o autor

Outros estudos que utilizaram condicionamento operante a estímulos auditivos não obtiveram sucesso para ensinar tarefas com respostas em alavancas com os animais presos em cadeiras de restrição de movimento (REMINGTON *et al.*, 2012). Por isso a decisão de deixar os animais se movendo livremente na caixa comportamental foi adotada. Apesar do sucesso inicial obtido, com os animais associando o toque na barra com a recompensa, a adição da barra sensível ao toque em vez de uma alavanca que tenha que ser pressionada se mostrou um fator determinante para o sucesso deste estudo (4.15).

A adição de uma punição positiva (*Blackout*) apresentou um efeito ambíguo, sendo positivo em um dos animais e negativo em outro. Esse fator deve ser objeto de estudos posteriores para determinar se é mesmo benéfico para o aprendizado da tarefa e, em caso positivo o tempo ideal em que deve ser utilizado para maximizar sua eficiência.

Outro parâmetro que deve ser objeto de futuras pesquisas é se uma restrição alimentar pode aumentar o desempenho dos animais e diminuir o tempo da curva de aprendizado deles.

4.5.1 Conclusão

Até onde temos conhecimento, existia apenas um trabalho de condicionamento operante com estímulos auditivos (REMINGTON *et al.*, 2012), no qual os saguis foram treinados em uma tarefa de detecção de sons: eles eram colocados em uma cadeira de restrição de mo-

vimentos e deveriam encostar a língua em um tubo que entregava recompensa caso ouvissem um estímulo sonoro. Com tal aparato, foi possível estabelecer os limiares auditivos dos saguis (OSMANSKI; WANG, 2011).

No presente trabalho, propomos uma nova abordagem para o condicionamento operante de saguis, a partir de equipamentos facilmente disponíveis no Brasil, com um baixo custo e elevada possibilidade de modificações, onde os animais são treinados não apenas para detectar a presença de um som, mas também para discriminar entre dois estímulos sonoros parecidos com suas vocalizações naturais. O baixo custo do aparato não significou uma menor qualidade no seu desempenho, já que os testes de precisão temporal demonstraram que os eventos da tarefa ocorrem sem atrasos significativos. Além disso, sinais que representam a ocorrência desses eventos podem ser enviados à Omniplex® para eventual sincronização de registros neurais com os eventos da tarefa.

A abordagem proposta com o aparato construído sugere que é possível ensinar a saguis uma tarefa de condicionamento operante para discriminação de estímulos sonoros.

Conclusão

Neste trabalho, foram desenvolvidas e descritas algumas ferramentas para o estudo do processamento auditivo e comunicação vocal em saguis. A caixa de condicionamento operante e o paradigma comportamental descritos no capítulo 4 poderão ser usados, no futuro, em diversos experimentos que visem o estudo do processamento de estímulos naturais, dos mecanismos neurais envolvidos na tomada de decisão baseada em estímulos auditivos complexos e na comunicação vocal. Os estímulos usados nesses experimentos poderão ser selecionados dentre as vocalizações espontâneas extraídas das gravações feitas no IIN-ELS ou poderão ser gerados a partir do modelo de vocalizações virtuais (Cap. 2). Além disso, nesses estudos, poderá ser feito o registro crônico simultâneo da atividade de diversas regiões (Cap. 3), como córtices auditivo, motor e pré-frontal, enquanto os animais realizam a tarefa.

No futuro, através de técnicas de microestimulação cerebral, será possível usar as ferramentas desenvolvidas nesta dissertação para estudar a transmissão de informação auditiva de um sujeito para outro, buscando o estabelecimento de uma interface cérebro-cérebro. Dado o baixo custo e fácil modulação da caixa operante, será possível aumentar o número de sujeitos envolvidos nesse tipo de interface, permitindo o escalonamento e a transmissão de informação entre vários animais e assim vaibilizando estudos que investiguem o funcionamento de uma rede de sujeitos conectados para a realização de determinadas tarefas.

Referências

ABBOTT, D. H.; BARNETT, D.; COLMAN, R.; YAMAMOTO, M.; SCHULTZ-DARKEN, N. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comparative Medicine*, v. 53, n. 4, p. 339–350, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 3 e 4.

ABBOTT, D. H.; HEARN, J. P. Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *Journal of reproduction and fertility*, v. 53, p. 155–166, 1978. ISSN 1470-1626. Citado na página 2.

ABBOTT, D. H.; SALTZMAN, W.; SCHULTZ-DARKEN, N. J.; SMITH, T. E. Specific neuroendocrine mechanisms not involving generalized stress mediate social regulation of female reproduction in cooperatively breeding marmoset monkeys. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 807, n. 36, p. 219–238, 1997. ISSN 00778923. Citado na página 2.

AITKIN, L.; PARK, V. Audition and the auditory pathway of a vocal new world primate, the common marmoset. *Progress in Neurobiology*, v. 41, p. 345–367, 1993. ISSN 03010082. Citado na página 5.

ARAUJO, A.; ARRUDA, M. F.; ALENCAR, A. I.; ALBUQUERQUE, F.; NASCIMENTO, M. C.; YAMAMOTO, M. E. Body Weight of Wild and Captive Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *International Journal of Primatology*, v. 21, n. 2, p. 317–324, 2000. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/P43407KR433L0148.pdf>. Citado na página 2.

ARAUJO, M. F. P. de; HORI, E.; MAIOR, R. S.; TOMAZ, C.; ONO, T.; NISHIJO, H. Neuronal activity of the anterior cingulate cortex during an observation-based decision making task in monkeys. *Behavioural Brain Research*, Elsevier B.V., v. 230, n. 1, p. 48–61, apr 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342487>. Citado na página 45.

BAKER, H. F.; RIDLEY, R. M.; DUCHEN, L. W.; CROW, T. J.; BRUTON, C. J. Experimental induction of β-Amyloid plaques and cerebral angiopathy in primates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 695, p. 228–231, 1993. ISSN 00778923. Citado na página 4.

BAREFOOT, H. C.; MACLEAN, C. J.; BAKER, H. F.; RIDLEY, R. M. Unilateral hippocampal and inferotemporal cortex lesions in opposite hemispheres impair learning of single-pair visual discriminations as well as visuovisual conditional tasks in monkeys. *Behavioural Brain Research*, v. 141, p. 51–62, 2003. ISSN 01664328. Citado na página 5.

BARRETT, J.; ABBOTT, D. H.; GEORGE, L. M. Extension of reproductive suppression by pheromonal cues in subordinate female marmoset monkeys, Callithrix jacchus. *Journal of reproduction and fertility*, v. 90, p. 411–418, 1990. ISSN 1470-1626. Citado na página 2.

BENDOR, D.; WANG, X. Cortical representations of pitch in monkeys and humans. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 16, n. 4, p. 391–399, 2006. ISSN 09594388. Citado na página 5.

BEZERRA, B. M.; SOUTO, A. Structure and usage of the vocal repertoire of Callithrix jacchus. *International Journal of Primatology*, v. 29, p. 671–701, 2008. ISSN 01640291. Citado 5 vezes nas páginas 2, 4, 7, 9 e 11.

BIRAN, R.; MARTIN, D. C.; TRESCO, P. A. Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Experimental neurology*, v. 195, n. 1, p. 115–26, sep 2005. ISSN 0014-4886. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045910>. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 23.

BROWN, G. R.; ALMOND, R. E. A.; BERGEN, Y. V. Begging, Stealing, and Offering: Food Transfer in Nonhuman Primates. *Advances in the Study of Behavior*, v. 34, p. 265–295, 2004. ISSN 00653454. Citado na página 5.

BUGNYAR, T.; HUBER, L. Push or pull: an experimental study on imitation in marmosets. *Animal behaviour*, v. 54, n. October 1996, p. 817–31, 1997. ISSN 0003-3472. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9344436>. Citado na página 5.

BURKART, J. M.; FEHR, E.; EFFERSON, C.; SCHAIK, C. P. van. Other-regarding preferences in a non-human primate: common marmosets provision food altruistically. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 50, p. 19762–19766, 2007. ISSN 0027-8424. Citado na página 4.

BURKART, J. M.; FINKENWIRTH, C. Marmosets as model species in neuroscience and evolutionary anthropology. *Neuroscience Research*, Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society, v. 93, p. 8–19, apr 2015. ISSN 01680102. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242577http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010214002144>. Citado 3 vezes nas páginas 2, 4 e 5.

BURKART, J. M.; HRDY, S. B.; Van Schaik, C. P. Cooperative breeding and human cognitive evolution. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, v. 18, n. 5, p. 175–186, sep 2009. ISSN 10601538. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/evan.20222/pdfhttp://doi.wiley.com/10.1002/evan.20222>. Citado na página 4.

CACCHIONE, T.; BURKART, J. M. Dissociation between seeing and acting: Insights from common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Behavioural Processes*, Elsevier B.V., v. 89, n. 1, p. 52–60, 2012. ISSN 03766357. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2011.10.010>. Citado na página 4.

CHAPIN, J. K.; MOXON, K. A.; MARKOWITZ, R. S.; NICOLELIS, M. A. L. Real-Time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *Nature Neuroscience*, v. 2, n. 7, p. 664–670, jul 1999. ISSN 10976256. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404201http://www.nature.com/doifinder/10.1038/10223>. Citado na página 45.

CLARKE, H. F. Cognitive Inflexibility After Prefrontal Serotonin Depletion. *Science*, v. 304, n. 2004, p. 878–880, 2004. ISSN 0036-8075. Citado na página 5.

CLARKE, H. F.; HILL, G. J.; ROBBINS, T. W.; ROBERTS, A. C. Dopamine, But Not Serotonin, Regulates Reversal Learning in the Marmoset Caudate Nucleus. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 11, p. 4290–4297, mar 2011. ISSN 0270-6474. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5066-10.2011>. Citado na página 5.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Exudate-eating and tree-gouging in marmosets. *Nature*, v. 262, p. 630–630, 1976. ISSN 0028-0836. Citado na página 1.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. a. Tree-Gouging, Exudate-eating and the "short-tusked"conditions in Calithrix ans Cebeulla. In: KLEIMAN, D. (Ed.). *The biology and conservation of the Callitrichidae*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, 1977. p. 105–115. Citado na página 1.

CROFTS, H. S.; MUGGLETON, N. G.; BOWDITCH, a. P.; PEARCE, P. C.; NUTT, D. J.; SCOTT, E. a. Home cage presentation of complex discrimination tasks to marmosets and rhesus monkeys. *Laboratory animals*, v. 33, p. 207–214, 1999. ISSN 0023-6772. Citado na página 4.

CURTHS, C.; KNAUF, S.; KAUP, F.-j. Respiratory Animal Models in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Veterinary Sciences*, v. 1, p. 63–76, 2014. Citado na página 3.

D'AUSILIO, A. Arduino: A low-cost multipurpose lab equipment. *Behavior Research Methods*, v. 44, n. 2, p. 305–313, 2012. ISSN 1554-3528. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3758/s13428-011-0163-z>. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 37.

DECHARMS, R. C.; MERZENICH, M. M. Primary cortical representation of sounds by the coordination of action-potential timing. v. 381, n. 6583, p. 610–613, 1996. ISSN 0028-0836. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 31.

DIMATTINA, C.; WANG, X. Virtual vocalization stimuli for investigating neural representations of species-specific vocalizations. *Journal of neurophysiology*, v. 95, n. 2, p. 1244–62, feb 2006. ISSN 0022-3077. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207780>. Citado 10 vezes nas páginas 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 43 e 45.

ELIADES, S. J.; WANG, X. Chronic multi-electrode neural recording in free-roaming monkeys. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 172, n. 2, p. 201–214, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 31.

ELIADES, S. J.; WANG, X. Neural substrates of vocalization feedback monitoring in primate auditory cortex. *Nature*, v. 453, n. 7198, p. 1102–6, jun 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454135>. Citado na página 31.

EPPLE, G. Comparative studies on vocalization in marmoset monkeys (Hapalidae). *Folia primatologica; international journal of primatology*, v. 8, p. 1–40, 1968. ISSN 0015-5713. Citado 5 vezes nas páginas 2, 4, 7, 9 e 11.

ESLAMBOLI, A. Marmoset monkey models of Parkinson's disease: Which model, when and why? *Brain Research Bulletin*, v. 68, p. 140–149, 2005. ISSN 03619230. Citado na página 4.

FERRIS, C. F.; SNOWDON, C. T.; KING, J. a.; SULLIVAN, J. M.; ZIEGLER, T. E.; OLSON, D. P.; SCHULTZ-DARKEN, N. J.; TANNENBAUM, P. L.; LUDWIG, R.; WU, Z.; EINSPANIER, A.; VAUGHAN, J. T.; DUONG, T. Q. Activation of neural pathways associated with sexual arousal in non-human primates. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*, v. 19, n. 2, p. 168–175, 2004. ISSN 1053-1807. Citado na página 2.

FREIRE, M. A. M.; MORYA, E.; FABER, J.; SANTOS, J. R.; GUIMARAES, J. S.; LEMOS, N. a. M.; SAMESHIMA, K.; PEREIRA, A.; RIBEIRO, S.; NICOLELIS, M. A. L. Comprehensive analysis of tissue preservation and recording quality from chronic multielectrode implants. *PloS one*, v. 6, n. 11, p. e27554, jan 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3212580{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado 3 vezes nas páginas 20, 23 e 25.

GARBER, P. A. Vertical clinging, small body size, and the evolution of feeding adaptations in the Callitrichinae. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 88, n. 4, p. 469–482, 1992. ISSN 00029483. Citado na página 1.

GARBER, P. A. One for All and Breeding for One: Cooperation and Competition as a Tamarin Reproductive Strategy. *Evolutionary Anthropology*, v. 5, n. 6, p. 187–199, 1997. ISSN 10601538. Citado na página 2.

GERVEN, M. van; FARQUHAR, J.; SCHAEFER, R.; VLEK, R.; GEUZE, J.; NIJHOLT, A.; RAMSEY, N.; HASELAGER, P.; VUURPIJL, L.; GIELEN, S.; DESAIN, P. The brain-computer interface cycle. *Journal of neural engineering*, v. 6, n. 4, p. 041001, Aug 2009. ISSN 1741-2552. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622847>. Citado na página 19.

GOSLING, L. M. A reassessment of the function of scent marking in territories. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, v. 60, p. 89–118, 1982. ISSN 0044-3573. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0310.1982.tb00492.x$\delimiter"026E30F$nhttp://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0310.1982.tb00492.x/abstract>. Citado na página 2.

GRIFFITH, R. W.; HUMPHREY, D. R. Long-term gliosis around chronically implanted platinum electrodes in the Rhesus macaque motor cortex. *Neuroscience letters*, v. 406, n. 1-2, p. 81–6, oct 2006. ISSN 0304-3940. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905255>. Citado na página 19.

GUNHOLD, T.; WHITEN, A.; BUGNYAR, T.; GUNHOLD, T. Video demonstrations seed alternative problem-solving techniques in wild common marmosets. *Biology letters*, v. 10, 2014. Citado na página 5.

HALSEY, L. G.; BEZERRA, B. M.; SOUTO, A. S. Can wild common marmosets (*Callithrix jacchus*) solve the parallel strings task? *Animal Cognition*, v. 9, p. 229–233, 2006. ISSN 14359448. Citado na página 4.

HOOGERWERF, A. C.; WISE, K. D. A three-dimensional microelectrode array for chronic neural recording. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, v. 41, n. 12, p. 1136–46, dec 1994. ISSN 0018-9294. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7851915>. Citado na página 19.

HUBER, L.; VOELKL, B. Social and Physical Cognition in Marmosets and Tamarins. In: FORD, S.; PORTER, L.; DAVIS, L. (Ed.). *The Smallest Anthropoids: The masmoset/callimico radiation.* New York: Springer Press, 2009. cap. 10, p. 183–201. Citado 2 vezes nas páginas 4 e 5.

JACKSON, M. J.; SMITH, L. A.; AL-BARGHOUTHY, G.; ROSE, S.; JENNER, P. Decreased expression of l-dopa-induced dyskinesia by switching to ropinirole in MPTP-treated common marmosets. *Experimental Neurology*, v. 204, n. 1, p. 162–170, 2007. ISSN 00144886. Citado na página 4.

JONES, B. S.; HARRIS, D. H. R.; CATCHPOLE, C. K. The stability of the vocal signature in phee calls of the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *American Journal of Primatology*, v. 31, p. 67–75, 1993. ISSN 0275-2565. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajp.1350310107>. Citado na página 8.

KENDALL, A. L.; RAYMENT, F. D.; TORRES, E. M. Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nature medicine*, v. 4, p. 727–729, 1998. Disponível em: <http://www.nature.com/nm/journal/v4/n6/abs/nm0698-727.html>. Citado na página 4.

KOENIG, A. Random scan, sentinels or sentinel system? A study in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Current primatology*, v. 2, p. 69–76, 1994. Citado na página 2.

KOENIG, A. Group size, composition, and reproductive success in wild common marmosets (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology*, v. 35, p. 311–317, 1995. ISSN 0275-2565. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajp.1350350407>. Citado na página 2.

KRALIK, J. D.; DIMITROV, D. F.; KRUPA, D. J.; KATZ, D. B.; COHEN, D.; NICOLELIS, M. A. Techniques for long-term multisite neuronal ensemble recordings in behaving animals. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 25, n. 2, p. 121–150, 2001. ISSN 1046-2023. Citado na página 23.

LAZARO-PEREA, C.; SNOWDON, C. T.; ARRUDA, M. F. Scent-marking behavior in wild groups of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 46, p. 313–324, 1999. ISSN 0340-5443. Citado na página 2.

LU, T.; LIANG, L.; WANG, X. Temporal and rate representations of time-varying signals in the auditory cortex of awake primates. *Nature neuroscience*, v. 4, n. 11, p. 1131–1138, 2001. ISSN 1097-6256. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 31.

MACLEAN, C. J.; GAFFAN, D.; BAKER, H. F.; RIDLEY, R. M. Visual discrimination learning impairments produced by combined transections of the anterior temporal stem, amygdala and fornix in marmoset monkeys. *Brain Research*, v. 888, p. 34–50, 2001. ISSN 00068993. Citado na página 5.

MANSFIELD, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comparative Medicine*, v. 53, n. 4, p. 383–392, 2003. ISSN 15320820. Citado na página 3.

MARATOS, E. C.; JACKSON, M. J.; PEARCE, R. K. B.; JENNER, P. Antiparkinsonian activity and dyskinesia risk of ropinirole and L-DOPA combination therapy in drug naive MPTP-lesioned common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Movement Disorders*, v. 16, n. 4, p. 631–641, 2001. ISSN 08853185. Citado na página 4.

MENDES, N.; HUBER, L. Object permanence in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Journal of comparative psychology*, v. 118, n. 1, p. 103–112, 2004. ISSN 0735-7036. Citado na página 4.

MENDESPONTES, A. R.; MONTEIRODACRUZ, M. A. O. Home range, intergroup transfers, and reproductive status of common marmosets *Callithrix jacchus* in a forest fragment in North-Eastern Brazil. *Primates*, v. 36, n. July, p. 335–347, 1995. ISSN 00328332. Citado na página 2.

MITCHELL, J. F.; REYNOLDS, J. H.; MILLER, C. T. Active vision in marmosets: a model system for visual neuroscience. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 34, n. 4, p. 1183–94, 2014. ISSN 1529-2401. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3898283{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 5.

MOSHAYEDI, P.; NG, G.; KWOK, J. C. F.; YEO, G. S. H.; BRYANT, C. E.; FAWCETT, J. W.; FRANZE, K.; GUCK, J. The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials*, Elsevier Ltd, v. 35, n. 13, p. 3919–3925, apr 2014. ISSN 1878-5905. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24529901>. Citado na página 23.

NAKAKO, T.; MURAI, T.; IKEJIRI, M.; ISHIYAMA, T.; TAIJI, M.; IKEDA, K. Effects of a dopamine D1 agonist on ketamine-induced spatial working memory dysfunction in common marmosets. *Behavioural Brain Research*, Elsevier B.V., v. 249, p. 109–115, 2013. ISSN 01664328. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.012>. Citado na página 5.

NICOLELIS, M. A. L.; RIBEIRO, S. Multielectrode recordings: the next steps. *Current opinion in neurobiology*, v. 12, n. 5, p. 602–6, Oct 2002. ISSN 0959-4388. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367642>. Citado na página 19.

OKANO, H.; HIKISHIMA, K.; IRIKI, A.; SASAKI, E. The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, Elsevier Ltd, v. 17, n. 6, p. 336–340, 2012. ISSN 1744165X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2012.07.002>. Citado na página 4.

OKANO, H.; MITRA, P. Brain-mapping projects using the common marmoset. *Neuroscience Research*, Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society, 2014. ISSN 0168-0102. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.08.014>. Citado na página 4.

OSMANSKI, M. S.; WANG, X. Measurement of absolute auditory thresholds in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Hearing Research*, v. 277, n. 1-2, p. 127–133, jul 2011. ISSN 03785955. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303689>. Citado na página 52.

PEARCE, P. C.; CROFTS, H. S.; MUGGLETON, N. G.; SCOTT, E. a. M. Concurrent monitoring of EEG and performance in the common marmoset: A methodological approach. *Physiology and Behavior*, v. 63, n. 4, p. 591–599, 1998. ISSN 00319384. Citado na página 4.

PRASAD, A.; XUE, Q.-S.; DIEME, R.; SANKAR, V.; MAYRAND, R. C.; NISHIDA, T.; STREIT, W. J.; SANCHEZ, J. C. Abiotic-biotic characterization of Pt/Ir microelectrode arrays in chronic implants. *Frontiers in neuroengineering*, v. 7, n. February, p. 2, Jan 2014. ISSN 1662-6443. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3912984{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado 4 vezes nas páginas 19, 20, 23 e 24.

PRASAD, A.; XUE, Q.-S.; SANKAR, V.; NISHIDA, T.; SHAW, G.; STREIT, W. J.; SANCHEZ, J. C. Comprehensive characterization and failure modes of tungsten microwire arrays in chronic neural implants. *Journal of neural engineering*, v. 9, n. 5, p. 056015, oct 2012. ISSN 1741-2552. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010756>. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 23.

REMINGTON, E. D.; OSMANSKI, M. S.; WANG, X. An operant conditioning method for studying auditory behaviors in marmoset monkeys. *PloS one*, v. 7, n. 10, p. e47895, Jan 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3480461{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado 4 vezes nas páginas 5, 31, 50 e 52.

ROBERTS, a. C.; ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J.; MUIR, J. L. A specific form of cognitive rigidity following excitotoxic lesions of the basal forebrain in marmosets. *Neuroscience*, v. 47, n. 2, p. 251–264, 1992. ISSN 03064522. Citado na página 5.

ROMANSKI, L.; GOLDMAN-RAKIC, P. An auditory domain in primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci.*, v. 5, n. 1, p. 15–16, 2002. Citado na página 45.

ROSA, M. G. P.; PALMER, S. M.; GAMBERINI, M.; BURMAN, K. J.; YU, H.-H.; RESER, D. H.; BOURNE, J. a.; TWEEDALE, R.; GALLETTI, C. Connections of the dorsomedial visual area: pathways for early integration of dorsal and ventral streams in extrastriate cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 29, n. 14, p. 4548–4563, 2009. ISSN 0270-6474. Citado na página 5.

ROUSCHE, P. J.; NORMANN, R. a. Chronic recording capability of the Utah Intracortical Electrode Array in cat sensory cortex. *Journal of neuroscience methods*, v. 82, n. 1, p. 1–15, jul 1998. ISSN 0165-0270. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223510>. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 24.

ROY, S.; WANG, X. Wireless multi-channel single unit recording in freely moving and vocalizing primates. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 203, n. 1, p. 28–40, jan 2012. ISSN 01650270. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027011005267>. Citado na página 31.

RYLANDS, A.; COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. The Systematics and Distributions of the Marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebeulla*, and *Mico*) and Callimico (*Callimico*)(Callitrichidae, Primates). In: DAVIS, L.; FORD, S.; PORTER, L. (Ed.). *The*

Smallest Anthropoids: The masmoset/callimico radiation. New York: Springer Press, 2009. cap. 2, p. 25–61. ISBN 978-1-4419-0292-4. Citado na página 1.

SANKAR, V.; PATRICK, E.; DIEME, R.; SANCHEZ, J. C.; PRASAD, A.; NISHIDA, T. Electrode impedance analysis of chronic tungsten microwire neural implants: understanding abiotic vs. biotic contributions. *Frontiers in neuroengineering*, v. 7, n. May, p. 13, jan 2014. ISSN 1662-6443. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4021112{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 19.

SANTANA, M. B.; HALJE, P.; SIMPLÍCIO, H.; RICHTER, U.; FREIRE, M. A. M.; PETERSSON, P.; FUENTES, R.; NICOLELIS, M. A. Spinal Cord Stimulation Alleviates Motor Deficits in a Primate Model of Parkinson Disease. *Neuron*, v. 84, n. 4, p. 716–722, nov 2014. ISSN 08966273. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627314008964>. Citado na página 4.

SASAKI, E.; SUEMIZU, H.; SHIMADA, A.; HANAZAWA, K.; OIWA, R.; KAMIOKA, M.; TOMIOKA, I.; SOTOMARU, Y.; HIRAKAWA, R.; ETO, T.; SHIOZAWA, S.; MAEDA, T.; ITO, M.; ITO, R.; KITO, C.; YAGIHASHI, C.; KAWAI, K.; MIYOSHI, H.; TANIOKA, Y.; TAMAOKI, N.; HABU, S.; OKANO, H.; NOMURA, T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, v. 459, n. 7246, p. 523–7, 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478777>. Citado na página 4.

SMITH, D.; TRENNERY, P.; FARNINGHAM, D.; KLAPWIJK, J. The selection of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) in pharmaceutical toxicology. *Laboratory animals*, v. 35, n. November, p. 117–130, 2001. ISSN 0023-6772. Citado na página 3.

SMITH, T. E. Individual Olfactory Signatures in Commo Marmosets (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology*, v. 1222, n. August 2005, p. 585–604, 2006. Citado na página 2.

SPINELLI, S.; PENNANEN, L.; DETTLING, A. C.; FELDON, J.; HIGGINS, G. A.; PRYCE, C. R. Performance of the marmoset monkey on computerized tasks of attention and working memory. *Cognitive Brain Research*, v. 19, p. 123–137, 2004. ISSN 09266410. Citado na página 4.

STEVENS, J. R.; WOOD, J. N.; HAUSER, M. D. When quantity trumps number: Discrimination experiments in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) and common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Animal Cognition*, v. 10, p. 429–437, 2007. ISSN 14359448. Citado na página 4.

STEVENSON, M. F.; POOLE, T. B. An ethogram of the common marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*): general behavioural repertoire. *Animal behaviour*, v. 24, p. 428–451, 1976. ISSN 00033472. Citado na página 2.

SZAROWSKI, D. H.; ANDERSEN, M. D.; RETTERER, S.; SPENCE, A. J.; ISAACSON, M. Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Research*, v. 983, p. 23–35, 2003. Citado na página 23.

TARDIF, S.; SMUCNY, D. Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comparative Medicine*, v. 53, n. 4, p. 364–368, 2003. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2003/00000053/00000004/art00005>. Citado na página 2.

TSUJIMOTO, S.; SAWAGUCHI, T. Working memory of action: A comparative study of ability to selecting response based on previous action in New World monkeys (*Saimiri sciureus* and *Callithrix jacchus*). *Behavioural Processes*, v. 58, p. 149–155, 2002. ISSN 03766357. Citado na página 4.

TURNER, J. N.; SHAIN, W.; SZAROWSKI, D. H.; ANDERSEN, M.; MARTINS, S.; ISAACSON, M.; CRAIGHEAD, H. Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants. *Experimental neurology*, v. 156, n. 1, p. 33–49, mar 1999. ISSN 0014-4886. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10192775>. Citado na página 19.

WALDERT, S.; PISTOHL, T.; BRAUN, C.; BALL, T.; AERTSEN, A.; MEHRING, C. A review on directional information in neural signals for brain-machine interfaces. *Journal of physiology - Paris*, Elsevier Ltd, v. 103, n. 3-5, p. 244–54, 2009. ISSN 1769-7115. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665554http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2009.08.007>. Citado na página 19.

WANG, X.; KADIA, S. C. Differential representation of species-specific primate vocalizations in the auditory cortices of marmoset and cat. *Journal of neurophysiology*, v. 86, n. 5, p. 2616–20, nov 2001. ISSN 0022-3077. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698547>. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 31.

WANG, X.; LU, T.; SNIDER, R. K.; LIANG, L. Sustained firing in auditory cortex evoked by preferred stimuli. *Nature*, v. 435, n. May, p. 341–346, 2005. ISSN 0028-0836. Citado 3 vezes nas páginas 4, 5 e 31.

WANG, X.; MERZENICH, M. M.; BEITEL, R.; SCHREINER, C. E. Representation of a species-specific vocalization in the primary auditory cortex of the common marmoset: temporal and spectral characteristics. *Journal of neurophysiology*, v. 74, n. 6, p. 2685–2706, 1995. ISSN 0022-3077. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 31.

WISLOCKI, G. A Study of Scent Glands in the Marmosets, Especially Oedipomidas geoffroyi. *American Society of Mammalogist*, v. 11, n. 4, p. 475–483, 1930. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/1373970>. Citado na página 2.

WORLEY, K. C.; WARREN, W. C.; ROGERS, J.; LOCKE, D.; MUZNY, D. M.; MARDIS, E. R.; WEINSTOCK, G. M.; TARDIF, S. D.; AAGAARD, K. M.; ARCHIDIACONO, N.; RAYAN, N. A.; BATZER, M. a.; BEAL, K.; BREJOVA, B.; CAPOZZI, O.; CAPUANO, S. B.; CASOLA, C.; CHANDRABOSE, M. M.; CREE, A.; DAO, M. D.; JONG, P. J. de; ROSARIO, R. C.-H. del; DELEHAUNTY, K. D.; DINH, H. H.; EICHLER, E. E.; FITZGERALD, S.; FLICEK, P.; FONTENOT, C. C.; FOWLER, R. G.; FRONICK, C.; FULTON, L. A.; FULTON, R. S.; GABISI, R. A.; GERLACH, D.; GRAVES, T. a.; GUNARATNE, P. H.; HAHN, M. W.; HAIG, D.; HAN, Y.; HARRIS, R. A.; HERRERO, J.; HILLIER, L. W.; HUBLEY, R.; HUGHES, J. F.; HUME, J.; JHANGIANI, S. N.;

JORDE, L. B.; JOSHI, V.; KARAKOR, E.; KONKEL, M. K.; KOSIOL, C.; KOVAR, C. L.; KRIVENTSEVA, E. V.; LEE, S. L.; LEWIS, L. R.; LIU, Y.-s.; LOPEZ, J.; LOPEZ-OTIN, C.; LORENTE-GALDOS, B.; MANSFIELD, K. G.; MARQUES-BONET, T.; MINX, P.; MISCEO, D.; MONCRIEFF, J. S.; MORGAN, M. B.; NAZARETH, L. V.; NEWSHAM, I.; NGUYEN, N. B.; OKWUONU, G. O.; PRABHAKAR, S.; PERALES, L.; PU, L.-L.; PUENTE, X. S.; QUESADA, V.; RANCK, M. C.; RANEY, B. J.; RAVEENDRAN, M.; DEIROS, D. R.; ROCCHI, M.; RODRIGUEZ, D.; ROSS, C.; RUFFIER, M.; RUIZ, S. J.; SAJJADIAN, S.; SANTIBANEZ, J.; SCHRIDER, D. R.; SEARLE, S.; SKALETSKY, H.; SOIBAM, B.; SMIT, A. F. a.; TENNAKOON, J. B.; TOMASKA, L.; ULLMER, B.; VEJNAR, C. E.; VENTURA, M.; VILELLA, A. J.; VINAR, T.; VOGEL, J.-H.; WALKER, J. a.; WANG, Q.; WARNER, C. M.; WILDMAN, D. E.; WITHERSPOON, D. J.; WRIGHT, R. a.; WU, Y.; XIAO, W.; XING, J.; ZDOBNOV, E. M.; ZHU, B.; GIBBS, R. a.; WILSON, R. K. The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. *Nature genetics*, v. 46, n. 8, p. 850–7, 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng.3042$\delimiter"026E30F$nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25038751>. Citado na página 4.

YAMAZAKI, Y.; ECHIGO, C.; SAIKI, M.; INADA, M.; WATANABE, S.; IRIKI, A. Tool-use learning by common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Experimental Brain Research*, v. 213, p. 63–71, 2011. ISSN 00144819. Citado na página 4.

YAMAZAKI, Y.; WATANABE, S. Marmosets as a next-generation model of comparative cognition. *Japanese Psychological Research*, v. 51, n. 3, p. 182–196, 2009. ISSN 00215368. Citado na página 2.

Anexos

NEURONAL SIGNAL DESCRIPTION AFTER CHRONIC STAINLESS STEEL MICROELECTRODE ARRAY IMPLANTS IN MARMOSETS

Ribeiro, M. W.*, Santana, M.B.* e Araújo, M.F.P.*

*Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience of Natal, Brazil
e-mail: mauricio.watanabe@gmail.com

Abstract: A main challenge in the development of invasive brain machine interfaces is the designing of electrodes that provide reliable neural sampling throughout the life of an individual. A first step in accomplishing that involves the characterization of signal after chronic implant of different types of electrodes. In this study, stainless steel microelectrodes were implanted in 2 marmoset monkeys. The total number, the firing rate and amplitude of the recorded units in 4 periods throughout the experiment (1, 4, 14 and 27 weeks after implantation) was assessed and compared. There was a great increase in the first 4 weeks after implantation followed by a continuous decrease in the total number of recorded neurons. In addition, the firing rate of the remaining units and the peak-to-peak amplitude of the signal did not decline over time. Together, these findings indicate that stainless steel electrodes can be reliably used to record neuronal activity in marmosets for at least 27 weeks.

Keywords: stainless steel microelectrodes, chronic recordings, brain-machine interfaces, common marmosets

Introduction

Brain-machine interfaces (BMIs) are functional interfaces between the brain and other devices designed to restore motor function after injury or neurodegenerative diseases. These interfaces work through the acquisition and processing of brain activity. BMIs can use either non-invasive or invasive methods for acquiring the neural signal. Noninvasive techniques, such as electroencephalogram (EEG), are able to capture the neural signal outside the cranium and therefore can be readily used in any patient, without previous surgery. This signal reflects the sum of several neuron activity, having a relatively good temporal but a poor spatial resolution [1]. Invasive techniques, such as microelectrode implants, require surgical intervention but allow the recording of single units activity with higher spatial and temporal resolution [2]. A main challenge in the development of invasive BMIs is the designing of electrodes that provide reliable neural sampling for long periods, preferentially throughout the life of an individual. Previous studies have shown that usually after a few months the quality of the signal decreases considerably and eventually ceases completely [3]–[5]. Such decrease may be related to abiotic factors, such as electrode corrosion or oxidation [6], [7], or to the interaction of the brain tissue with the electrodes. It has been shown, for example, that there is an inflammatory response following implantation in the tissue surrounding the electrodes that progressively encapsulate them [5], [8], [9]. Different kinds of microelectrodes may interact with brain tissue in different ways, leading to differences in the quality of the signal recorded over extended periods. The full characterization of signal quality and reliability over time with different electrode designs and materials is therefore essential for the future development of long lasting microelectrodes. To date, most of the available data come from studies in rodents [6], [10], [11]. As non-human primates are phylogenetically closer to humans, the interaction between their brain tissue and microelectrode implants are more likely to resemble the ones that would probably occur in the human brain. In this study, the neuronal signal after stainless steel microelectrode arrays implantation in 2 marmosets (*Callithrix jacchus*) was assessed over 27 weeks.

Materials and Methods

Subjects – Two adult male marmoset monkeys were used in this study. All procedures were in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were previously approved by the Alberto Santos Dumont Association for Research Support Ethics Commitee for animal use.

Microelectrodes – In each animal, 2 microelectrode arrays with 27 channels each were symmetrically implanted, one in each brain hemisphere. These arrays were made of stainless steel microwires (diameter: 50 μm) separated from each other by 300 μm. They were designed to simultaneously record 6 brain areas: primary motor cortex (M1), putamen (PUT), primary somatosensory cortex (S1), ventrolateral thalamic nucleus (VL), ventroposterior lateral thalamic nucleus (VPL) and subthalamic nucleus (STN) (Fig. 1, Table 1).

Recording Procedures – The recording sessions started one week after the implantation. These sessions were made during 27 weeks and were performed while the animals were awake and freely moving in an open field (45 x 45 x 45 cm). Single-unit activity (spikes) was acquired by an OmniPlex D Neural Data Acquisition System (Plexon Inc., TX, USA). The signal was

amplified, high-pass filtered with a cut-off frequency of 600 Hz and digitized at 16 bits and 40 kHz in 800 µs epochs around samples that crossed a threshold determined by the experimenter. Waveforms with a signal-to-noise ratio greater than 2.5 were sorted online. Later, offline analysis (Offline Sorter v3.3.2, Plexon Inc., TX, USA) was performed to validate online sorting, according to two main criteria: stereotypy of waveform shapes (determined by a waveform template and principal component analysis) and inter-spike interval (<0.1% of inter-spike intervals smaller than 1ms).

Table 1: Coordinates (relative to interaural line) of the recording target areas.

Area	AP (mm)	ML(mm)	DV(mm)
M1	10.0	6.5	14.4
PUT	8.5	6.5	11.5
S1	8.0	5.2	15.6
VL	5.5	3.7	10.0
VPL	4.5	3.7	7.3
STN	5.5	3.7	7.3

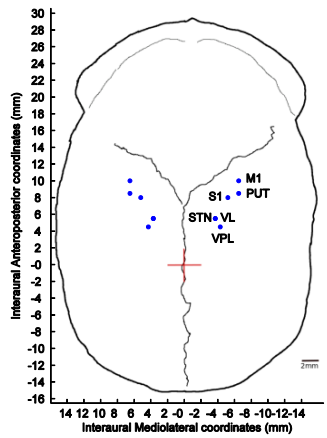
Signal Analysis – The total number, the mean firing rate and the peak-to-peak amplitude of units sorted in the recording sessions from the 1st, 4th, 14th and 27th weeks after microelectrode implantation were determined and compared. The mean firing rate (spikes/s) of each neuron was obtained by dividing the number of spikes by the total time of a recording session. Statistical analyses were performed for the brain areas in which at least 3 neurons were recorded in at least 3 of the analyzed periods. The peak-to-peak amplitude was determined by the difference between the highest and lowest values of the representative waveform of each sorted unit. All comparisons were performed by Friedman test. The significance criterion was set at $p<0.05$. Post hoc analysis with Wilcoxon signed-rank tests were conducted with a Bonferroni correction applied, resulting in a significance level set at $p<0.0083$.

Results

Units – There was an initial rise followed by a reduction in the number of recorded units (Fig.2). In both animals, the total number of neurons 4 weeks after implantation doubled (animal K, from 6 to 14 units) or tripled (animal D, from 15 to 48 units) compared to the first week. In the subsequent weeks, the number of neurons continuously decreased. By the end of the 27th week, there was a decrease of 92.8% (animal K) and 66.7% (animal D) in the total number of units compared to the 4th week (Fig. 2).

Firing Rate – Despite the changes in number of recorded units over time, there were no significant differences in the mean firing rate over time in each brain region analyzed: VL, STN and VPL for animal K (Fig. 3a) and M1, Put, S1, VL and STN for animal D (Fig. 3b). Fig. 3c shows the mean firing rate of the units over time in all recorded brain areas of animal D.

(a)



(b)

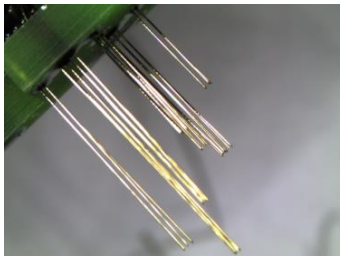


Figure 1: (a) Schematic of a marmoset cranium (top view) with the anteroposterior (AP) and medio-lateral (ML) coordinates of the targeted areas shown in blue. (b) Example of a stainless steel microelectrode array.

Mean Amplitude – The overall peak-to-peak amplitude of the neuronal signal was relatively stable across weeks. In animal K, the amplitude did not vary significantly over time (Fig. 4a). In animal D the mean amplitude was significantly lower in the first week, increasing after the 4th week after implantation [$\chi^2(3)=28.040$, $p<0.001$] and remaining relatively stable in the subsequent weeks (Fig. 4b). Fig. 4c depicts an example of the amplitude of an unit recorded in the M1 of animal D over weeks.

Discussion

In the present study, stainless steel microelectrodes were implanted in 2 marmoset monkeys. The neuronal activity was recorded during 27 weeks and the quality of the signal, expressed by the total number, the mean firing rate and the amplitude of recorded units over time, was determined in the 1st, 4th, 14th and 27th weeks after implantation.

There was an increase in the first 4 weeks after implantation followed by a continuous decrease in the number of recorded neurons. Neuronal signals,

however, were still detected after 27 weeks of the surgery. This pattern has been previously described in studies using a variety of microelectrodes [6],[11], [12] and is thought to reflect inflammatory response to the presence of electrodes in the brain [8], [13]. After the

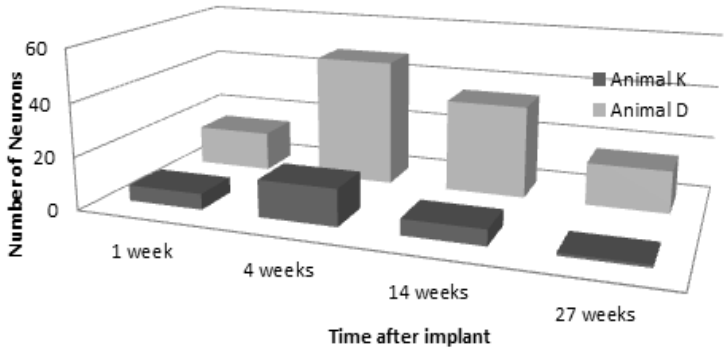


Figure 2: Number of recorded units in each animal (K and D) along weeks.

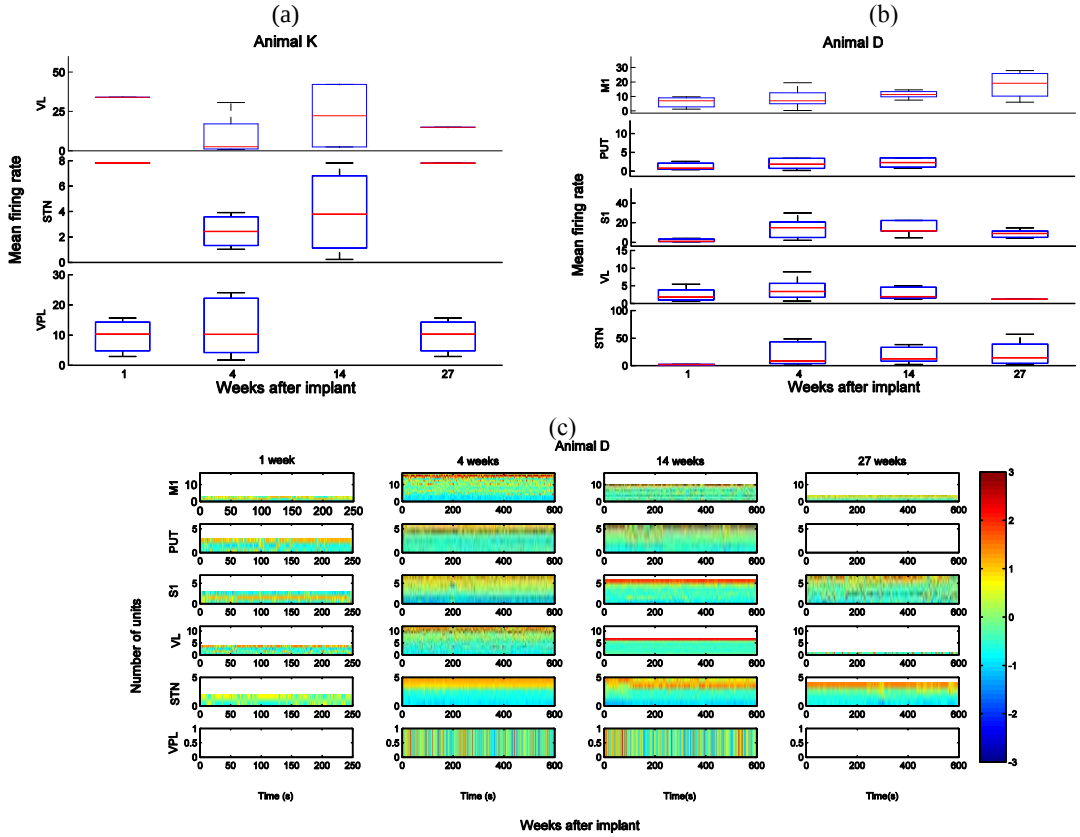


Figure 3. Neuronal firing rates of the units recorded throughout the experiment. Box plots of firing rates of all units of VL, STN and VPL of animal K (a) and all units of M1, PUT, S1, VL and STN of animal D (b). In (c) z-scored firing rates of each brain area during recording sessions in 1st, 4th, 14th and 27th weeks after implantation.

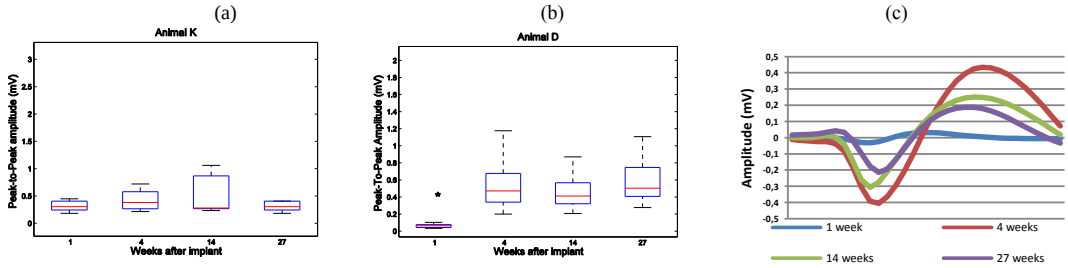


Figure 4: (a and b) Peak-to-Peak amplitude of units recorded in each animal over implantation time *($p<0.001$). (c) Sample waveform recorded from the same channel in M1 across weeks in animal D.

implantation, the defense cells of the nervous system (mainly microglia and astrocites) are locally activated and are progressively deposited around the electrodes, encapsulating them [14]. The decrease in number of recorded units may also reflect neuronal death, which can be induced by microglial activation [8]. Some studies, however, suggest that the inflammatory response of the brain tissue has no correlation with signal quality and that other factors, such as intraparenchimal bleeding or electrode deterioration may better account for decreases in it [10]. Future histological analyses of the brain tissue of the 2 monkeys used in the present study may shed some light into this discussion.

In contrast with number of recorded units, the firing rate of the remaining units did not vary across weeks. Similarly, the peak-to-peak amplitude did not decrease over time. The only significant variation was in the peak-to-peak amplitude of animal D: it was significantly lower in the first week post implantation. Together, these data suggest that the quality of the signal that could still be recorded throughout the experiment did not substantially decrease. Similar results were previously described for silicon [5] and platinum/Iridium arrays [6]. Another study, however, found that the mean firing rate of neurons recorded with tungsten electrodes decreased over time [11]. Such differences might be related to differences in microelectrode material and manufacturing.

Altogether, the findings of the present study indicate that, despite decreases in number of units over time, chronically implanted stainless steel electrodes can be used to reliably record the neuronal signal in marmosets for at least 27 weeks. Further studies are necessary to determine the causes of the reduction in the number of neurons recorded and how differences in electrode manufacturing or in the surgery procedures may affect the quality of the signal recorded throughout longer periods.

Acknowledgments

This project was supported by the INCEMAQ, a National Institutes of Science and Technology program (INCTs) of the national Council for Scientific and Technological Development (CNPq/MCTI), the Brazilian Innovation Agency (FINEP), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Alberto Santos Dumont Association for Research Support (AASDAP).

References

[1] van Gerven M, Farquhar J, Schaefer R, Vlek R, Geuze J, Nijholt A, Ramsey N, Haselager P, Vuurpijl L, Gielen S, Desain P. The brain-computer interface cycle. Journal of neural engineering. 2009;6(4):041001.

[2] Waldert S, Pistohl T, Braun C, Ball T, Aertsen A, Mehring C, A review on directional information in neural signals for brain-machine interfaces. Journal of Physiology. 2009;103(3-5): 244–54.

[3] Hoogerwerf C and Wise KD. A three-dimensional microelectrode array for chronic neural recording. IEEE transactions on bio-medical engineering. 1994;41(12):1136–46.

[4] Turner JN, Shain W, Szarowski DH, Andersen M, Martins S, Isaacson M, Craighead H. Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants.Experimental neurology.1999;156(1):33-49

[5] Rousche PJ and Normann R. “Chronic recording capability of the Utah Intracortical Electrode Array in cat sensory cortex.” Journal of neuroscience methods, vol. 82, no. 1, pp. 1–15, Jul. 1998.

[6] Prasad A, Xue QS, Dieme R, Sankar V, Mayrand RC, Nishida T, Streit WJ, Sanchez JC. Abiotic-biotic characterization of Pt/Ir microelectrode arrays in chronic implants. Frontiers in neuroengineering. 2014;7:2.

[7] Sankar V, Patrick E, Dieme R, Sanchez JC, Prasad A, Nishida T. Electrode impedance analysis of chronic tungsten microwire neural implants: understanding abiotic vs. biotic contributions. Frontiers in neuroengineering. 2014;7:13.

[8] Biran R, Martin DC, Tresco P. Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. Experimental neurology. 2005; 195(1): 115–26.

[9] Griffith RW and Humphrey DR. Long-term gliosis around chronically implanted platinum electrodes in the Rhesus macaque motor cortex. Neuroscience letters. 2006; 406(1-2):81–6.

[10] Prasad A, Xue QS, Sankar V, Nishida T, Shaw G, Streit WJ, Sanchez JC. Comprehensive characterization and failure modes of tungsten microwire arrays in chronic neural implants. Journal of neural engineering. 2012;9(5):56015.

[11] Freire MAM, Morya E, Faber J, Santos JR, Guimaraes JS, Lemos NM., Sameshima K, Pereira A, Ribeiro S, Nicolelis MAL. Comprehensive analysis of tissue preservation and recording quality from chronic multielectrode implants. PloS one 2011; 6(11): e27554.

[12] Nicolelis MAL, Dimitrov D, Carmena JM, Crist R, Lehew G, Kralik JD, Wise SP. Chronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.2003;100(19):11041-6.

[13] Szarowski DH, Andersen MD, Retterer S, Spence AJ, Isaacson M. Brain responses to micro-machined silicon devices. 2003 vol. 983,pp.23–35, 2003.

[14] Moshayedi P, Ng G, Kwok JCF, Yeo GSH, Bryant CE, Fawcett JW, Franze K, Guck J. The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. Biomaterials. 2014; 35(13): 3919–25.

Resumos publicados em anais de congressos

Ribeiro, M.W., Moioli, R.C., Brasil, F.L., Fuentes, R., Araújo, M.F.P. ANÁLISE DE PARÂMETROS ACÚSTICOS DE VOCALIZAÇÃO DE SAGUIS COMUNS (*Callithrix jachhus*). IX Reunião Regional da FeSBE, João Pessoa, 2014.

Artigo completo publicado em anais de congressos

Ribeiro, M.W., Santana, M.B. and Araújo, M.F.P. NEURAL SIGNAL DESCRIPTION AFTER CHRONIC STAINLESS STEEL MICROELECTRODE ARRAY IMPLANTS IN MARMOSETS. XXIV CBEB, Uberlândia, 2014.