

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós Graduação em Engenharia de Elétrica

Marta de Oliveira Barreiros

**Canal de Comunicação não Invasivo para
Transferência de Informações entre Grupos de
*Zebrafish***

São Luís - MA

2021

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós Graduação em Engenharia de Elétrica

Marta de Oliveira Barreiros

**Canal de Comunicação não Invasivo para Transferência de
Informações entre Grupos de *Zebrafish***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Engenharia Elétrica.

Orientador: Allan Kardec Duailibe Barros Filho

Coorientador: Sidarta Tollendal Gomes Ribeiro

São Luís - MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

de Oliveira Barreiros, Marta.

Comunicação não Invasivo para Transferência de
Informações entre Grupos de Zebrafish / Marta de Oliveira
Barreiros. - 2021.

154 f.

Coorientador(a): Sidarta Tollendal Gomes Ribeiro.

Orientador(a): Allan Kardec Duailibe Barros Filho.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Engenharia Elétrica/ccet, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2021.

1. Comportamento. 2. Redes Neurais Artificiais. 3.
Transferência de Informação. 4. Zebrafish. I. Duailibe
Barros Filho, Allan Kardec. II. Tollendal Gomes Ribeiro,
Sidarta. III. Título.

Marta de Oliveira Barreiros

**Canal de Comunicação não Invasivo para Transferência de
Informações entre Grupos de *Zebrafish***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Engenharia Elétrica.

Defesa da Tese São Luís - MA, 31 de Maio de 2021:

**Prof. Dr. Allan Kardec Duailibe
Barros Filho**
Orientador

**Prof. Dr. Sidarta Tollendal Gomes
Ribeiro**
Coorientador

Prof. Dr. Aristofanes Correa Silva
Membro da Banca Examinadora - UFMA

Prof. Dr. Francisco das Chagas Souza
Membro da Banca Examinadora - UFMA

**Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade
Paes**
Membro da Banca Examinadora - UFMA

**Prof. Dr. Eliza Maria da Costa Brito
Lacerda**
Membro da Banca Examinadora - CEUMA

Prof. Dr. Élcio de Souza Leal
Membro da Banca Examinadora - UFPA

São Luís - MA
2021

À minha família: minha base, minha inspiração, meu exemplo de vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, em Sua infinita graça, proporcionando-me as oportunidades, as pessoas, as conquistas, a força e a coragem de enfrentar os obstáculos para alcançar meus objetivos.

Aos meus orientadores: Prof. Allan Kardec Barros e Prof. Sidarta Ribeiro, pela oportunidade de aceite na orientação, permitindo a minha participação nessa linha de pesquisa, que é bastante desafiadora. Muito obrigada pela paciência, por suas diversas explicações e atenção nas minhas dúvidas.

À minha família, em especial minha mãe Mizabete e meu pai Ademar, pela força, pelo carinho, por sempre acreditar em mim, e por todos os ensinamentos de vida que ajudaram no meu caráter e crescimento. E, sempre me aconselhou que o melhor caminho era o estudo. À minha irmã Sheyla Priscilla que sempre esteve ao meu lado.

Aos colegas do laboratório de Processamento da Informação Biológica (PIB), que de maneira direta contribuíram para essa pesquisa, Daniel Luna, Diego Dantas, Felipe Gomes, Luís Oliveira, Rayanne Maria e Gisele Cutrim. Obrigada por me ajudar nos momentos difíceis, dando-me explicações de como eu poderia melhorar esse trabalho, e até mesmo, ajudando a construir os dispositivos dos experimentos. Em especial, Diego Dantas e Felipe Gomes, que foram as pessoas que mais gastaram do seu preciosíssimo tempo para me ajudar, sem nada em troca. Gomes, ajudou-me na primeira versão da sala experimental. E, o Diego me ajudou a reorganizar a última versão da sala experimental, ajudando também na escolher das melhores redes neurais, pois testamos várias, e cuidando dos peixes na minha ausência. E, mesmo não sendo parte de suas pesquisas, Diego e Gomes estiveram comigo até tarde da noite ou até mesmo finais de semana. Eu sei que não conseguirei retribuir tudo que eles fizeram e serei grata eternamente.

A todos os amigos do laboratório PIB e da pós graduação, em especial Vanessa Ellen, Letícia, Priscilla, Mirian Marcela, Poly Rocha, Gean Carlos, Davi, Caio Magno, Vanessa Edilene, George, Luís Fillype, Jonathan, Karla, Alcineide, Ribamar, Thiago, Eugênio, Ribamar, Jullyana e Camila Aboud, pelo companheirismo, discussões e momentos divertidos no laboratório, nas tarde de café científico, que levarei em minha memória.

Aos meus amigos, Diogenes Emerson, pelas discussões e apoio nos momentos difíceis; Leidiane, Leydiane, Glaicielly e Kamylla (a primeira pessoa a me receber em São Luís). E, ao Euclides, por ter me ajudado nos últimos dias de pesquisa.

Ao prof. Ridvan, coordenador de centro do CCET, que durante um ano de pesquisa concedeu-me a sala experimental, contribuindo para o andamento do meu trabalho. E, a todos da coordenação da PPGEE – UFMA, pela atenção e respeito aos alunos.

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que
a imaginação abrange o mundo inteiro”
“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes”
(Albert Einstein)*

RESUMO

A comunicação entre indivíduos teve enorme progresso com os avanços tecnológicos nos últimos anos. E, hoje já existe a possibilidade de um cérebro se comunicar diretamente a outro cérebro, usando uma interface cérebro-cérebro (*Brain-to-Brain Interface* - *BBI*). *BBI* é uma tecnologia capaz de transferir informações direta entre cérebros, combinando métodos de neuroimagem e neuroestimulação, onde são extraídos sinais neurais de um cérebro “emissor” e recodificado em um cérebro “receptor”. Apesar de existirem diferentes abordagens sobre a utilização dessa técnica, ainda não está totalmente claro sobre como a transferência de informação pode ser recebida pelo cérebro “receptor”. Por isso, neste trabalho é proposto um novo canal de comunicação, totalmente não invasivo, para transferir informações entre grupos de peixes, usando uma abordagem análoga a *BBI*. O canal de comunicação proposto usa como análise a posição de cada peixe e imagens de vídeo. Assim, a rede YOLOv2 e o filtro de *Kalman* serviram para obtenção da posição e rastreamento de cada peixe no tanque, obtendo o padrão do comportamento de um grupo de *zebrafish* durante as experiências, sendo esse padrão modulado para gerar informações transmitidas de um grupo de peixes para outro, sincronizando a comunicação entre aquários. Além disso, uma arquitetura de rede convolucional VGG-16 e rede recorrente LSTM usam uma sequência de imagens de vídeo para avaliar o comportamento dos peixes durante as atividades. Para testar o canal de comunicação foram criadas propostas de condicionamento apetitivo alimentar, onde os peixes deveriam se deslocar de um lado para outro de acordo com o estímulo ligado. E, enquanto isso, seu comportamento era avaliado por uma rede neural recorrente que classificava o comportamento em três condições comportamentais e, enviava um *feedback* para o grupo emissor. Para avaliar a resposta dos *zebrafish*, foi elaborado três estratégias: restrições totais, parciais e sem restrições. Os resultados mostraram que foi possível sincronizar uma informação bilateral, mostrando que os peixes receptores puderam responder com similaridade no comportamento dos grupos emissores da informação. Quantificou-se o desempenho do canal de comunicação em termos de quantidade de informações transmitidas, bem como a precisão da resposta dos peixes emissores e receptores, até atingir o objetivo da tarefa condicionada. Os resultados mostram que o canal de comunicação proposto é promissor e estendível para novas perspectivas comportamentais.

Palavras-chave: *Zebrafish*. Comportamento. Redes Neurais Artificiais. Transferência de Informação.

ABSTRACT

Communication between individuals has made tremendous progress with technological advances in recent years. And, today there is a possibility that a brain communicates directly to another brain, using a brain-brain interface. BBI is a technology capable of transferring direct information between brains, combining neuroimaging and neurostimulation methods, where neural signals are extracted from an “ emitting ” brain and recoded into a “ receiving ” brain. Although there are different approaches to using this technique, it is still not entirely clear about the effectiveness of BBI and how the transfer of information is received by the “receiving” brain. Therefore, this work proposes a new communication channel, totally non-invasive, to transfer information between groups of fish, using an approach analogous to BBI. The proposed communication channel uses the position of each fish and video images as an analysis. Thus, the YOLOv2 network and the Kalman filter served to obtain the position and tracking of each fish in the tank, obtaining the behavior pattern of a group of zebrafish during the experiments, this pattern being modulated for generate information transmitted from one group of fish to another, synchronizing communication between aquariums. In addition, a VGG-16 convolutional network architecture and LSTM recurrent network use a sequence of video images to assess the behavior of fish during activities. To test the communication channel, food appetite conditioning proposals were created, where the fish should move from side to side according to the connected stimulus. And, meanwhile, their behavior was assessed by a recurrent neural network that classified the behavior into three behavioral conditions and sent a feedback to the sending group. To assess the response of the zebrafish, three strategies were developed with total, partial and unrestricted restrictions. The results showed that it was possible to synchronize bilateral information, showing that the recipient fish were able to respond with similar behavior in the groups sending the information. The performance of the communication channel was quantified in terms of the amount of information transmitted, as well as the precision of the response of the sending and receiving fish, until reaching the objective of the conditioned task. The results show that the proposed communication channel is promising and extendable to new behavioral perspectives.

Keywords: Zebrafish. Behavior. Artificial Neural Networks. Information Transfer.

TRABALHOS PUBLICADOS

- BARREIROS, M. D. O.; BARBOSA, F. G.; DANTAS, D. D. O.; SANTOS, D. de M. L. dos; RIBEIRO, S.; SANTOS, G. C. de O.; BARROS, A. K. Zebrafish automatic monitoring system for conditioning and behavioral analysis. Scientific Reports, vol. 11, no. 1, p. 9330, 29 Dec. 2021. DOI 10.1038/s41598-021-87502-6. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-87502-6>.
- BARREIROS, M. de O.; DANTAS, D. de O.; SILVA, L. C. de O.; RIBEIRO, S.; BARROS, A. K. Zebrafish tracking using YOLOv2 and Kalman filter. Scientific Reports, vol. 11, no. 1, p. 3219, 5 Dec. 2021. DOI 10.1038/s41598-021-81997-9. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-021-81997-9>.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Componentes de um sistema BCI. A atividade cerebral é registrada pelos eletrodos localizados no couro cabeludo. Os sinais cerebrais são amplificados e digitalizados. As características do sinal são extraídas e depois convertidas em comandos para controlar um dispositivo de saída. BCI = interface cérebro-computador; ECoG = eletrocorticografia; EEG = eletroencefalografia. Adaptada de (SHIH; KRUSIENSKI; WOLPAW, 2012) 33
- Figura 2 – Fluxo da transferência de sinais sensório-motor usando BBI. Para uma tarefa motora bem-sucedida, o rato pressiona uma das duas alavancas para receber uma pequena recompensa (água), no instante que o estímulo visual é sinalizado por um LED (círculo vermelho). Enquanto isso, a atividade neural M1 é registrada e transmitida ao rato decodificador, comparando o padrão do M1 do codificador com um teste padrão (média da taxa de disparo de uma amostra experimental). Um Z-score é calculado a partir da diferença dos picos da atividade cerebral das tentativas experimentais com o teste padrão. Em seguida, o Z-score é convertido através de uma função sigmoide em um padrão de ICMS, onde os padrões de microestimulação variaram em tempo real. Após a entrega da microestimulação ao córtex M1 do rato decodificador, este animal seleciona a mesma alavanca pressionada pelo codificador. O rato codificador recebe um *feedback* da atividade motora efetuada corretamente pelo rato decodificador, e então ambos recebem uma recompensa. (PAIS-VIEIRA et al., 2013) 35
- Figura 3 – Estrutura básica de um neurônio biológico. Os componentes são os dendritos, responsáveis por receber os estímulos de outros neurônios conectados; o corpo celular do neurônio (soma), que coleta e combina informações vindas dos demais neurônios conectados; e o axônio, responsável por transmitir impulso nervoso para outra célula, formando uma sinapse. (AZEVEDO, 2016) 48
- Figura 4 – Neurônio Artificial (*Perceptron*). Os sinais externos de entrada são processados pelo neurônio, atribuindo pesos sinápticos e calculados pelo combinador linear, sendo sua saída limitada pela função de ativação. (HAYKIN, 2007). 49
- Figura 5 – Topologia da rede neural modelo *feedforward* (SILVA; SPATTI; FLAUSZINO, 2016) 50

Figura 6 – Topologia da rede neural modelo recorrente (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016)	51
Figura 7 – Arquitetura das Redes Neurais Multicamadas. A rede multicamada possui uma camada de entrada, pelo menos uma camada escondida e uma camada de saída. Todos os seus neurônios são conectados para o processamento dos dados. (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016)	52
Figura 8 – Arquitetura básica da rede neural recorrente LSTM. A LSTM possui uma estrutura em cadeia, contendo quatro redes neurais e diferentes blocos de memória chamados células. Os dados são inseridos na rede (número de características), processados pelos blocos internos e a informação é retida pelas células, e as manipulações de memória são feitas pelos portões de saída. (MATHWORKS, 2020).	54
Figura 9 – Arquitetura de uma célula de memória da rede LSTM. A célula recebe duas entradas, a saída do último estado oculto e o estado da célula, observada no tempo = t. O estado da célula é responsável pelo fluxo de dados, que podem decidir se segue com o fluxo de dados sem ocorrência de alteração ou não, estabelecida pelas portas sigmoide, que decide quais dados serão permanecidos dentro da célula e enviados para a próxima célula. (LE et al., 2019).	55
Figura 10 – Exemplo de arquiteturas das redes neurais simples e redes de aprendizado profundo (BOOK, 2020)	57
Figura 11 – Arquitetura básica de uma CNN. A rede convolucional é formada por diversas camadas convolucionais, que aplica uma função matemática de convolução nos dados de entrada e depois realizar o agrupamento (pooling). Em seguida os dados são vetorizados e são enviados até chegar na última camada conhecida como camada Densa e totalmente conectada. (MURUGAN, 2017)	58
Figura 12 – Etapas do processo de detecção de objetos em uma imagem, usando YOLOv2. Uma imagem em grade cortada $M \times N$, e para cada célula, destaca várias caixas delimitadoras atribuindo um valor de confiança e a probabilidade do objeto ser de uma determinada classe, que será a detecção final do objeto dentro da caixa mais correspondente. (REDMON et al., 2016a).	60

- Figura 13 – Metodologia experimental proposta para definir o modelo de comportamento ideal para a transferência da informação entre grupos de *zebrafish*. Na tarefa inicial, os peixes precisavam identificar o estímulo acionado e posicionar-se ao lado correto do aquário para receber alimentação. Enquanto isso, os vídeos foram processados e uma detecção e rastreo do comportamento dos peixes do grupo “emissor” foi estabelecida. Após a coleta de dados do comportamento condicionado, uma rede neural LSTM foi treinada para criar um teste modelo do comportamento dos peixes condicionados. Esse modelo foi usado para comparar o padrão de comportamento dos peixes durante as demais atividades. Essa rede neural serve como avaliador automático do comportamento, classificando em condicionados (luz ou vibração) e não condicionados, além disso, a rede serve como parâmetro para liberar recompensa. 65
- Figura 14 – Visão geral da metodologia experimental proposta para a transferência da informação entre grupos de *zebrafish*. Na tarefa inicial, os peixes precisavam identificar o estímulo acionado e posicionar-se ao lado correto do aquário para receber alimentação. Enquanto isso, os vídeos foram processados do comportamento dos peixes do grupo “emissor”. Em seguida, a detecção e rastreamento dos peixes foram capturados. A diferença entre a média de peixes e o teste modelo foi calculado pelo *Z-score* (normalizado), e em seguida, esses dados foram transformados em intensidade de estímulos (luz ou *vibracall*). A informação foi transmitida e os comportamentos dos peixes são comparados com o teste modelo e classificado pela rede neural. Além disso, a detecção e rastreo dos peixes receptores, são usados para calcular o *Z-score* do grupo e, acionar a alimentação e *feedback* para o aquário “emissor”. Por fim, os comportamentos dos peixes de ambos os tanques foram avaliados e comparados 66
- Figura 15 – Configuração experimental para a transferência da informação entre grupos distintos de *zebrafish*. Os grupos de *zebrafish* nadam em tanques separados, dividido em duas arenas de alimentação. Uma fita de LED (cor vermelha) e um *vibracall* foram acoplados na parede externa do tanque. Uma câmera está montada acima do tanque. Toda a avaliação da transmissão da informação foi enviada e avaliada por um sistema baseado em redes neurais artificiais. 68

- Figura 16 – Arquitetura de rede neural CNNLSTM. A rede neural inicia com a entrada de dados (quadros), em seguida, foi feita a subtração entre os canais para obter uma nova imagem com pixels relevantes. Essa nova imagem foi processada pela rede VGG16 para extração de características relevantes, após esse processo, a saída da rede foi vetorizada, servindo da entrada na rede LSTM. Em seguida, os dados de saída da rede LSTM foram enviados a um conjunto de camadas densas para a classificação do comportamento dos peixes em cada vídeo de 5 segundos. 70
- Figura 17 – Arquitetura da estrutura de rede YOLOv2 proposta. A imagem de entrada tem um tamanho de 480x480 e cada camada foi reduzida por filtros de tamanho 60x60. Todas as combinações dos blocos de arquitetura de rede possuem uma camada de convolução, normalização em lote e Relu, com exceção da última camada que apresenta a saída por convolução e as caixas de ancoragem. Apenas três nas camadas iniciais têm o MaxPooling 73
- Figura 18 – A caixa delimitadora é representada pela moldura amarela. A posição do centroide (c_{x_k}, c_{y_k}) é representada pelo ponto amarelo. O fim da posição da cabeça (p_{x_k}, p_{y_k}) é representado pelo ponto vermelho. A direção do movimento do peixe é representada pela seta verde que tem um ângulo igual a c_k 74
- Figura 19 – Reconexão da trajetória do peixe. Nesta situação, há uma trajetória interrompida Γ_1 e duas novas trajetórias Γ_2 e Γ_3 . Para a conexão da trajetória Γ_1 , a condição da equação 3.15 é verificada em relação às trajetórias Γ_2 e Γ_3 . Se o resultado for verdadeiro para ambas as trajetórias, a trajetória escolhida para a conexão é aquela com a menor distância definida pela equação 3.16. Na figura, o valor mais baixo é $Dist(\tau_i, \rho_j)$, então suas trajetórias são conectadas. 78
- Figura 20 – Desempenho da rede neural CNNLSTM para reconhecer os padrões comportamentais dos *zebrafish* no teste modelo. A) Resultado do treinamento da rede neural. B) Resultado do teste da rede neural. 85

- Figura 21 – Respostas do condicionamento apetitivo do *zebrafish* usando dois estímulos: luz de LED vermelha e vibração. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo LED vermelho. B) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo *vibracall*. C) Média de polarização durante o período estimulado com LED vermelho. D) Média de polarização durante o período estimulado com *vibracall*. E) Comparação da quantidade de peixes entre o período estimulado com LED vermelho e *vibracall*. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste t *student* ($*p<0,05$; $**p<0,001$, $***p<0,0001$) 87
- Figura 22 – Respostas de comportamento de grupo de *zebrafish* estimuladas com luz de LED vermelho e *vibracall*. A) Velocidade média dos peixes estimulados pelo LED vermelho. B) Velocidade média dos peixes estimulados pelo *vibracall*. C) Distância média percorrida pelos peixes estimulados e grupo controle. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste t *student* ($*p<0,05$; $**p<0,001$, $***p<0,0001$) 88
- Figura 23 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário com restrição total, usando estímulo LED vermelho. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo aceso. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D) Quantidade de peixes receptores durante o estímulo luminoso em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste t *student* ($*p<0,05$; $**p<0,001$, $***p<0,0001$) 90
- Figura 24 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário com restrição total usando estímulo LED vermelho. A) Quantidade de informação modelada por *Z-score* das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por *Z-score* para *feedback* do grupo receptor-emissor. 91

Figura 25 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário com restrição total, usando estímulo <i>vibracall</i> . A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo ligado. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D) Quantidade de peixes receptores durante o estímulo <i>vibracall</i> em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a média±DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste t <i>student</i> (* $p<0,05$; ** $p<0,001$, *** $p<0,0001$)	92
Figura 26 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário com restrição total usando estímulo <i>vibracall</i> . A) Quantidade de informação modelada por <i>Z-score</i> das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por <i>Z-score</i> para <i>feedback</i> do grupo receptor-emissor.	93
Figura 27 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário com restrição parcial, usando estímulo LED vermelho. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo aceso. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D. Quantidade de peixes receptores durante o estímulo luminoso em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a média±DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste t <i>student</i> (* $p<0,05$; ** $p<0,001$, *** $p<0,0001$)	95
Figura 28 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário com restrição parcial usando estímulo LED vermelho. A) Quantidade de informação modelada por <i>Z-score</i> das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por <i>Z-score</i> para <i>feedback</i> do grupo receptor-emissor.	96

Figura 29 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário sem restrição, usando estímulo LED vermelho. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo aceso. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D. Quantidade de peixes receptores durante o estímulo luminoso em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a $média \pm DP$ e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste <i>t student</i> ($*p < 0,05$; $**p < 0,001$, $***p < 0,0001$)	98
Figura 30 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário sem restrição usando estímulo LED vermelho. A) Quantidade de informação modelada por <i>Z-score</i> das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por <i>Z-score</i> para <i>feedback</i> do grupo receptor-emissor.	99
Figura 31 – Amostra da escolha de tentativa emissor-receptor durante a execução da tarefa experimental. O desempenho dos peixes do grupo “emissor” é representado por uma linha azul, enquanto uma linha vermelha indica as escolhas dos peixes do grupo “receptor” nas mesmas tentativas. Nos ensaios entre 67-74 e 76-79, a resposta comportamental do grupo “receptor” correspondeu as intensões do grupo “emissor”, sendo classificado pela rede neural de comportamento condicionado. O melhor desempenho foi alcançado no período sem restrição, obtendo 63,63% de acerto. . . .	100
Figura 32 – Relação da localização do centro de massa de peixe e da distância do centro em relação a área alimentar, no período estimulado, pelas experiências: restrição total (AB), restrição parcial (CD) e sem restrições (EF).	102
Figura 33 – Mapa de calor do cardume de <i>zebrafish</i> durante as tentativas. A) Mapa de calor das tentativas 1 (restrição total), B) tentativa 29 (restrição parcial) e, C) tentativa 74 (sem restrição) do treinamento luminoso da cor vermelha.	104
Figura 34 – Rede de interações de cardume de <i>zebrafish</i> . A informação mútua foi medida a partir da diferença do ângulo da cabeça do peixe durante o movimento no vídeo, A) nas tentativas 1 (restrição total), B) tentativa 29 (restrição parcial) e, C) tentativa 74 (sem restrição). Duas setas conectam dois peixes durante uma a atividade locomotora, sendo a resposta da influência de um peixe para outro peixe alvo. A espessura da linha representa a frequência das interações.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos artigos buscados nas bases de dados sobre BBL. . .	37
Tabela 2 – Arquitetura da rede convolucional VGG16 com os tamanhos de cada camada.	71
Tabela 3 – Arquitetura da rede neural profunda baseada em redes neural LSTM e redes multicamadas densas.	72
Tabela 4 – Análise de causalidade entre os grupos Emissor e Receptor usando o centro de massa	101
Tabela 5 – Análise de causalidade entre os grupos Emissor e Receptor da distância entre o centro de massa e a área alimentar.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrenoforam
BBi	Brain-to-Brain Interface
BCI	Brain–Computer Interface
CBI	Computer-Brain Interface
CCET	Centro de Ciências Exatas e Tecnológica
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CNN	Convolutional Neural Network
CNNLSTM	Uma combinação de redes neurais convolucionais e LSTM
DBS	Estimuladores Cerebrais Profundos
DP	Desvio Padrão
ECoG	Eletrocorticografia
EEG	Eletroencefalografia
fMRI	Ressonância Magnética Funcional
FTDS	Funcional Transcranial Doppler Sonography
FUS	Transcranial Focused Ultrasound
ICMS	Intracortical Microstimulation
LED	Diodo Emissor de Luz (Light Emitting Diode)
LSTM	Long Short Term Memory
MEG	Magnetoencefalografia
MLP	Perceptron Multicamadas
MMI	Interface músculo-músculo
NIRS	NearInfrared Spectroscopy
ReLU	Rectified Linear Unit
RGB	Sistema de cores aditivas: Vermelho (Red), Verde (Green) e Azul (Blue)

RNA	Rede Neural Artificial
SGDM	Gradiente Descendente Estocástico com Momentum
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TMS	Transcranial Magnetic Stimulation
YOLO	You Only Look Once
YOLOv2	YOLO versão 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Motivação e Relevância	25
1.2	Contribuições	26
1.3	Trabalhos Relacionados	27
1.4	Objetivos	29
1.4.1	Objetivo geral	29
1.4.2	Objetivos específicos	29
1.5	Organização do Trabalho	29
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
2.1	Interface Cérebro-Computador (<i>Brain-Computer Interface</i> - BCI)	30
2.2	Interface Cérebro-Cérebro (<i>Brain-Brain Interface</i> - BBI)	32
2.2.1	Limitações de BBI	39
2.2.1.1	Anestésicos	39
2.2.1.2	Aumento no período de latência	39
2.2.1.3	Controle de movimentos voluntários	39
2.2.1.4	Analfabetismo de BCI	39
2.2.2	Treinamentos	40
2.3	Aprendizagem Condicionada	42
2.4	<i>Zebrafish</i>	43
2.5	Aprendizagem Condicionada de <i>Zebrafish</i>	43
2.6	Algoritmos para Avaliação Comportamental de <i>Zebrafish</i>	45
2.7	Redes Neurais Artificiais	47
2.7.1	Arquiteturas das redes neurais	50
2.7.2	Processo de treinamento	51
2.7.3	<i>Perceptron</i> Multicamadas (<i>Multilayer Perceptron</i> - MLP)	51
2.7.4	Memória Longa a Curto Prazo (<i>Long Short Term Memory</i> - LSTM) . .	53
2.7.5	Redes Neurais Convolucionais (<i>Convolutional Neural Network</i> - CNN) .	57
2.7.5.1	Rede convolucional YOLOv2 - “ <i>You Only Look Once</i> ”	59
3	METODOLOGIA PROPOSTA	61
3.1	Animais e Declarações Éticas	61
3.2	Sala Experimental	62
3.3	Tarefa Experimental	62
3.4	Sistema de Transferência da Informação Aquário-Aquário	63

3.4.1	Definição das restrições para avaliação do comportamento	66
3.5	Hardware	67
3.6	Software	69
3.6.1	Processamento dos vídeos	69
3.6.2	Sistema de Avaliação e Controle Integrado	70
3.6.2.1	Algoritmo de detecção	72
3.6.2.2	Algoritmo de rastreamento	74
3.6.3	Transferência da Informação Aquário-Aquário	78
3.6.4	Análise do Comportamento dos grupos de <i>zebrafish</i>	79
3.6.4.1	Polarização	80
3.6.4.2	Rede de Interação entre <i>zebrafish</i>	80
3.6.4.3	Velocidade	82
3.7	Análise Estatística	82
4	RESULTADOS	84
4.1	Avaliação do Teste Modelo	84
4.2	Avaliação Comportamental do Grupo “emissor”	85
4.3	Avaliação da Transferência de Informação	88
4.3.1	Análise da Transferência da Informação com Restrição Total	88
4.3.1.1	Estímulo luminoso	88
4.3.1.2	Estímulo <i>vibracall</i>	91
4.3.2	Análise da Transferência da Informação com Restrição Parcial	94
4.3.3	Análise da Transferência da Informação com Sem Restrição	96
4.3.4	Informação Bilateral	99
4.3.4.1	Rede de Interação entre <i>zebrafish</i>	102
5	DISCUSSÃO	106
6	TRABALHOS FUTURO	110
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
	REFERÊNCIAS	112
	ANEXOS	122

1 INTRODUÇÃO

A influência social e coletiva é um grande desafio para ciência contemporânea, sendo importante para os avanços em diversos campos da sociedade, sobretudo, na troca de informação (MILLER et al., 2013). Com os avanços tecnológicos dos últimos anos, os meios de comunicação entre os indivíduos tiveram enormes progressos, envolvendo meios verbais e não verbais, podendo ser em tempo real ou não. Ultimamente, a tecnologia expandiu significativamente, o que possibilitou ir além da imaginação: uma transferência de informação direta entre cérebros (GRAU et al., 2014).

Ao longo dos anos, a comunicação evoluiu bastante ao ponto de permitir que um cérebro pudesse controlar um computador, e assim, os circuitos biológicos fossem ligados por dispositivos eletrônicos avançados, denominados de Interface Computador Cérebro, *Brain-Computer Interface* - BCI, sendo capazes de capturar os sinais do cérebro e controlar computadores e dispositivos de comunicação diferentes, como as próteses robóticas e os auxiliares de comunicação (RAMAKRISHNAN et al., 2015; RAMADAN; VASILAKOS, 2017). Dessa maneira, a implementação atual do BCI é unidirecional e o controle derivado do cérebro é direcionado apenas para operar um computador ou um dispositivo. Assim, para estabelecer uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o computador, uma Interface Cérebro Computador, *Computer-Brain Interface* – CBI, foi projetada para que os comandos gerados por um computador pudessem ser usados para estimular uma área específica do cérebro, conseguindo uma modulação funcional (MIN; MARZELLI; YOO, 2010; YOO et al., 2013). Muitos artigos de pesquisa propuseram que as novas tecnologias avançariam a ciência de BCI e passariam a utilizar apenas sensores e cérebro (KENNEDY et al., 2000; KÜBLER et al., 2005; MULLER; BLANKERTZ, 2006; RAMADAN; VASILAKOS, 2017; VAUGHAN et al., 2006). Dessa forma, a interface bidirecional entre o cérebro e o computador acarretou no desenvolvimento da Interface Cérebro-Cérebro, *Brain-to-Brain Interface* - BBI, permitindo uma evolução na troca de informação, o que passaria de cérebros-máquinas para cérebros-cérebros, capazes de criar uma comunicação direta entre cérebros biológicos para fazer uma ação comportamental em conjunto, usando as técnicas de neuroimagem e neuroestimulação, invasivos e não invasivos (GRAU et al., 2014).

A comunicação direta entre cérebros, alcançada por uma BBI, permite aos cérebros compartilhar informações sensoriais e motoras para alcançar um objetivo comportamental em tempo real, diretamente ligada às atividades cerebrais específicas entre os indivíduos (LEE et al., 2017; PAIS-VIEIRA et al., 2013; RAO; STOCCO, 2014; YOO et al., 2013). Para conseguir esse objetivo, BBI combina métodos de neuroimagem e neuroestimulação, que geralmente demandam a cooperação controlada por um computador de BCI para coletar sinais cerebrais oriundos do remetente e uma CBI para transmitir os sinais ao

cérebro receptor (KOO et al., 2017; STOCCO et al., 2015).

Nesse sentido, as técnicas de neuroimagem são importantes métodos para análise e aquisição de imagens cerebrais, que muitas vezes são usadas para pesquisa e reabilitação de doenças neurológicas (CROSSON et al., 2010). Entretanto, as técnicas de neuroestimulação são ferramentas para estimular o cérebro na neuroterapia, para fins investigatórios do cérebro, capaz de modular as funções neurais, sendo utilizados até mesmo em tratamento de distúrbios neurológicos ou neuropsiquiátricos (EDWARDS et al., 2017).

Pesquisadores utilizaram a combinação dos métodos de neuroimagem e neuroestimulação para conseguir criar uma BBI capaz de transferir informações entre cérebros para executar atividades comportamentais sensório-motora (PAIS-VIEIRA et al., 2013), jogar um jogo de computador (RAO; STOCCO, 2014), decodificar palavras simples como “hello” e “goodbye” (GRAU et al., 2014), responder um questionário com respostas binárias (STOCCO et al., 2015), gerar movimentos 2D e 3D com *joystick* (RAMAKRISHNAN et al., 2015), e outras tarefas que envolvem movimento dos membros (braços e pernas) (YOO et al., 2004; LI; ZHANG, 2016; KOO et al., 2017; LEE et al., 2017).

Atualmente, as técnicas utilizadas de BBI podem ser por meios invasivos e não invasivos, sendo que para o uso invasivo do método, uma cirurgia é feita para implantar matrizes de microeletrodos no cérebro, sob o crânio, porém com riscos para a saúde. Neste procedimento, o sinal produzido é de alta qualidade, mas dependente da cicatrização do tecido ao longo do tempo, podendo existir perda do sinal, além de permanecer em apenas uma parte do cérebro sem poder movê-lo do local implantado. Por outro lado, os métodos não invasivos, permitem que os sinais cerebrais sejam gravados sem penetração no couro cabeludo do indivíduo, porém está sujeito à baixa qualidade do sinal. Entretanto, em estudos com humanos, esse método é o mais apropriado por evitar cirurgias, mesmo com algumas limitações na aquisição do sinal (NICOLAS-ALONSO; GOMEZ-GIL, 2012).

De fato, a transferência de informação entre cérebros mostrou ser significativa (YOO et al., 2004; LI; ZHANG, 2016; KOO et al., 2017; LEE et al., 2017). Todavia, algumas limitações foram observadas, bem como a restrição da comunicação entre os cérebros e a dependência de tecnologias de neuroimagem e neuroestimulação para enviar informações úteis para outro cérebro, possibilitando, assim, novas discussões sobre a utilização do conceito de BBI para outras abordagens. Dessa forma, pode-se dizer que a transferência de informação é baseada por impulsos de sinais cerebrais modulados usados para guiar ações do indivíduo durante uma atividade, porém, com limitações na tomada de decisão no cérebro receptor para diferentes comportamentos.

Neste estudo, apresenta-se uma nova abordagem análoga à BBI para levar a transferência de informação a outra direção, criando um novo canal de comunicação artificial entre animais, totalmente não invasivo e sem interferência humana, para realizar uma tarefa comportamental compartilhada entre grupos de *zebrafish*.

1.1 Motivação e Relevância

A transferência de informação estabelecida por BBI foi criada para permitir que informações úteis da atividade neural fossem transmitidas a outro cérebro, a fim de alcançar um objetivo comportamental em tempo real (RAO; STOCCO, 2014; PAIS-VIEIRA et al., 2013). Com base nos estudos abordados, a capacidade da comunicação neural mostrou haver uma tarefa significativa na transferência da informação, porém, de forma limitada e baseada em sinais simples da atividade neuronal. As habilidades estabelecidas pelos pares de cérebros envolvidos nas pesquisas, como uma tomada de decisão, foram auxiliados por treinamentos que ocorreram antes e durante a transferência da informação entre os sujeitos, ou seja, os participantes eram treinados para uma atividade e convidados a sincronizar suas habilidades com a ativação neuronal por BBI (PAIS-VIEIRA et al., 2013; GRAU et al., 2014; RAO; STOCCO, 2014; PAIS-VIEIRA et al., 2015).

Alguns trabalhos mostraram experiências com relatos de treinamentos antecipados que contribuíram para a melhoria do desempenho e adaptação da técnica utilizada. Se não houvesse o treinamento antecipado, possivelmente, o cérebro receptor iria receber um estímulo, mas seria incapaz da tomada de decisão consciente. Como exemplo, no trabalho de Yoo et al. (2013), foi usada uma abordagem de BBI sem treinamentos prévios, e os autores concluíram que a comunicação foi efetuada com sucesso quando conseguiram estimular a área sensório-motora de um rato anestesiado para movimentar sua cauda, detectado por um sensor de movimento. No entanto, a informação foi unidirecional e sem *feedback*, com atraso de tempo adicional, sugerindo que os atrasos eram recorrentes do efeito de anestésicos usados, ou talvez pela necessidade de um tempo para ativação dos músculos ligados ao movimento da cauda. O resultado mostrou ser viável utilizar a interface controlada por pares de cérebros para ativar sinais neurais, gerando respostas motoras, porém de forma simples, sem *feedback* para cérebro emissor (YOO et al., 2013).

Portanto, alguns questionamentos sobre o uso da técnica de transferência de informação são levados em consideração. Nesse sentido, explicar se é possível estabelecer um controle no comportamento de um cérebro receptor desavisado, mediado por outro cérebro consciente. Além disso, saber se um cérebro receptor responde na mesma intensidade que um cérebro emissor do sinal, com boa precisão. E, se é possível estabelecer uma nova abordagem da transferência de informação, usando novas tecnologias, obtendo resultados satisfatórios. Ainda é necessário entender quando uma tomada de decisão é realizada de forma involuntária, sem a necessidade de sub-avisos pelos treinamentos para transmitir uma informação completa e intencional entre cérebros.

Dessa maneira, este trabalho propõe uma abordagem análoga à transferência de informação direta entre cérebros, criando um novo canal de comunicação artificial, totalmente não invasivo, para a transferência de informações entre grupos de *zebrafish*, dando uma nova discussão sobre a comunicação direta entre cérebros.

1.2 Contribuições

A principal contribuição da metodologia apresentada nesta tese é o desenvolvimento de um novo canal de comunicação para transmitir informações entre grupos de *zebrafish*, a partir da analogia da transferência de informação direta entre cérebros de (PAIS-VIEIRA et al., 2013). Este canal de comunicação permite transmitir informações de forma *on-line* entre grupos distintos de peixes, além de avaliar a resposta do grupo receptor da informação, comparando-a com as intenções do grupo emissor da informação. A metodologia apresentada é caracterizada pelos seguintes aspectos de interesse:

- Adaptabilidade do modelo de estudo. A metodologia permite adaptação para diferentes modelos de animais, permitindo ajustar o protocolo de estudo para experiências distintas. Isso é importante do ponto de vista prático, uma vez que o protocolo pode sofrer alterações para cada atividade executada ou para a avaliação de distintos comportamentos dos animais.
- Investigação do comportamento do *zebrafish*. A metodologia permite investigar com boa precisão a influência da transferência de informação entre peixes e entre grupos distintos de peixes. A investigação é baseada em algoritmos de aprendizagem profunda e modelos matemáticos baseados em informação mútua, permitindo avaliar a quantidade de informação a ser transferida entre os peixes e entre os grupos de peixes durante as atividades executadas.
- Classificação automática de diferentes comportamentos do *zebrafish*. A metodologia permite identificar distintos comportamentos dos peixes durante as atividades de condicionamento. Esta identificação é baseada em algoritmos de redes neurais artificiais profunda, como as redes de Memória de Longo Prazo e as redes Convolucionais, capazes de encontrar padrões no comportamento dos peixes. Além disso, comparar a evolução do comportamento entre grupo de peixes durante as tentativas do experimento.
- Novas perspectivas sobre comunicação entre indivíduos. A proposta desta tese aborda uma nova visão sobre a transferência de informações entre os indivíduos. É apontada a possibilidade de criar um novo meio de comunicação baseado em algoritmos de inteligência artificial, como as redes neurais artificiais profundas. Onde, é possível extrair informações úteis de um comportamento individual dos peixes e transmitir esse comportamento em tempo real, por meio da intensidade de estímulos sonoros e visuais.

1.3 Trabalhos Relacionados

Pais-Vieira et al. (2013) e colaboradores testaram pela primeira vez um novo canal de comunicação artificial em ratos acordados, onde compartilharam informações comportamentais significativas de um cérebro para outro cérebro em tempo real, em que o rato denominado “decodificador” poderia realizar tarefas sensório-motora semelhantes ao rato “codificador”, obtendo resultado significativo ($p < 0.05$) variando o percentual de 60-72% de precisão (PAIS-VIEIRA et al., 2013).

Posteriormente, Pais-Vieira et al. (2015) desenvolveram uma rede constituída por vários cérebros de ratos, denominada de Brainet, permitindo que um conjunto de cérebros de ratos pudesse cooperar e trocar informações em tempo real. O estudo obteve com sucesso a resolução de diversos problemas computacionais, na forma de um biocomputador, tais como processamento de imagem, armazenamento e recuperação de informações táteis, e até previsão do tempo. Assim, o desempenho da sincronização da atividade neural foi de $61,67 \pm 3,01\%$ de precisão, já na classificação de estímulos foi de $61,24 \pm 0,5\%$, o teste de armazenamento e recuperação de memórias táteis foi de $35,37 \pm 2,2\%$ e o processamento paralelo foi de $41,02 \pm 5,1\%$ de precisão (PAIS-VIEIRA et al., 2015).

No estudo de Yoo et al. (2013) e colaboradores, sinais neuronais de humano foram enviados para o cérebro de um rato e, conseqüentemente, foi possível movimentar a cauda do rato. Lee et al. (2017), propuseram detectar a função motora direcional da mão (esquerda ou direita) de outro participante do estudo. A atividade cerebral para escolha da mão esquerda ou direita de um cérebro emissor foi detectada e gravada para ser transmitida remotamente, para estimular a área sematossensorial do cérebro receptor. Essa comunicação entre os cérebros dos participantes foi transmitida pela internet em uma distância de 30 km, com precisão de $93,3 \pm 7,6\%$ (BC6) a $50 \pm 18\%$ (BC2) entre os indivíduos (LEE et al., 2017).

Grau et al. (2014) e colegas, conseguiram pela primeira vez, transmitir informações entre dois humanos de forma não-invasiva, sendo capaz de transferir via internet fluxos binários aleatórios de palavras simples codificadas como “hello”, “goodbye” de um cérebro emissor para outro (receptor) separados por grandes distâncias, com precisão na primeira experiência de 94% para o BCI, 95% para CBI e 89% para os componentes B2B combinados, e na segunda experiência, precisão de 98%, 99% e 96%, respectivamente (GRAU et al., 2014).

Rao e Stocco (2014) e colaboradores propuseram que duas pessoas que poderiam realizar uma tarefa visuomotora, como por exemplo, jogar um jogo de computador de forma cooperada usando apenas a mente. O jogo proposto consistia na defesa de uma cidade e os sujeitos precisariam pressionar com o dedo um botão *touch* para destruir o foguete e salvar a cidade. Para essa ação, o participante na função receptora do BBI (que

não assistiu ao jogo) recebeu um estímulo para o córtex motor e seu dedo foi estimulado por sinais proporcionado pelo remetente, que assistia ao jogo sem ter acesso ao botão de explosão. Essa função de acionar o botão passaria a ser feita pelo cérebro destinatário e obteve resultado final entre os três pares de participantes envolvidos de 85%, 25% e 35% (RAO; STOCCO, 2014).

Em outro estudo, Stocco et al. (2015), conseguiram que pares de participantes fossem capazes de identificar com sucesso as respostas de uma série de perguntas (20 questões verdadeiras ou falsas) alcançando 72% de precisão (STOCCO et al., 2015). Mashat, Li e Zhang (2017), apresentaram uma abordagem para a interação humana, combinando BBI e interface músculo-músculo (MMI) para que intenção de um sujeito (remetente) seja reconhecida, induzindo o movimento da mão. Neste estudo, os autores conseguiram $85,7 \pm 12,13\%$ de precisão na troca de informações entre os cérebros envolvidos (MASHAT; LI; ZHANG, 2017).

Diferentemente dos demais estudos, Ramakrishnan et al. (2015) propuseram uma *Brainet* com cérebros de primatas não humanos que utilizam a atividade cerebral de grande escala para sincronizar um comportamento em comum entre os cérebros envolvidos. Este estudo obteve com sucesso um BCI de macacos com gravações crônicas e simultâneas de pares ou trigêmeos de cérebros de primatas, capaz de movimentar em conjunto um braço de avatar de macaco de 2D e 3D de forma não supervisionada. Alcançando precisão de movimentos 2D gerados pela díade variando entre 80-86% e os movimentos 3D com a tríade em $78\% \pm 0,37$ de precisão (RAMAKRISHNAN et al., 2015).

No trabalho de Li e Zhang (2016), foi desenvolvido um sistema BBI sem fio para controlar os movimentos de uma barata *cyborg* através do cérebro humano. Dessa maneira, utilizou um microestimulador portátil para gerar estimulação elétrica invasiva através do nervo da antena da barata por comunicação *Bluetooth*, acionados do microestimulador por comandos BCI. Assim, um pequeno eletrodo junto à antena forneceu a estimulação elétrica que é codificada como informações sensoriais pelos neurônios antenais e enviadas ao cérebro, podendo ser desenvolvida uma interface funcional entre o dispositivo externo e o cérebro da barata (LI; ZHANG, 2016) .

Já Koo et al. (2017), permitiram que um usuário humano manipulasse o movimento do rato sem treinamento prévio, guiados remotamente (*ratbots*) para percorrer um caminho de labirinto em T por uma estimulação elétrica da via nigrostriatal usando eletrodos intracorticais, com taxa média de sucesso de $82,2 \pm 5,44\%$ (KOO et al., 2017).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

- Desenvolver um canal de comunicação artificial para transferir informações entre grupos distintos de *zebrafish* para controlar suas atividades comportamentais.

1.4.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um algoritmo para rastreamento de *zebrafish* usando rede convolucional YOLOv2 e filtro de *Kalman* para avaliar o comportamento dos peixes;
- Desenvolver um sistema de mecanismo automatizado para controlar as atividades comportamentais dos grupos de *zebrafish* durante a transferência de informação;
- Desenvolver um algoritmo baseado em redes neurais profundas para avaliação automática do comportamento de *zebrafish*;
- Transmitir informações comportamentais de um grupo de *zebrafish* para outro grupo de *zebrafish* em um clique fechado;
- Avaliar a resposta do condicionamento de *zebrafish* no período alimentar sob estímulos visuais e *vibracall*;
- Avaliar o comportamento do grupo de *zebrafish* receptor de informações em relação ao grupo emissor.

1.5 Organização do Trabalho

Esta tese objetiva levar a ideia de BBI a uma nova abordagem, criando um novo canal de comunicação entre animais, totalmente não invasivo e sem interferência humana, controlando as atividades comportamentais entre grupos de *zebrafish*. Portanto, no capítulo 2, é apresentado conceitos preliminares sobre BBI, aprendizagem condicionada de *zebrafish*, métodos computacionais para avaliação comportamental de animais e conceitos sobre Redes Neurais Artificiais. No capítulo 3, é abordado a metodologia usada para a implementação dos algoritmos e das análises comportamentais, envolvendo os experimentos em laboratório para a comunicação entre grupos de *zebrafish*. No capítulo 4, resultados da avaliação da transferência de informação em diferentes experimentos. No capítulo 5, é apresentado as discussões dos resultados alcançados. Finalmente, no capítulo 6, é abordado os trabalhos futuro e, no capítulo 7 é apresentada as considerações finais dessa tese.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Será apresentado, neste capítulo, o embasamento teórico para compreender sobre a metodologia proposta nesta tese. As seções seguintes abordam com detalhes sobre a transferência de informação entre o cérebro e a máquina, a transferência de informação entre cérebros, aprendizagem condicionada, algoritmos de avaliação de comportamento de zebrafish, redes neurais artificiais, bem como redes profundas, recorrentes e convolucionais.

2.1 Interface Cérebro-Computador (*Brain-Computer Interface* - BCI)

Os estudiosos evoluíram bastante em pesquisas para terem uma comunicação entre o cérebro e um computador, permitindo que os sinais cerebrais fossem captados para acionar um dispositivo ou uma máquina, para fins de reabilitação e utilidades comuns de pessoas deficientes. Com o passar dos anos, BCI ganhou mais desempenho e espaço comercial, sendo constituída de forma híbrida para melhorar a adaptação do indivíduo (RAMADAN; VASILAKOS, 2017; RAMAKRISHNAN et al., 2015). Muitas pesquisas propuseram que as novas tecnologias avançariam a ciência de BCI e passariam a utilizar apenas sensores e cérebro (KENNEDY et al., 2000; KÜBLER et al., 2005; KÜBLER et al., 1999; MULLER; BLANKERTZ, 2006; RAMADAN; VASILAKOS, 2017; VAUGHAN et al., 2006).

Um BCI é um sistema baseado em computador que adquire sinais cerebrais, analisa-os e converte-os em comandos que são retransmitidos para um dispositivo de saída para executar a ação desejada. Normalmente, as BCIs não usam as vias normais de saída do cérebro dos nervos e músculos periféricos, pois são restritos aos sistemas que medem e usam sinais produzidos pelo sistema nervoso central. Dessa forma, por exemplo, um sistema de comunicação ativado por voz ou muscular não é caracterizado como um BCI. Além disso, um método de neuroimagem apenas, como o eletroencefalografia (EEG) não é caracterizado por um BCI, isso porque apenas registra sinais cerebrais, mas não gera uma saída que atue no ambiente do usuário. As BCIs não lêem mentes de usuários de qualquer maneira, ou seja, não conseguem extrair informações de usuários desavisados ou relutantes, mas permitem que os usuários ajam num ambiente comum usando sinais cerebrais em vez de músculos. Dessa forma, o usuário e o BCI tendem a trabalhar juntos, conectados. Assim, o usuário, normalmente, é treinado após um período de tempo, a fim de gerar sinais cerebrais que codificam uma intenção específica para uso do BCI (SHIH; KRUSIENSKI; WOLPAW, 2012).

A atividade cerebral pode ser monitorada usando diferentes abordagens, como

eletrocorticografia (ECoG), EEG, ressonância magnética funcional (fMRI), magnetoencefalografia (MEG) e *Near-Infrared Spectroscopy (NIRS)*. No entanto, os sinais de EEG são considerados como entrada na maioria dos sistemas BCI. Em tese, qualquer tipo de sinal cerebral poderia ser usado para controlar um sistema BCI, mas os sinais mais comumente estudados são os sinais elétricos produzidos, principalmente, pelas alterações da polaridade da membrana pós-sináptica neuronal que ocorrem devido à ativação de canais dependentes de voltagem ou dependentes de íons. Dessa forma, o EEG do couro cabeludo é em grande parte uma medida desses sinais, pois tem a vantagem de ser fácil, seguro e barato de adquirir (AMIRI; FAZEL-REZAI; ASADPOUR, 2013).

A principal desvantagem das gravações no couro cabeludo é que os sinais elétricos são bastante atenuados no processo de passagem crânio e couro cabeludo. Assim, as informações importantes podem ser perdidas. Com isso, há a possibilidade de gravar os sinais cerebrais intracranialmente, usando pequenos microarranjos intracorticais implantado no córtex. Dessa forma, é possível registrar potenciais de ação de neurônios individuais e potenciais de campo local produzidos por uma população relativamente limitada de neurônios e sinapses próximos. As desvantagens desses implantes são o grau de invasividade, necessitando de neurocirurgia, a área restrita de gravação e a questão ainda não respondida da estabilidade funcional a longo prazo dos eletrodos de gravação (AKHTARI et al., 2002; KRUSIENSKI; SHIH, 2011; SHIH; KRUSIENSKI; WOLPAW, 2012).

Já as modalidades de estimulação cerebral controladas por um computador são chamadas de CBI (*Computer-Brain Interface*). Dessa forma, os sinais são enviados ao cérebro para ativar uma reação específica. Comparando CBI ao BCI, houve menos pesquisas de sucesso nesse campo. Um dos obstáculos para o CBI é desenvolver um método preciso e não invasivo. Ainda é muito mais complexo avançar nessa direção, do computador para o cérebro, pois é difícil influenciar o que está acontecendo no cérebro nas áreas muito específicas a serem envolvidas. No entanto, várias técnicas não invasivas estão sendo examinadas atualmente para essa neuromodulação. As técnicas de estimulação magnética transcraniana, por exemplo, não têm especificidade espacial e têm uma profundidade de penetração limitada. Entretanto, ao vincular um BCI a um CBI, numa sincronização direta entre cérebros, pode haver viabilidade na estimulação cerebral. As dificuldades não são apenas de natureza técnica, mas é uma situação de se entender o que está acontecendo no cérebro e, quanto mais entende-se, mais difícil parece estabelecer um cérebro para as comunicações cerebrais (MIN; MARZELLI; YOO, 2010; WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

Por conseguinte, essas tecnologias, BCI e CBI, podem ser combinadas para realizar uma comunicação sincronizada entre cérebros (GRAU et al., 2014), mediada pelo computador, podendo ser de forma invasiva e não invasiva entre indivíduos. Assim, pesquisadores idealizaram a proposta inovadora para conectar, desta vez, um cérebro a outro cérebro,

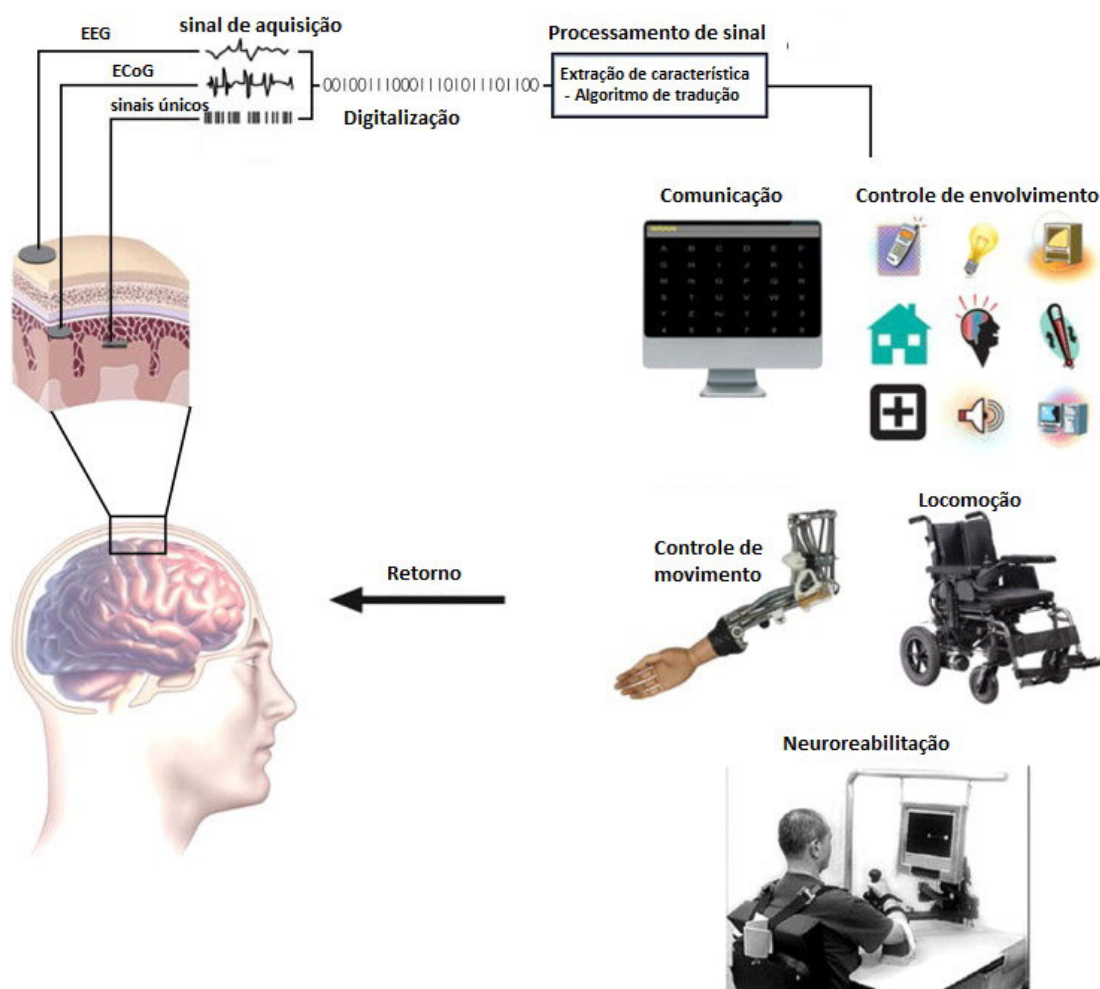
capaz de transmitir uma informação de forma direta, utilizando os métodos de neuroimagem, para extrair os sinais cerebrais, envolvendo os componentes da BCI; e os métodos de neuroestimulação, para transmitir os sinais de um cérebro a outro cérebro, utilizando CBI (KOO et al., 2017; STOCCO et al., 2015). Com essa nova estratégia tecnológica, denominou-se de BBI (*Brain-Brain Interface*) a sincronização dessa atividade bilateral entre dois cérebros, permitindo que pesquisadores conseguissem enviar sinais cognitivos de uma região cerebral específica e, transmiti-los de forma coerente a outro cérebro, que, por sua vez, conseguiu estabelecer uma ação mediada pelo cérebro emissor dos sinais cerebrais (GRAU et al., 2014; LEE et al., 2017; NICOLELIS, 2011; PAIS-VIEIRA et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2015; WANDER; RAO, 2014; RAO; STOCCO, 2014; YOO et al., 2013). Além disso, essa técnica pode ser empregada de forma invasiva ou não invasiva, sendo que o método não invasivo proporciona maior segurança para experimentos em humanos.

2.2 Interface Cérebro-Cérebro (*Brain-Brain Interface* - BBI)

Basicamente, os trabalhos relacionados à BBI abordaram campos de interações restritas das propriedades cerebrais, como a atividade motora, a atividade visual e a sincronização da atividade cerebral. Ambos os trabalhos mostraram uma transferência de informação na forma concisa para ativar neurônios de uma área específica do cérebro, a fim de realizar determinadas intenções compartilhadas entre sujeitos (animais ou humanos) (GRAU et al., 2014; LEE et al., 2017; NICOLELIS, 2011; PAIS-VIEIRA et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2015; WANDER; RAO, 2014; RAO; STOCCO, 2014; YOO et al., 2013).

O combinado dos métodos de neuroimagem e neuroestimulação é a forma utilizada para conseguir transmitir um sinal cerebral de um cérebro a outro, envolvendo as técnicas para aquisição e processamento da atividade neuronal do cérebro emissor e, posteriormente, estimular uma área específica no cérebro receptor com os sinais processados. O registro e a estimulação desses sinais podem ser tanto invasivos quanto não invasivos, sendo que o método não invasivo proporciona maior segurança para os experimentos em humanos. Com essa abordagem tecnológica, é capaz de sincronizar uma atividade bilateral entre dois cérebros (BBI), permitindo que pesquisadores conseguissem enviar sinais cognitivos de uma região cerebral específica e, transmiti-los de forma coerente a outro cérebro, conseguindo estabelecer uma ação mediada pelo cérebro emissor dos sinais cerebrais (GRAU et al., 2014; LEE et al., 2017; NICOLELIS, 2011; PAIS-VIEIRA et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2015; WANDER; RAO, 2014; RAO; STOCCO, 2014; YOO et al., 2013).

Existem muitas técnicas que podem ser usadas como métodos de neuroimagem, utilizados para extrair atividade neural em estudos de BCI, além de usar para a criação



h

Figura 1 – Componentes de um sistema BCI. A atividade cerebral é registrada pelos eletrodos localizados no couro cabeludo. Os sinais cerebrais são amplificados e digitalizados. As características do sinal são extraídas e depois convertidas em comandos para controlar um dispositivo de saída. BCI = interface cérebro-computador; ECoG = eletrocorticografia; EEG = eletroencefalografia. Adaptada de (SHIH; KRUSIENSKI; WOLPAW, 2012)

de BBI. Em termos de invasividade, BBI também pode ser categorizado como métodos invasivo ou não invasivo, dependendo do modo como a atividade cerebral é medida. As abordagens invasivas podem ser eletrodos implantados (COLLINGER et al., 2013), ECoG (BLAKELY et al., 2009), matriz de microeletrodos corticais (PAIS-VIEIRA et al., 2015; PAIS-VIEIRA et al., 2013), bem como as técnicas não invasivas sugeridas para pesquisas em humanos, assim como EEG (NUNEZ; SRINIVASAN et al., 2006), fMRI (YOO et al., 2004), MEG (MELLINGER et al., 2007), NIRS (MIN; MARZELLI; YOO, 2010) e *Funcional Transcranial Doppler Sonography* (MIN; MARZELLI; YOO, 2010).

O método de neuroimagem, como por exemplo, o EEG, registra a soma da atividade neuronal de células piramidais, induzidas por estímulos excitatórios ou inibitórios de neurônios, possuindo propriedades elétricas intrínsecas, sendo caracterizado por uma corrente alternada (positiva e negativa). Apesar de existir dois tipos de atividade neuronal

(potenciais de ação e potenciais pós-sinápticos), o EEG só pode registrar potenciais pós-sinápticos, pois os potenciais de ação ocorrem muito rápidos e breves, com duração de 1 milissegundo (ms), assim, os eletrodos são incapazes de detectar a atividade. Porém, potenciais pós-sinápticos simulam a mudança na carga elétrica que ocorre fora da membrana celular, e dura no espaço extracelular cerca de 200 ms (BERES, 2017). Dessa forma, o EEG representa o somatório algébrico dos potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios, sendo processados e utilizados por componentes baseados em BCI para modulação da aprendizagem do cérebro receptor.

Já as técnicas de estimulação cerebral invasivas usadas por CBI podem ser eletrodos implantados, Microstimulação Intracortical (*Intracortical Microstimulation* - ICMS) (O'DOHERTY et al., 2011; VENKATRAMAN; CARMENA, 2011) e Estimuladores Cerebrais Profundos (DBS) (PERLMUTTER; MINK, 2006), para as técnicas não invasivas estão disponíveis a estimulação magnética transcraniana (*Transcranial Magnetic Stimulation* - TMS) (HOY; FITZGERALD, 2010; O'SHEA; WALSH, 2007) e a Ecografia com Foco Transcraniano (*Transcranial Focused Ultrasound* - FUS) (LEE et al., 2017). Com o uso desses métodos, uma BBI pode ter a capacidade de ler informações da atividade neural e conseguir enviar informações digitais de volta para a atividade neural de outro cérebro (RAO; STOCCO, 2014). Pois, o cérebro dificilmente disponibiliza para a consciência o conhecimento introspectivo na forma verbal, ou seja, não pode ser voluntariamente colocado em forma linguística (RAO; STOCCO, 2014).

Os métodos de neuroestimulação, por exemplo, ICMS, TMS e FUS, modulam intencionalmente os sinais extraídos de um cérebro a outro cérebro, por impulsos elétricos ou magnéticos (O'DOHERTY et al., 2011; LEE et al., 2017). A TMS utiliza um campo magnético para evocar os potenciais de membrana dos neurônios corticais, que podem ser registrados no couro cabeludo usando EEG de alta densidade, a fim de modular a excitabilidade cortical para afetar as redes neurais (HOY; FITZGERALD, 2010; O'SHEA; WALSH, 2007). O uso desta técnica envolve os componentes da CBI para sincronizar a atividade cerebral de forma bilateral. Em BBI, um estímulo intencional é registrado por gravações do sinal cerebral usando métodos de neuroimagem. O sinal é amplificado e filtrado para extrair características potenciais e relevantes sob uma intenção do cérebro emissor. Nisso, o processamento do sinal é usado para preparar e decodificar a atividade cerebral de um indivíduo, transmitindo para uma máquina conectada aos métodos de neuroestimulação, a fim de estimular a área do cérebro receptor do sinal. E assim, ambos os envolvidos possam comunicar de forma direta usando apenas eletrodos e estimuladores (RAO; STOCCO, 2014).

A primeira experiência que possibilitou a transferência de informações sensório-motora relevante, em tempo real, entre dois cérebros foi no estudo de Pais-Vieira et al. (2013). Foi testado um novo canal de comunicação artificial em ratos acordados,

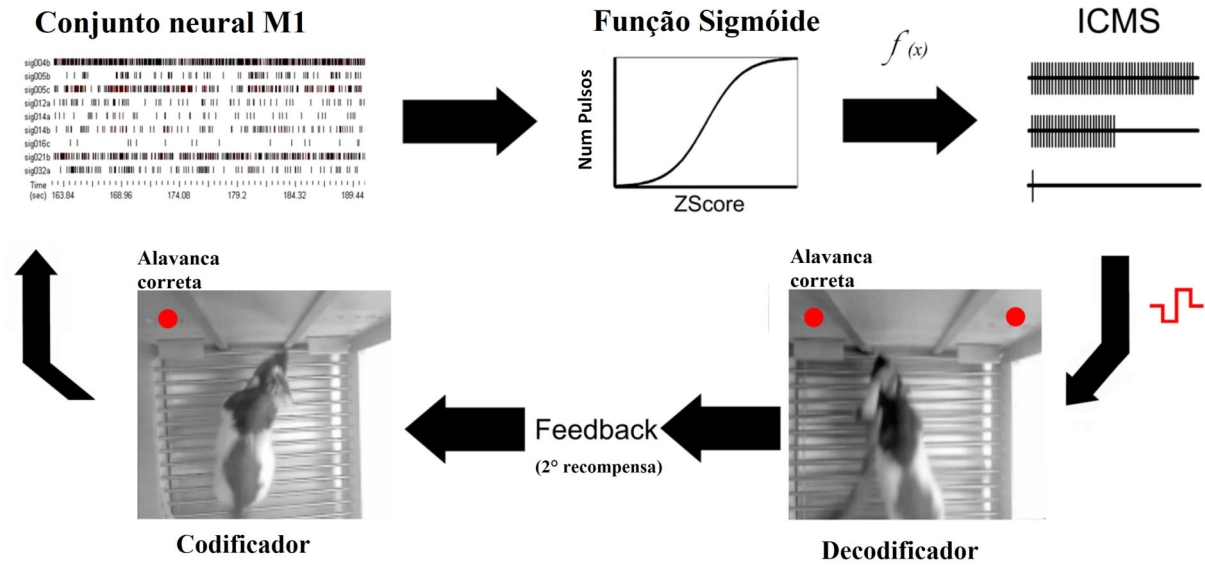


Figura 2 – Fluxo da transferência de sinais sensório-motor usando BBI. Para uma tarefa motora bem-sucedida, o rato pressiona uma das duas alavancas para receber uma pequena recompensa (água), no instante que o estímulo visual é sinalizado por um LED (círculo vermelho). Enquanto isso, a atividade neural M1 é registrada e transmitida ao rato decodificador, comparando o padrão do M1 do codificador com um teste padrão (média da taxa de disparo de uma amostra experimental). Um Z-score é calculado a partir da diferença dos picos da atividade cerebral das tentativas experimentais com o teste padrão. Em seguida, o Z-score é convertido através de uma função sigmoide em um padrão de ICMS, onde os padrões de microestimulação variaram em tempo real. Após a entrega da microestimulação ao córtex M1 do rato decodificador, este animal seleciona a mesma alavanca pressionada pelo codificador. O rato codificador recebe um *feedback* da atividade motora efetuada corretamente pelo rato decodificador, e então ambos recebem uma recompensa. (PAIS-VIEIRA et al., 2013)

utilizando tecnologias invasivas com matrizes de microeletrodos para registrar as gravações intracorticais de conjuntos neuronais (Figura 2). Os dados foram normalizados e convertidos em padrão ICMS para estimulação neural no cérebro do rato receptor, e assim, os ratos conseguiram compartilhar informações comportamentais significativas de um cérebro para outro em tempo real, em que o rato denominado "decodificador" poderia realizar tarefas sensório-motora semelhantes ao rato "codificador" (PAIS-VIEIRA et al., 2013).

Após o primeiro estudo de Pais-Viera nessa direção, vários outros pesquisadores propuseram novas metodologias para uma comunicação entre cérebros. Alguns estudos utilizaram as técnicas não invasivas, empregando os métodos de neuroimagem e neuroestimulação, tais como EEG/FUS com interação entre humanos (LEE et al., 2017) ou entre humanos e ratos (YOO et al., 2013), além da técnica de EEG/TMS para interação entre humanos (GRAU et al., 2014; MASHAT; LI; ZHANG, 2017; LI; ZHANG, 2016; RAO; STOCCO, 2014; STOCCO et al., 2015). Outros trabalhos usaram as técnicas invasivas com interação entre animais, utilizando o registro de neurônios intracorticais

para sincronizar a atividade cerebral e ICMS para microestimulação (PAIS-VIEIRA et al., 2013; PAIS-VIEIRA et al., 2015), além de um combinado de EEG (aquisição do sinal) com eletrodos intracortical (estimulação cerebral) (RAMAKRISHNAN et al., 2015).

Alguns estudos utilizaram técnicas caracterizadas como parcialmente invasiva, ou seja, apenas um dos cérebros era implantado eletrodos intracortical para estimulação neural e o outro cérebro utilizava técnicas não invasivas. Normalmente, estes estudos são estabelecidos em interação de humanos para estimular a atividade cerebral de um animal, como o trabalho de Li e Zhang (2016), que usou EEG não invasivo em humanos para aquisição do sinal e um Microestimulador invasivo portátil para estimular uma barata cyborg (LI; ZHANG, 2016). Koo et al. (2017) também utilizou EEG não invasivo e Eletrodos intracortical implantados no cérebro do rato para que um participante humano movimentasse um rato sem treinamento prévio (KOO et al., 2017).

A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos na área sobre BBI, abordando as técnicas utilizadas, os resultados alcançados e as limitações encontradas.

Tabela 1 – Características dos artigos buscados nas bases de dados sobre BBI.

Referências	Técnicas	Métodos ¹	Participantes	Objetivos	Resultados	Limitações
Pais-Vieira et al. (2013)	Invasiva	Eletrodos intracortical / ICMS	N = 3 ratos (emissor); N = 4 ratos (receptor)	Pressionar duas alavancas depois de LED acesso e avaliar com os bigodes o diâmetro de uma abertura (estreita ou larga) dentro de uma caixa.	Pressão da alavanca: os ratos receptores alcançaram $64,32 \pm 1,1\%$ de precisão com latência de $13,59 \pm 0,5$ segundos. Discriminação do diâmetro de abertura com seus bigodes: $62,34 \pm 0,59\%$, com a latência de $2,68 \pm 0,09$ segundos.	Treinamentos antecipados para adaptação do percurso.
Yoo et al. (2013)	Não invasiva	EEG/FUS	N = 6 pessoas (emissor); N = 6 ratos (receptor)	Estimular a área motora cerebral de um rato para excitar a cauda.	Precisão da interface de $94,0 \pm 3,0\%$, com atraso de tempo de $1,59 \pm 1,07$ segundos desde a iniciação do pensamento até o movimento da cauda.	Uso de anestésicos e atraso no tempo de resposta.
Grau et al. (2014)	Não invasiva	EEG/TMS	N = 1 Pessoa (emissor); N = 3 pessoas (receptores)	Transferir via internet palavras simples como “hello”, “goodbye”.	Taxa de transmissão de 94% , 95% e 89% na primeira experiência, para o BCI, CBI e os componentes B2B combinados, respectivamente e, no segundo, as taxas de erro foram de 98% , 99% e 96% , respectivamente.	Treinamentos prévios para adaptação da técnica usada.
Rao e Stocco (2014)	Não invasiva	EEG/TMS	N = 3 pessoas (emissor); N = 3 pessoas (receptor)	Jogar um jogo de computador (identificar e destruir joguetes).	Os três pares de sujeitos identificaram e destruíram corretamente $83,3\%$, $25,0\%$ e $37,5\%$ dos foguetes.	Treinamentos antecipados para adaptação da tecnologia usada.
Stocco et al. (2015)	Não invasiva	EEG/TMS	N = 5 pessoas (emissor); N = 5 pessoas (receptor)	Responder 20 questões com respostas sim/não.	Os cinco pares de sujeitos conseguiram adinhar com sucesso em 72% dos jogos.	Treinamentos antecipados para adaptação da tecnologia usada.

Tabela 1. Continuada

Tabela 1 – Tabela Continuada

Referências	Técnicas	Métodos ²	Participantes	Objetivos	Resultados	Limitações
Ramakrishnan et al. (2015)	Invasiva	EEG/Eletrodos intracortical	N = 4 macacos rhesus (sincronizar atividade cerebral em conjunto)	Gerar movimentos 2D e 3D de um braço de avastar para colocar bolinhas dentro do círculo.	Movimentos 2D gerados pela diade variaram entre 80-86%. Movimentos 3D com a triade foi de $78\% \pm 0,37$ de precisão.	Treinamentos adaptados para adaptação da tecnologia usada.
Pais-Vieira et al. (2015)	Invasiva	Eletrodos intracortical /ICMS	N = 4 ratos (sincronizaram a atividade cerebral para executar uma tarefa em conjunto)	Sincronizar a atividade neural dos ratos para resolver problemas computacionais fundamentais.	Sincronização da atividade neural: $61,67 \pm 3,01\%$ de precisão. Classificação de estímulos: $61,24 \pm 0,5\%$ de precisão. Armazenamento e recuperação de memórias tácteis: $35,37 \pm 2,2\%$ de precisão. Processamento paralelo: $41,02 \pm 5,1\%$ de precisão.	Treinamentos, recompensas e anestésicos.
Li e Zhang (2016)	Parcialmente Invasiva	EEG/Microestimulação portátil	N = 6 pessoas (emissor); N = 3 baratas (receptor)	Movimentar uma barata <i>cyborg</i> por <i>bluetooth</i> em uma trilha em S.	A classificação on-line do BCI foi $78,56 \pm 10,45\%$ na precisão e a precisão da resposta média dos <i>cyborgs</i> usando este sistema atingiu $89,5 \pm 15\%$ de precisão.	Treinamentos.
Koo et al. (2017)	Parcialmente Invasiva	EEG/Eletrodos intracortical	N = 6 pessoas (emissor); N = 3 ratos (receptor)	Manipular o movimento do rato sem treinamento prévio por um labirinto em T.	Taxa média de sucesso foi de $82,2 \pm 5,44\%$.	Movimentos voluntários não controlados e demora no tempo de resposta.
Lee et al. (2017)	Não invasiva	EEG/FUS	N = 3 pessoas (emissor); N = 3 pessoas (receptor)	Detectar a função motora direcional da mão (esquerda ou direita) de outro participante (receptor).	A média de precisão variou de $93,3 \pm 7,6\%$ a $50 \pm 18\%$ entre os indivíduos.	Incompatibilidade dos participantes a técnica (Analfabetismo de BCI).
Mashat, Li e Zhang (2017)	Não invasiva	EEG/TMS	N = 5 pessoas (emissor); N = 5 pessoas (receptor)	Estimular outro sujeito (receptor), induzindo o movimento da mão.	Os experimentos controlados por humanos foi $85,7 \pm 12,13\%$ de precisão.	Treinamentos prévios para adaptação da técnica.

2.2.1 Limitações de BBI

2.2.1.1 Anestésicos

Em experiências com animais, alguns estudos usaram anestésicos como intervenção metodológica. Yoo et al. (2013), conseguiram que um humano excitasse a cauda de um rato anestesiado transcranialmente. Porém, houve atraso de tempo adicional, sugerindo que os atrasos são recorrentes da dependência de anestésicos ou talvez pela necessidade de um tempo para ativação dos músculos ligados ao movimento da cauda (YOO et al., 2013). Da mesma forma, Pais-Vieira et al. (2015), relataram que ao anestesiarem os ratos houve diferença no funcionamento da atividade cerebral. O treinamento diário resultou em um aumento significativo da atividade cortical correlacionada. No entanto, o uso de anestésicos interferiu na sincronização e a *Brainet* só poderia operar em ratos de comportamento acordado com expectativa de recompensa (PAIS-VIEIRA et al., 2015).

2.2.1.2 Aumento no período de latência

Houve um aumento no tempo de latência no uso de BBI. Yoo et al. (2013), informaram que possivelmente essa demora foi proporcionada pela dependência de anestésicos utilizados para imobilizar o rato na tarefa motora (YOO et al., 2013). No entanto, (KOO et al., 2017), mostraram que o objetivo dos testes propostos foi desenvolvido com sucesso, porém, os ratos precisaram de maior tempo para execução da trajetória pré-estabelecida e mostraram relatos de falhas devido aos movimentos voluntários que não puderam ser controlados pelo humano (emissor do sinal) (KOO et al., 2017).

2.2.1.3 Controle de movimentos voluntários

Os movimentos voluntários foram dificilmente controlados com a BBI desenvolvida. O modelo de *ratbot* usando a estimulação de via nigrostriatal foi desenvolvido para que humanos conseguissem controlar atividades cerebrais do rato para designar a direção em um labirinto T. Além disso, os movimentos voluntários do rato não puderam ser controlados e, conseqüentemente, sem a conclusão da tarefa planejada. Diferentemente dos demais estudos, o desempenho do sistema não melhorou ao longo do tempo, sugerindo que não houvesse aprendizagem dos animais (KOO et al., 2017).

2.2.1.4 Analfabetismo de BCI

O “analfabetismo de BCI” (isto é, baixa precisão no desempenho de BCI) por alguns participantes foi uma limitação encontrada no uso de BBI (LEE et al., 2017). Mesmo que houvesse uma boa precisão (70%) do desempenho das atividades envolvidas pelos participantes no geral, apenas 7 dos 29 cérebros envolvidos atenderam aos critérios.

2.2.2 Treinamentos

A respeito dos treinamentos envolvidos para obter maior discernimento à comunicação, alguns autores relataram que uso de treinamentos prévios favoreceu a adaptação dos participantes à tecnologia implementada e, conseqüentemente, a melhoria dos estímulos empregados e tempo de resposta de transmissão da informação (GRAU et al., 2014; LI; ZHANG, 2016; MASHAT; LI; ZHANG, 2017; PAIS-VIEIRA et al., 2015; PAIS-VIEIRA et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2015; RAO; STOCCO, 2014; STOCCO et al., 2015).

Alguns estudos utilizaram treinamentos prévios para envolver os participantes numa tomada de decisão (GRAU et al., 2014; LI; ZHANG, 2016; MASHAT; LI; ZHANG, 2017; PAIS-VIEIRA et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2015; RAO; STOCCO, 2014; STOCCO et al., 2015). No trabalho de Pais-Vieira et al. (2015), por exemplo, todos os animais envolvidos no estudo foram treinados previamente até atingir uma precisão de 80% com estímulos táteis ou visuais, favorecendo a habilidade dos animais para desenvolver as tarefas requisitadas, como selecionar uma das alavancas ou escolher o diâmetro correto de uma caixa com o nariz (PAIS-VIEIRA et al., 2015). Li e Zhang (2016) utilizaram as sessões de treinamento para classificar a precisão do algoritmo de otimização. Dessa maneira, os participantes do estudo foram capazes de movimentar uma barata *cyborg* via *Bluetooth* e percorrer um caminho em forma de "S" (LI; ZHANG, 2016). Rao e Stocco (2014), relataram uma melhora no desempenho dos cérebros que recebiam os treinamentos prévios permitindo que dois humanos realizasse uma tarefa cooperativa como um canal de comunicação para jogar um jogo de computador, conectados via internet e separados por uma distância aproximada de 1 km. Dessa forma, sempre que o computador do cérebro receptor recebia um comando relacionado ao jogo, um pulso TMS era entregue a uma região pré-selecionada do cérebro, causando um rápido empurrão na mão direita do receptor posicionada acima do *touchpad*, de forma inconsciente (RAO; STOCCO, 2014).

Grau et al. (2014) relataram que os participantes (receptores) também passaram por um período de familiarização da técnica, com estímulos de TMS para identificar a intensidade de pulsos de forma consciente e sentiam percepção de "fosfenos", que são sensações visuais temporárias na forma de linhas ou manchas luminosas, resultante da estimulação das áreas de processamento visual para a transmissão de informação ao receptor, que mais tarde foi interpretada como um código binário usados para codificar palavras transmitidas no teste (GRAU et al., 2014). Com a mesma metodologia, Stocco et al. (2015), também utilizaram as percepções de fosfenos para codificar a resposta de um jogo de 20 questões ("sim" presença de fosfeno e "não" sem presença de fosfeno). O participante receptor foi treinado por 2 horas com sessão de TMS com 10 estimulações para identificar a percepção do fosfeno. Um limiar de intensidade controlou a estimulação do córtex visual, acima de 50% havia a percepção de fosfeno e abaixo disso (40%) o participante não conseguiu relatar o fosfeno. O cérebro emissor transmitiu suas respostas

do jogo para o cérebro receptor, que não tinha sido informado das perguntas, mas foi incentivado a relatar se viu fosfeno ou não após a transmissão do sinal cerebral e, assim, concluir a intensão transmitida do emissor para o receptor (STOCCO et al., 2015).

Experimentos com macacos mostraram que o treinamento instituiu uma maior coordenação do comportamento conjunto, reduzindo significativamente o tempo de realização dos procedimentos indicado nas sessões de testes, além de aumentar a correlação na atividade neural entre diferentes cérebros. O treinamento foi composto em torno de 21 sessões constantes (13 sessões de controle manual e 8 sessões de controle cerebral) para realizar movimentos com o braço *joystick* de mola para colocar bolinhas no interior de um círculo visualizado na tela do computador (RAMAKRISHNAN et al., 2015). Em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa (PAIS-VIEIRA et al., 2015), também relatou com sucesso a sincronização neural utilizando cérebros de ratos na forma de *Brainet* para solucionar problemas computacionais. Para conseguir este objetivo, os ratos receberam sessões de treinamentos e recompensas (água), a fim de sincronizar a atividade neural com estímulos de ICMS. No estudo, de modo geral, foram registrados 2.738 neurônios em 71 sessões de testes, sendo que cada sessão era estimulada por 20 impulsos a 22-26 Hz.

Em outras experiências com humanos mostraram que os treinamentos contribuíram para a melhoria do desempenho e adaptação da técnica utilizada (GRAU et al., 2014; MASHAT; LI; ZHANG, 2017; RAO; STOCCO, 2014; STOCCO et al., 2015). A utilização contínua de BBI foi capaz de reduzir sua latência de resposta, aumentando a relação sinal/ruído de sua atividade neuronal dos cérebros envolvidos. Outro fator importante foi que à medida que os ratos aprenderam a usar os sinais de microestimulação os estímulos neurais foram melhorando (PAIS-VIEIRA et al., 2015). Além disso, os treinamentos propiciaram aos participantes uma melhor adequação da técnica para desempenhar uma tarefa proposta, por exemplo, saber dizer se sentiam ou não a presença de fosfeno com a estimulação de TMS antes de iniciar os testes finais (GRAU et al., 2014; STOCCO et al., 2015). Em outros experimentos, o treinamento diário pôde resultar em um aumento significativo da atividade cortical correlacionada, melhorando, significativamente, o tempo de realização das atividades envolvidas (PAIS-VIEIRA et al., 2015; RAMAKRISHNAN et al., 2015). Porém, Rao e Stocco (2014), relata que nem todos os participantes (humanos) sincronizaram totalmente a atividade cerebral para conseguir o objetivo final de um jogo de computador (identificar e destruir foguetes para salvar uma cidade), além do mais, as ações estabelecidas pelo cérebro receptor não foram processadas conscientemente pelo participante (RAO; STOCCO, 2014).

Talvez, caso não tivesse treinamentos antecipados, possivelmente o cérebro receptor iria receber um estímulo, porém, não seria capaz de exercer uma tomada de decisão sozinha. Percebeu-se nesses estudos, que a transferência de informação entre cérebros são baseados estímulos simples, pelo motivo da informação semântica ainda não ser

transferida para o cérebro receptor. Pois, a informação semântica é fundamentada pela relação entre um sinal ou uma palavra registrada na realidade, sendo excepcionalmente criada e utilizada pelo desenvolvimento biológico (JOHANNSEN, 2015). Observa-se, ainda, que os treinamentos reforçaram a aprendizagem dos indivíduos. Porém, ainda não está certo se há um condicionamento entre os cérebros envolvidos nas pesquisas, mas percebe-se que o treinamento é fundamental para obter uma comunicação mais adaptada.

2.3 Aprendizagem Condicionada

A aprendizagem é o processo pelo qual novos conhecimentos, comportamentos, atitudes e ideias são adquiridos. Pode ocorrer através de caminhos inconscientes e conscientes. O condicionamento é um tipo de aprendizagem responsável por consequências no comportamento e ocorre em grande parte sem que o sujeito esteja consciente do processo (SISON; GERLAI, 2010). A capacidade de aprendizado é uma adaptação evolutiva transitória que não dura o tempo suficiente para uma adaptação evolutiva direta. Existem dois tipos de aprendizado: relações no mundo (condicionamento clássico ou pavloviano) e as consequências das próprias ações no mundo (condicionamento operante ou instrumental). Portanto, tanto o condicionamento operante quanto o clássico é conceituado como detecção, avaliação e armazenamento de relações temporais (BREMBS; HEISENBERG, 2000; B., 2017).

O condicionamento clássico pode ser descrito como a transferência da propriedade que desencadeia a resposta de um estímulo biologicamente significativo para um novo estímulo sem essa propriedade. Assim, o condicionamento clássico pode ser um aprendizado sobre o temporal (ou causal), relações entre estímulos externos para permitir um comportamento preparatório apropriado antes de eventos biologicamente significativos. Assim, a relação condicional entre um estímulo ambiental (condicionado) e a ocorrência subsequente de um estímulo incondicionalmente reforçador (incondicionado), que provoca de maneira confiável uma resposta incondicional, tem como variáveis dependentes a frequência, a duração e a latência das respostas desencadeadas (BREMBS; HEISENBERG, 2000; PAVLOV, 1927; B., 2017).

Em contraste com o condicionamento clássico, os processos subjacentes ao condicionamento operante podem ser diversos e pouco compreendidos. Em tese, um ciclo de *feedback* entre o comportamento do animal e o reforçador é fechado. Todos os paradigmas de condicionamento operante têm em comum que o animal, primeiro, precisa “encontrar” a saída motora que controla os reforçadores (comportamento operante). Em resumo, o condicionamento operante descreve os estímulos nos quais um evento de reforço é entregue após e depende da ocorrência da resposta registrada, tendo como variáveis dependentes do condicionamento a taxa, a duração, a força e a latência da resposta registrada (BREMBS;

HEISENBERG, 2000; SKINNER, 1938).

Assim, enquanto no condicionamento clássico a associação de novo estímulo e estímulo biologicamente significativo é considerada responsável pelo efeito de aprendizagem, no condicionamento operante uma associação reforçadora de comportamento ao estímulo biologicamente significativo é considerada como o processo primário. Contudo, modelos animais são reconhecidos como um meio importante para estudar processos biológicos complexos e comportamentais.

2.4 *Zebrafish*

O *Zebrafish* (*Danio rerio*), é um pequeno peixe teleósteano de água doce, tendo origem no sul da Ásia (ENGESZER et al., 2007). No Brasil, é chamado de “paulistinha” ou *zebrafish*, e é bastante usado em atividades de aquarismo. Nas pesquisas, esse peixe é preferido para as análises comportamentais na neurociência, por ser potencialmente adequado para estudos de aprendizado em vertebrados, por causa do seu sistema complexo, da simplicidade na prática da manutenção, da natureza prolífera e por possuir muito desenvolvimento de marcadores genéticos, além da praticidade na manipulação, devido ao seu tamanho pequeno (4 cm) e desenvolvimento rápido (5 dias após incubação). Além do ótimo desempenho comportamental, o *Zebrafish* possui uma homologia com sequências nucleotídicas e funcionais entre os genes de mamíferos, o que torna um atrativo para as pesquisas (AVDESH et al., 2012; SISON; GERLAI, 2010). O *zebrafish* possui uma forte genética, sendo capaz de realizar tarefas cognitivas e, suas vias neurais mais simples e estruturas do cérebro representam um modelo adequado para estudos de aprendizagem (LUCHIARI; CHACON, 2013).

2.5 Aprendizagem Condicionada de *Zebrafish*

O aprendizado e a memória são processos cerebrais altamente complexos, e podem influenciar os animais a ajustar seu comportamento em ambientes variáveis. Assim o aprendizado desempenha um papel importante no desenvolvimento desse comportamento. Por exemplo, os membros de um cardume observam o comportamento de seus companheiros e são capazes de responder às ameaças dos predadores de forma mais eficiente, dando uma resposta de fuga. Em outro aspecto, o cardume com membros da mesma espécie também pode melhorar a eficiência de forrageamento pela maior detecção de recursos alimentares (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015). Contudo, muitos modelos animais vêm sendo estudados no campo da neurociência e psicobiologia (CHACON; LUCHIARI, 2014).

Em termos comportamentais, vários estudos mostraram o aprendizado do *zebrafish* usando distintas abordagens visuais e sonoras: identificação das preferências de cores

(AVDESH et al., 2012), uso de luzes (para associação de perigo, bem-estar, evacuação, memória) (CHACON; LUCHIARI, 2014; DOYLE et al., 2017), exercício físico (LUCHIARI; CHACON, 2013), uso de sons para identificar as percepções sonoras do peixe (BHANDIWAD et al., 2013; CERVI; POLING; HIGGS, 2012; NEO et al., 2015; ZEDDIES; FAY, 2005) e várias outras abordagens.

Os ensaios comportamentais de aprendizado e memória podem ser empregados mesmo no estágio larval do *zebrafish*. Muitas experiências para aprendizado e memória no *zebrafish* já foram testadas e, continuam ainda sendo atrativo para pesquisas. Alguns trabalhos envolvem labirinto (AL-IMARI; GERLAI, 2008; SISON; GERLAI, 2010), labirinto em T (NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006; PEITSARO et al., 2003), labirinto em Y (GRELLA; KAPUR; GERLAI, 2010), câmara clara e escura (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010; SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999), condicionamento ativo apetitivo da caixa de transporte (PATHER; GERLAI, 2009), tarefas de discriminação de escolha apetitiva (BILOTTA et al., 2005), tarefa de memória de alternância (WILLIAMS; WHITE; JR, 2002), uma tarefa de aprendizado de esquiva inibitória (BLANK et al., 2009)) e teste de preferência por local condicionado (NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006).

A maioria dessas pesquisas é baseada em discriminação de cores, envolvendo estímulos visuais para serem usados como parte para o aprendizado do *zebrafish* (métodos de aversão ou agradáveis). Por exemplo, uma tarefa de aprendizado de esquiva passiva inibitória, em que envolve um choque elétrico para treinar o *zebrafish* e inibir a natação em um compartimento escuro de um branco (BLANK et al., 2009). Em outro estudo, para associação à recompensa alimentar no labirinto em T, estímulos visuais, como mangas plásticas de diferentes cores (vermelho, azul, verde e roxo), foram usados (COLWILL et al., 2005). Em outro, uma cor também foi usada como sugestão para treinar o *zebrafish* a nadar para uma câmara rica em ambiente, cheia de mármore e cascalho coloridos (NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006). O labirinto positivo também utiliza um cartão vermelho para prever a recompensa (SISON; GERLAI, 2010).

Em um condicionamento complexo, restringir a natação a um pequeno espaço no canto era a punição sob as escolhas incorretas, enquanto fornecia espaço livre para a natação recompensava a escolha lateral correta. Em outra pesquisa, na tarefa de discriminação de escolha apetitiva, o *zebrafish* aprendeu a ir ao compartimento com um leve estímulo para receber a recompensa alimentar (BILOTTA et al., 2005). A avaliação comportamental do *zebrafish* mostra uma análise sobre os eventos altamente estressantes, como a predação, servindo para investigar diferenças individuais na aprendizagem e na memória. Além disso, o congelamento é um dos comportamentos mais consistentes e conservados para avaliar o estresse, o medo da aprendizagem e da memória do *zebrafish*, além disso os movimentos erráticos são usados para essa finalidade (BAKER; WONG, 2019).

A quantificação das respostas comportamentais pode avaliar diferentes situações em

conjunto de estímulos ou estressores. Com isso, uma análise quantitativa do comportamento é considerada um bom indicador das respostas do organismo (BAKER; WONG, 2019; VIGNET MARIE-LAURE BÉGOUT; COUSIN, 2013). Nisso, algumas pesquisas estão indo para essa direção, quantificando o comportamento do *zebrafish* usando recursos de análise profunda e combinando experimento e teoria para delinear como o cérebro do *zebrafish* se transforma em uma atividade sensório-motora, desde a entrada sensorial à saída locomotora, chegando a um modelo quantitativo de circuito do cérebro inteiro ao avaliar sequencialmente os modelos possíveis com dados comportamentais, funcionais e anatômicos. Observando que as análises no nível comportamental, cerebral total e de sistemas foram críticas para definir uma arquitetura de circuito biológico aceitável e funcionalmente relevante (NAUMANN et al., 2016).

Apesar de existirem várias abordagens para avaliação comportamental de *zebrafish*, muitas dessas avaliações podem ser estabelecidas por sistemas automáticos para não ter influência externa. Normalmente, esses algoritmos são desenvolvidos de forma separada aos sistemas de condicionamento automáticos, limitando as capturas de vídeos no momento de treinamento, para posteriormente serem analisados. Logo, um procedimento totalmente automático pode diminuir o viés humano durante a análise da pesquisa, pois muitos procedimentos requerem manutenção do ambiente em horários determinados, como o controle da alimentação, da oxigenação ou dos estímulos acionados no tanque (luzes ou sons). Nisso, a automação dos procedimentos e análise de vídeos para explorar a extensão experimental é bastante favorável para as pesquisas na área comportamental.

2.6 Algoritmos para Avaliação Comportamental de *Zebrafish*

Em grupos de animais, o comportamento tem sido bastante estudado para avaliar a comunicação entre as espécies para um bom desempenho de tarefas em conjunto. Há um interesse intenso nas pesquisas para avaliar o comportamento coletivo de animais, a fim de explicar sua evolução cognitiva (WANG et al., 2016). Diante dessa perspectiva, muitas pesquisas se basearam em comportamento animal, bem como a criação de algoritmos bioinspirados para resolução de problemas de otimização (DORIGO et al., 2006) e sistemas inteligentes de avaliação comportamental (SISON; GERLAI, 2010; CERVI; POLING; HIGGS, 2012; AVDESH et al., 2012; MANABE; DOOLING; TAKAKU, 2013b).

Além disso, muitos trabalhos comportamentais têm proposto medir o nível de aprendizagem dos peixes por métodos computacionais. Dentre os algoritmos de visão computacional para avaliação do comportamento, os métodos para rastreamento de objetos são os mais utilizados, pois possibilita uma avaliação intensa dos movimentos imprevistos de diferentes grupos de animais, essenciais para uma análise do comportamento coletivo (WANG et al., 2016; QIAN; CHENG; CHEN, 2014; BAI et al., 2018; PÉREZ-ESCUADERO

et al., 2014; DELCOURT et al., 2013).

Ao rastrear um único peixe, pesquisadores podem investigar o comportamento individual do peixe em várias circunstâncias. No entanto, para estudar seu comportamento social, o rastreamento de vários objetos é uma maneira eficaz (WANG et al., 2016). Diversos algoritmos de rastreamento de múltiplos indivíduos já foram propostos para avaliar o comportamento social do *zebrafish* (WANG et al., 2016; QIAN; CHENG; CHEN, 2014; BAI et al., 2018; CHENG, 2017), baseando-se em aprendizagem profunda (CHENG, 2017), filtros adaptativos (WANG et al., 2016; QIAN; CHENG; CHEN, 2014) e outros. Porém, ainda é difícil conseguir rastrear por longo tempo o comportamento do peixe, levando a perda de identidade ao longo dos quadros, havendo uma necessidade de ajuste nas técnicas propostas. Normalmente, a análise é baseada por captura de quadros em vídeos, processando as imagens dos quadros para a detecção e rastreamento do cardume.

No entanto, alguns problemas são recorrentes na avaliação da escola de peixes de forma computacional, sendo apontadas no processamento de dados nas etapas de detecção e rastreamento. Na detecção, é comum haver interferência na identificação dos peixes de forma automática, e em caso do uso do baricentro para detecção, há limitação de indivíduos; além disso, a falha na detecção pode existir em momentos de oclusão ou quando a estrutura visual do peixe muda ao longo dos movimentos repentinos no tanque. Já no rastreamento, que é uma etapa dependente da detecção, pode apresentar dificuldades no decorrer do tempo, onde o rastreamento pode ser perdido devido a natação complexa dos peixes, erros na detecção e fragmentação da trajetória (WANG et al., 2016; MANABE; DOOLING; TAKAKU, 2013a) e, conseqüentemente, a perda da identidade dos peixes.

Diversos autores propuseram sistemas para resolver esses desafios citados, onde criaram modelos complexos de identificação de objetos, sistemas de detecção por *tags* de cores (DELCOURT et al., 2013), etiquetas de identificação de objetos (DELCOURT et al., 2011), conjunto de variáveis para identificação única, algoritmos de alta complexidade de tempo na identificação por contorno e, detecção por parte separando a cabeça e corpo do peixe (WANG et al., 2016). No entanto, esses algoritmos possuem complexidade de análise e processamento, o que leva a requisição de maiores quantidades de quadros por segundo das imagens (cerca de 60 a 100 quadros por segundo) (WANG et al., 2016) e, por vezes, são semiautomáticos (MILLER; GERLAI, 2007), necessitando de intervenção manual para reconectar o rastreamento.

Os sistemas de rastreamento de múltiplos objetos 2D existentes, em sua maioria, tratam cada indivíduo rastreado como um único ponto e, em outros casos, o sistema não faz a identificação do peixe totalmente sozinho, tendo um pouco de esforço humano. Como por exemplo, um sistema para rastrear um grupo de peixes clicando primeiro no focinho ou no corpo de cada peixe manualmente (MILLER; GERLAI, 2007). No sistema *EthoVision* (PHAM et al., 2009), pode-se detectar e rastrear o baricentro de diferentes

tipos de organismos, porém, o número de objetos é limitado e, se ocorrer uma oclusão, a identidade dos objetos é perdida. Outros sistemas são baseados em detecção de cores, usam *tags* de cores para resolver o problema de identificação individual, mesmo quando ocorre oclusão (DELCOURT et al., 2013). Porém, o número de indivíduos rastreados simultaneamente é limitado, afetando a análise do comportamento social dos indivíduos.

Sistema como o *idTracker* (PÉREZ-ESCUDERO et al., 2014), usa um conjunto de características para reconhecer cada objeto rastreado, assim, após a oclusão, a identidade de cada objeto será mantida. A limitação é que quando o número de objetos é grande, a taxa de erros de identificação aumentará, significativamente, devido à aparência semelhante dos objetos rastreados. Em outro trabalho, um modelo de corpo de peixe retangular em cadeia foi proposto, a fim de rastrear primeiro a cabeça do peixe e, em seguida, a cadeia retangular da parte do corpo é ajustada, dessa forma, o peixe dificilmente irá se perder na fase de detecção e rastreamento no instante de tempo (WANG et al., 2016).

Os sistemas não se limitam em apenas rastrear o peixe em um vídeo, mas é uma ótima alternativa para identificar peixes individualmente e quantificar o seu comportamento durante uma atividade. Após esse rastreamento, várias outras abordagens podem ser atribuídas, podendo adicionar algoritmos de aprendizado de máquina, como por exemplo, as redes neurais artificiais, permitindo uma análise mais completa do comportamento dos animais.

2.7 Redes Neurais Artificiais

As redes neurais artificiais (RNAs) são sistemas computacionais que possuem unidades de processamento interconectadas, chamados de neurônios artificiais, para computar determinadas funções matemáticas, geralmente não linear, comportando-se semelhante ao funcionamento de um cérebro humano (HAYKIN, 2007). As RNAs solucionam diversos problemas que possuem um alto processamento de dados, bem como aproximação de funções, controle de processos, reconhecimento e/ou classificação de padrões, agrupamento de dados, sistemas de previsão, otimização de sistemas e memórias associativas (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016). Assim, a RNA é como um processador paralelo distribuído que armazena conhecimento experimental e modela o cérebro em conhecimento adquirido através de um processamento de aprendizagem e da conexão para armazenar conhecimento adquirido, tendo habilidade de aprender e generalizar, produzindo saídas adequadas para entradas (HAYKIN, 2007).

O sistema nervoso é formado por um conjunto complexo de células, os neurônios biológicos, responsáveis pelo funcionamento e comportamento do corpo e da mente. O cérebro é semelhante a um computador altamente complexo, não-linear e paralelo (HAYKIN, 2007). Por causa do grande processamento de informações que o cérebro realiza, muitos

sistemas foram adaptados com essa perspectiva, organizando seus parâmetros como resultado da interação com o meio externo, melhorando gradativamente o seu desempenho na solução de um determinado problema (FERNEDA, 2006). O sistema nervoso humano pode ser entendido como um sistema com três estágios: o centro do sistema (cérebro), que recebe informações e toma decisões, formando uma rede neural; os receptores, que convertem os estímulos do corpo ou do ambiente em impulsos elétricos e transmitem informação para a rede neural; os atuadores, que convertem impulsos elétricos em respostas para a saída do sistema (HAYKIN, 2007). A Figura 3, apresenta a estrutura de um neurônio biológico.

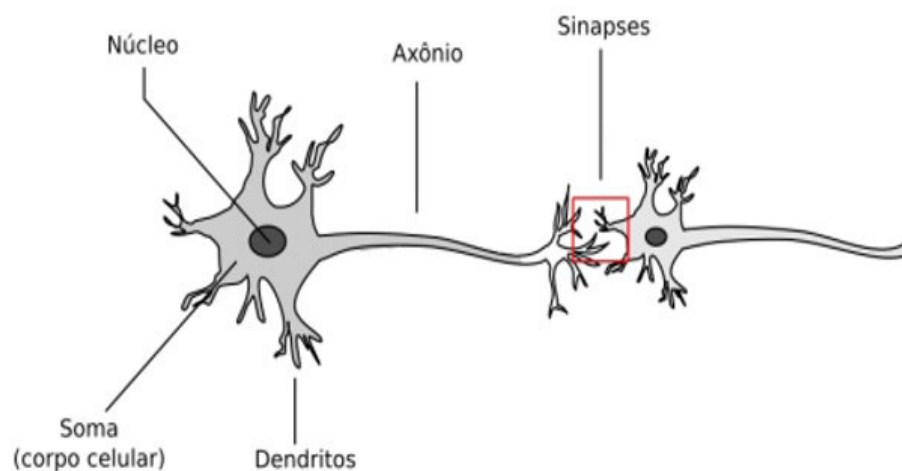


Figura 3 – Estrutura básica de um neurônio biológico. Os componentes são os dendritos, responsáveis por receber os estímulos de outros neurônios conectados; o corpo celular do neurônio (soma), que coleta e combina informações vindas dos demais neurônios conectados; e o axônio, responsável por transmitir impulso nervoso para outra célula, formando uma sinapse. (AZEVEDO, 2016)

A Figura 4 apresenta a estrutura de um neurônio artificial. De forma análoga, um neurônio artificial possui o seu funcionamento semelhante ao neurônio biológico. Baseia-se em entradas de dados externos $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ (simulando os dendritos). As entradas na rede é ponderada por pesos $w_{k1}, w_{k2}, \dots, w_{kn}$ para simular as sinapses, esses dados serão processados na rede por um combinador linear Σ (representado pelo corpo celular), e devolverá uma saída u_k , que passará por um limiar de ativação θ_k que especifica o limite apropriado para que o resultado gere um valor de ativação (análogo ao axônio). Esse potencial de ativação é o resultado da diferença entre o valor gerado pelo combinador linear e o limiar de ativação. Além disso, uma função de ativação $\varphi(\cdot)$ é adicionada na saída da rede para limitar o valor resultante y_k produzido pelo neurônio.

Um neurônio pode funcionar como uma RNA simples, chamada de *Perceptron*. Sua simplicidade deve-se à condição de ter apenas uma camada neural e um neurônio nessa

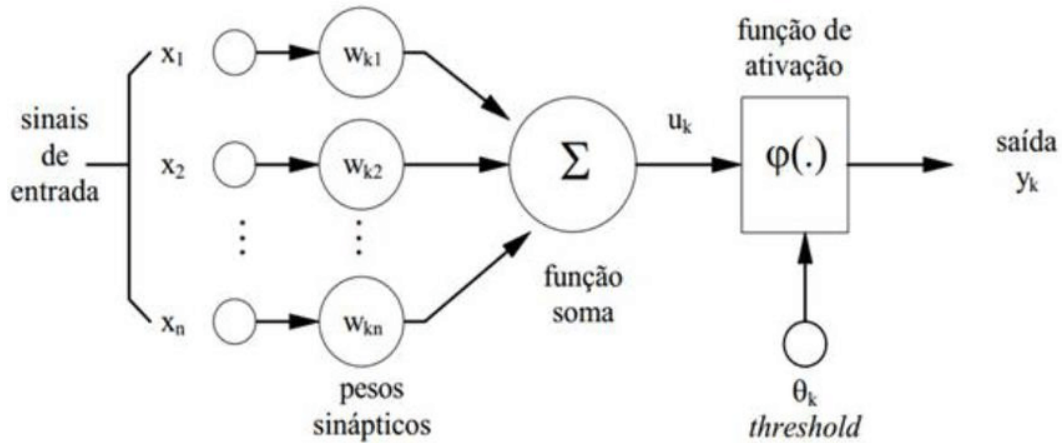


Figura 4 – Neurônio Artificial (*Perceptron*). Os sinais externos de entrada são processados pelo neurônio, atribuindo pesos sinápticos e calculados pelo combinador linear, sendo sua saída limitada pela função de ativação. (HAYKIN, 2007).

camada, porém, resolvem apenas problemas linearmente separáveis. O funcionamento do neurônio matematicamente ocorre por meio da aplicação das Equações 2.1 e 2.2:

$$u_k = \sum_{j=1}^m w_{kj} x_j \quad (2.1)$$

$$y_k = \varphi(u_k + \Theta_k) \quad (2.2)$$

sendo $x_1, x_2, \dots, x_m$ são os sinais de entrada $w_{k1}, w_{k2}, \dots, w_{km}$ são os pesos sinápticos do neurônio k e y_k é a saída do neurônio. A saída do neurônio é definida através da função de ativação $\varphi(\cdot)$ (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016).

Existem muitas funções de ativação para limitar a saída da RNA, mas as principais estão descritas a seguir:

- Degrau: a saída do neurônio é definida por dois estados (binário);
- Linear: a saída do neurônio não é alterada;
- Sigmoidal ou Logística: a saída do neurônio é mantida sempre para positiva no intervalo de 0 a 1;
- Tangente Hiperbólica: a saída do neurônio é definida entre -1 e 1;
- *ReLU (Rectified Linear Unit)*: é uma função não linear que não ativa os neurônios de saída ao mesmo tempo. Permite facilmente a retro-propagação dos erros e aumenta a velocidade de convergência.

2.7.1 Arquiteturas das redes neurais

A topologia das RNAs é dividida por camadas, sendo que a primeira usada para entrada dos dados externos, a partir da segunda pode ser chamada intermediária ou oculta, e a última camada é a de saída do resultado. Dessa forma, a organização da rede é estabelecida de maneira heurística e não determinística, dependendo do tipo de problema a ser solucionado, uma arquitetura deve ser projetada. As arquiteturas mais usadas são *feedforward* e recorrentes (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016; HAYKIN, 2007).

No modelo *feedforward*, a RNA é constituída de uma camada de entrada, conectadas por uma ou várias camadas intermediárias e uma camada de saída, sem interações entre neurônios da mesma camada, com fluxo de dados em somente uma direção, no sentido de direção da entrada, sem que haja realimentação dos dados. Esse tipo de modelo é bastante usado em problemas de aproximação de funções, identificação de sistemas, reconhecimento de padrões, otimização e outros (MEDEIROS, 2015). A Figura 5 apresenta uma topologia da representativa RNA *feedforward*.

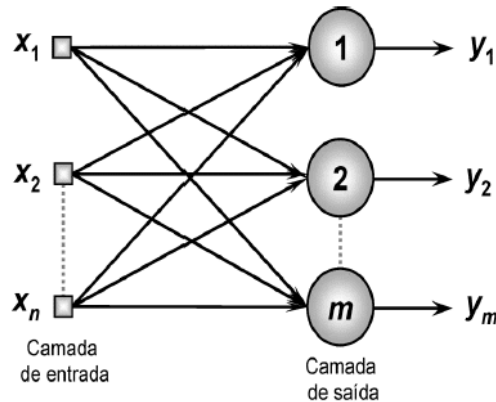


Figura 5 – Topologia da rede neural modelo *feedforward* (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016)

Diferentemente das redes *feedforward*, as redes recorrentes possuem uma ligação entre processos de uma mesma camada ou com processadores de uma camada anterior, ou seja, apresentam um laço de recorrência, gerando realimentação dos dados, que permite que a rede neural aceite uma sequência de entradas. Dessa forma, que a saída da etapa anterior é realimentada na rede para influenciar o resultado da etapa atual e para cada etapa subsequente. A sua estrutura, basicamente, consiste em uma camada de entrada, uma ou mais camadas ocultas e uma camada de saída. Esse tipo de modelo é usado para solucionar problemas de previsões em séries temporais, controles de processos e outros (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016). A Figura 6 apresenta uma topologia da rede neural modelo recorrente.

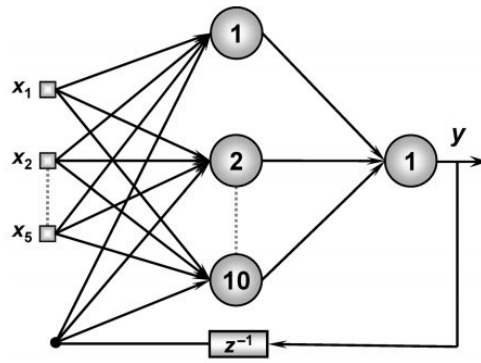


Figura 6 – Topologia da rede neural modelo recorrente (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016)

2.7.2 Processo de treinamento

O processo de treinamento das RNAs permite que a rede aprenda os padrões a ela apresentados, baseado no processo de ajuste de pesos por meio de entradas (estímulos), onde se adapta a cada interação da rede, conduzindo a melhoria de desempenho para execução de uma tarefa desempenhada. Com o ajuste de pesos, a rede consegue generalizar a solução para um determinado problema (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016). Os processos de treinamento e aprendizagem da RNA mais conhecidos são: treinamento supervisionado, treinamento não-supervisionado, treinamento por reforço, mas não se limita apenas a esses descritos.

Assim, o treinamento supervisionado é feito a partir de dados de entrada, com um conjunto de resultados esperados fornecido, sendo que a diferença entre a saída atual e a saída produz um erro, e o cálculo do erro permite que a matriz de pesos seja ajustada a cada treinamento. No entanto, o treinamento não-supervisionado não possui saída desejada, normalmente, apresenta apenas um único neurônio na camada de saída disparando uma resposta. Já no treinamento por reforço, é caracterizado quando um elemento externo avalia a resposta fornecida pela rede (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016; HAYKIN, 2007).

2.7.3 Perceptron Multicamadas (*Multilayer Perceptron* - MLP)

As redes Perceptron de múltiplas camadas (*Multilayer Perceptron* - MLP) possuem pelo menos uma camada intermediária (escondida) de neurônios, localizada entre as entradas e saídas desejadas, e possuem vantagens adicionais se comparadas com o perceptron de camada simples. Entre as camadas de entrada e saída, uma ou mais camadas ocultas são normalmente conectadas por matrizes de peso, bias e várias funções de ativação. Essas redes neurais possuem um poder computacional aplicadas em diversos tipos de problemas em diferentes áreas do conhecimento, sendo consideradas uma das arquiteturas mais versáteis quanto à aplicabilidade. As MLPs podem tratar dados que não são linearmente separáveis

(SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016; HAYKIN, 2007). Na Figura 7, está apresentada uma arquitetura da MLP, contendo uma camada de entrada, duas camadas escondidas e uma camada de saída.

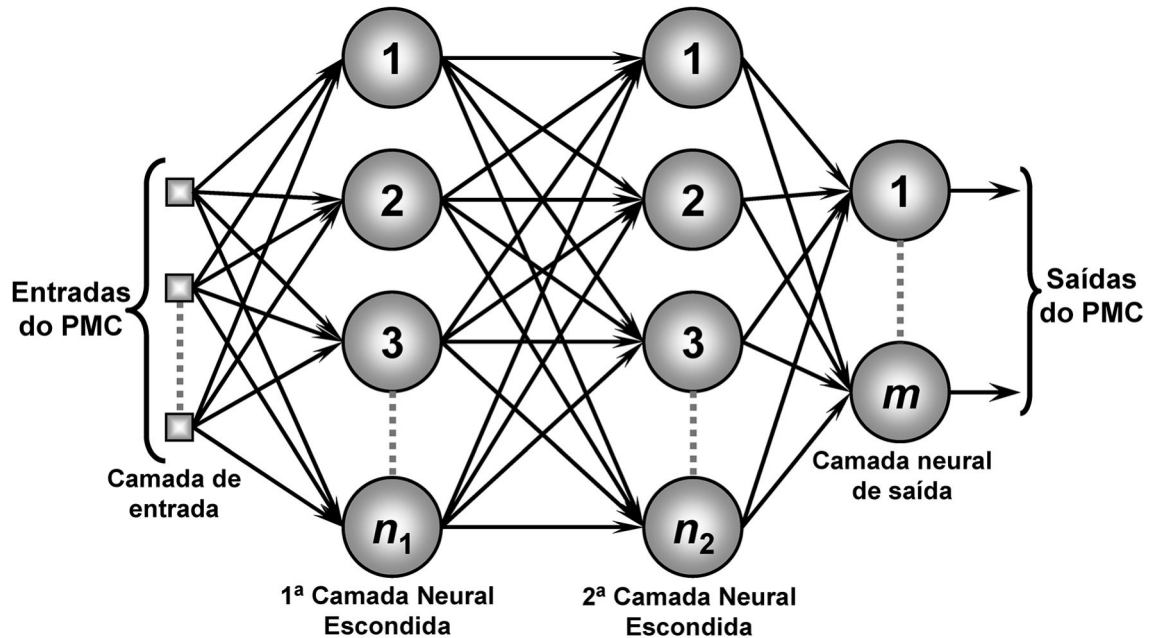


Figura 7 – Arquitetura das Redes Neurais Multicamadas. A rede multicamada possui uma camada de entrada, pelo menos uma camada escondida e uma camada de saída. Todos os seus neurônios são conectados para o processamento dos dados. (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016)

As principais diferenças entre os vários tipos de RNAs envolvem a arquitetura de rede. Além disso, a precisão obtida e a implementação da função dependem do número de neurônios utilizados nas camadas escondidas. As funções de ativação usadas nesse tipo de rede, são mais elaboradas, tratando problemas mais complexos e possuem menor índice de falhas quando gerados o resultado final. As MLPs podem solucionar diversos problemas como aproximação universal de funções, reconhecimento de padrões, identificação e controle de processos, previsão de séries temporais, otimização de sistemas e outros (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016).

Geralmente, uma rede neural é treinada usando o algoritmo de otimização descendente de gradiente estocástico, assim, os pesos são atualizados por meio do algoritmo de retropropagação, baseando na média dos erros calculados por uma função de perda. Normalmente, essa função calcula a diferença entre a saída real e a saída prevista. Em casos de problemas como regressão ou classificação, diferentes funções de perda podem ser aplicadas, levando em conta a aplicação da rede e a função de ativação usada na camada de saída das redes neurais (LE et al., 2019).

O treinamento da rede MLP é realizado de maneira supervisionada e o mecanismo de aprendizagem é denominado de algoritmo de retropropagação de erro (*backpropagation*)

(LE et al., 2019; HAYKIN, 2007; SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016). A etapa de *back-propagation*, consiste no treinamento realizado dentro da rede MLP, consistindo em um método útil no tratamento de informações não-linearmente separáveis. Seu funcionamento consiste em duas fases distintas, a propagação (*foward*) e a retropropagação (*backpropagation*). Diferente da fase *foward* a fase do *backpropagation* acontece a atualização dos pesos sinápticos dos neurônios (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2016). Então, o erro atual é propagado de volta para uma camada anterior, calculando a função de perda. Com isso, os gradientes tendem a se tornar menores à medida que o cálculo é estabelecido a cada neurônio, retrocedendo na rede. Assim, os neurônios nas camadas anteriores aprendem de forma muito lentamente e o processo de treinamento leva muito mais tempo enquanto a precisão do modelo diminui. Sendo um problema crítico desse tipo de algoritmo (LE et al., 2019).

2.7.4 Memória Longa a Curto Prazo (*Long Short Term Memory - LSTM*)

As redes neurais recorrentes possuem vantagens em relação à rede MLP, por ser mais fácil de ser implementada, tendo menos camadas intermediárias e menos interações. Além disso, uma MLP limita-se a vetores de entrada para gerar vetores de saída, enquanto as redes recorrentes são capazes de usar toda a história de entradas passadas para fazer o mapeamento de saída (LE et al., 2019; Greff et al., 2017). Uma rede recorrente “inteligente” é a rede neural *Long Short-Term Memory - LSTM*, onde pode se lembrar de um valor por um período eventual de tempo, sendo capaz de aprender a partir de experiências passadas, usando como entrada dados sequenciais com diferentes comprimentos, para tarefas como classificação e previsão de séries temporais (LE et al., 2019; SAK; SENIOR; BEAUFAYS, 2014).

A LSTM foi implementada por Hochreiter e Schmidhuber (HOCHREITER; SCHMIDHUBER, 1997a) e surgiu como um modelo eficaz e escalonável para tratar vários problemas de aprendizagem relacionados a dados sequenciais. Processando, assim, não apenas pontos de dados únicos, como uma imagem, mas também sequências inteiras de dados, como sinais de voz e vídeos. Essa rede neural, é eficaz na captura de dependências temporais de longo prazo, e têm sido usadas para solucionar problemas difíceis como reconhecimento e geração de caligrafia, modelagem de linguagem e tradução, modelagem acústica da fala, síntese de fala, predição de estrutura secundária de proteína, análise de áudio e dados de vídeo, controle de robô (LE et al., 2019; Greff et al., 2017).

A arquitetura da rede LSTM é organizada em estrutura de cadeia, com o módulo de repetição de estrutura diferente. Em vez de uma única rede neural como as redes padrão, a LSTM possui quatro camadas de interação com um método exclusivo de comunicação (Greff et al., 2017). Geralmente, a rede LSTM básica é composta de blocos de memória chamados células. Uma célula de memória tem a função central da rede, que pode manter

seu estado ao longo do tempo, além disso, as unidades de portas não lineares regulam o fluxo de informações para dentro e para fora da célula (LE et al., 2019; HOCHREITER; SCHMIDHUBER, 1997b). As células de memória compartilham a mesma porta de entrada e saída, formando uma estrutura chamada bloco de células de memória. Na Figura 8 está apresentada a arquitetura básica da rede LSTM.

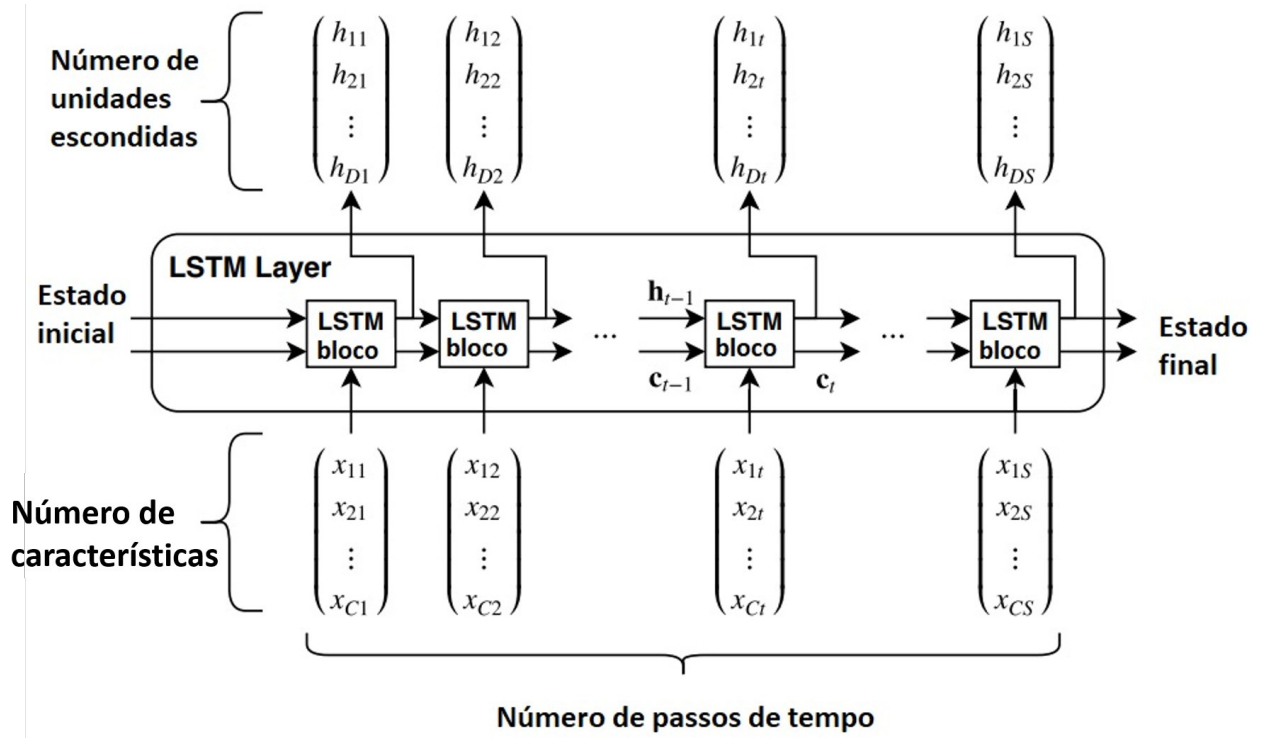


Figura 8 – Arquitetura básica da rede neural recorrente LSTM. A LSTM possui uma estrutura em cadeia, contendo quatro redes neurais e diferentes blocos de memória chamados células. Os dados são inseridos na rede (número de características), processados pelos blocos internos e a informação é retida pelas células, e as manipulações de memória são feitas pelos portões de saída. (MATHWORKS, 2020).

A Figura 8 ilustra o fluxo de uma série temporal x com o número de características igual a C de comprimento S através de uma camada LSTM. No diagrama, h_t e c_t denotam a saída, conhecida como estado oculto de tamanho D e o estado da célula na etapa de tempo t , respectivamente.

Na célula, dois estados podem ser transferidos: o estado célula e o estado oculto. Sendo que o estado célula é responsável pelo fluxo de dados, avançando os dados para frente sem ocorrência de alteração, mas algumas alterações como adicionar ou remover dados do estado célula, podem acontecer por meio de portas sigmóides. Uma porta pode ser entendida como uma camada ou série de operações de matriz, que contém diferentes pesos individuais. Esses tipos de redes neurais são arquitetadas para evitar dependência de longo prazo porque usa portas para controlar o processo de memorização (LE et al.,

2019). Na Figura 9 está apresentada o fluxo de dados na etapa de tempo t . O diagrama destaca como as portas esquecidas atualizam e geram a célula e os estados ocultos.

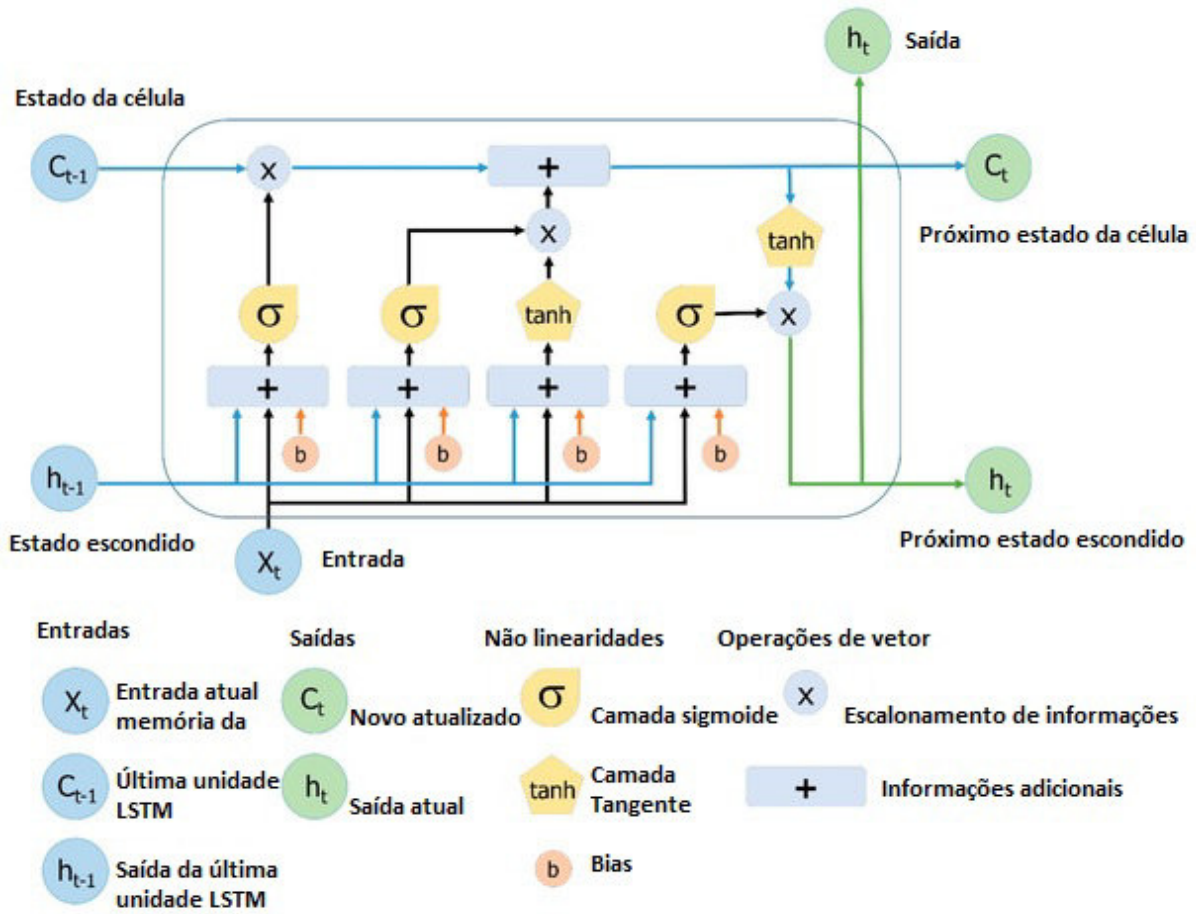


Figura 9 – Arquitetura de uma célula de memória da rede LSTM. A célula recebe duas entradas, a saída do último estado oculto e o estado da célula, observada no tempo t . O estado da célula é responsável pelo fluxo de dados, que podem decidir se segue com o fluxo de dados sem ocorrência de alteração ou não, estabelecida pelas portas sigmoide, que decide quais dados serão permanecidos dentro da célula e enviados para a próxima célula. (LE et al., 2019).

Na primeira fase da rede LSTM é identificada as informações que não são necessárias e serão omitidas na célula, estabelecida pela função sigmoide, que leva a saída da última unidade LSTM (h_{t-1}) no tempo $t - 1$ e a entrada atual (x_t) no tempo t . Além disso, a função sigmoide determina qual parte da saída antiga deve ser eliminada, denominado de portão de esquecimento (ou f_t), representado pela Equação 2.3.

$$f_t = \sigma(W_f[h_{t-1}, x_t] + b_f) \quad (2.3)$$

sendo f_t é um vetor com valores que variam de 0 a 1, correspondendo, a cada número no

estado da célula, C_{t-1} . Sendo σ é a função sigmoide, e W_f e b_f são as matrizes de peso e bias, respectivamente, da porta de esquecimento.

Em seguida, no estado da célula, é decidido e armazenado as informações da nova entrada (X_t), além de atualizar o estado da célula, ocorrendo em duas partes: a camada sigmoide e a camada tangente hiperbólica ($\tanh$), representadas respectivamente pelas Equações 2.4 e 2.5. A camada sigmoide, primeiramente, decide se a nova informação deve ser atualizada ou ignorada (0 ou 1) e, depois, a tangente hiperbólica ($\tanh$) dá peso aos valores que passaram, decidindo seu nível de importância (-1 a 1). Em seguida, o novo estado da célula é atualizado pelos dois valores são multiplicados (LE et al., 2019). Com isso, a nova memória é adicionada à memória antiga C_{t-1} resultando em C_t , representada pela Equação 2.6.

$$i_t = \sigma (W_i [h_{t-1}, X_t] + b_i), \quad (2.4)$$

$$N_t = \tanh (W_n [h_{t-1}, X_t] + b_n), \quad (2.5)$$

$$C_t = C_{t-1}f_t + N_t i_t \quad (2.6)$$

sendo i_t valores 0 ou 1, N_t valores entre -1 a 1 e C_{t-1} e C_t são os estados da célula no tempo $t - 1$ e t , enquanto W e b são as matrizes de peso e bias, respectivamente, do estado da célula.

Por fim, os valores de saída (h_t) são baseados no estado da célula de saída (O_t). Primeiramente, a sigmoide escolhe quais partes do estado da célula chegam à saída (Equação 2.7). Em seguida, a saída da porta sigmoide (O_t) é multiplicada pelos novos valores criados pela camada da tangente hiperbólica ($\tanh$) do estado da célula (C_t) (LE et al., 2019), com um valor variando entre -1 e 1, representado pela Equações 2.8.

$$O_t = \sigma (W_o [h_{t-1}, X_t] + b_o), \quad (2.7)$$

e

$$h_t = O_t \tanh (C_t) \quad (2.8)$$

sendo W_o a matrizes de peso e b_o o bias, da porta de saída.

Desde a primeira LSTM implementada, muitas outras variantes modernas foram incorporadas, criando melhorias feitas na arquitetura original para solucionar diversos problemas de aprendizagem (Greff et al., 2017). Este tipo de rede neural recorrente foi usada nessa tese para automatizar, totalmente, a avaliação do condicionamento dos *zebrafish*, dessa forma, o uso da rede neural serviu para evitar interferências humanas nos experimentos.

2.7.5 Redes Neurais Convolucionais (*Convolutional Neural Network* - CNN)

As Redes Neurais Convolucionais (CNNs) são uma classe de Rede Neural Artificial Profunda, com o avanço na visão computacional e as CNNs são amplamente utilizadas em muitas aplicações, como classificação de células cancerígenas, aplicação de processamento de imagens, incluindo detecção e identificação de objetos, classificação de cluster, carros autônomos e reconhecimento de matrícula (SCHMIDHUBER, 2015). A principal diferença entre uma rede clássica e uma rede de aprendizado profundo é o número de camadas intermediárias e a quantidade de conexões entre as mesmas. Na Figura 10 está a representação da diferença entre as redes neurais simples e as redes neurais de aprendizado profundo.

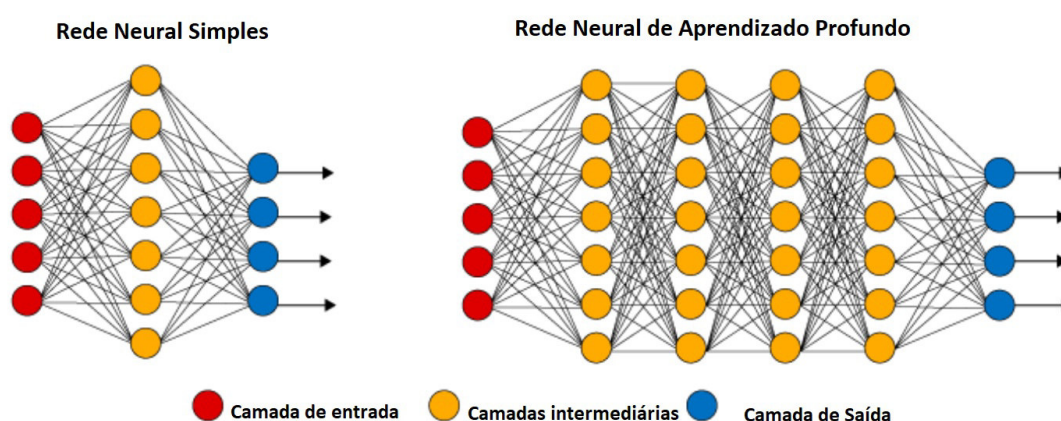


Figura 10 – Exemplo de arquiteturas das redes neurais simples e redes de aprendizado profundo (BOOK, 2020)

As CNNs podem ser semelhantes as demais redes neurais, no aspecto do avanço de alimentação, organizando seus neurônios em camadas, com a saída de cada camada sendo alimentada na próxima camada para processamento adicional; aprendem via propagação traseira, usando uma Função de Perda para calcular a margem de erro entre a saída real e a saída desejada, a fim de atualizar os pesos. Porém, apenas nas CNNs que são extraídos as características através de filtros convolucionais (IVARS, 2017; MURUGAN, 2017).

No processo de execução de uma CNN, durante a entrada de uma imagem, a cada região é atribuído um neurônio e a nessa conexão é atribuído um peso, onde diferenciam um do outro. Os pesos de cada conexão dos neurônios com suas entradas produzem uma saída que é passada para a próxima camada. Dessa forma, uma CNN possui várias camadas com conjuntos de neurônios que realizam funções distintas, responsável por aplicar um filtro em uma região específica da imagem. Cada peso atribuído às conexões de um neurônio é uma matriz que representa o filtro de uma convolução de imagens, chamado de *kernel* (PENHA; CASTRO, 2017).

A CNN reduz as imagens, usando filtros convolucionais, para facilitar o processamento, sem perder as características, que são importantes para obter uma boa previsão. A

arquitetura padrão da CNN tem uma estrutura contendo uma camada de entrada, camadas convolucionais alternadas, camadas de *pooling* e camadas não lineares. Essa última camada consiste em um pequeno número de camadas totalmente conectadas, tendo na camada final um classificador, normalmente, chamado de *softmax* (MURUGAN, 2017; IVARS, 2017; SINGH; SAIN, 2018).

Na Figura 11 está representada a arquitetura básica de uma CNN. A camada de entrada é normalmente uma matriz multidimensional de dados, que são alimentados pela rede. Dessa forma, os dados de entrada podem ser *pixels* de imagem ou sua transformação, padrões, séries temporais ou sinais de vídeo (MURUGAN, 2017).

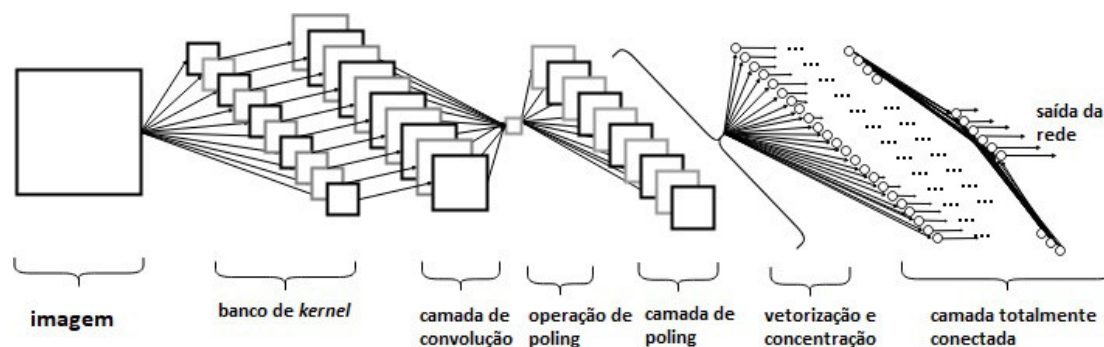


Figura 11 – Arquitetura básica de uma CNN. A rede convolucional é formada por diversas camadas convolucionais, que aplica uma função matemática de convolução nos dados de entrada e depois realizar o agrupamento (pooling). Em seguida os dados são vetorizados e são enviados até chegar na última camada conhecida como camada Densa e totalmente conectada. (MURUGAN, 2017)

As camadas convolucionais são os principais blocos da CNN, pois são nessas camadas que são extraídas as características distintas da entrada. Normalmente, essas camadas são compostas por uma série de filtros ou *kernels* que servem para extrair características locais da entrada. Assim, cada *kernel* é usado para calcular um mapa de características ou mapa de *kernel*. Dessa forma, a primeira camada convolucional extrai características significativas de baixo nível, como bordas, cantos, texturas e linhas. A segunda camada convolucional extrai características de nível superior na primeira camada, mas a última camada de convolução é responsável por extrair as características de nível mais alto (IVARS, 2017; FERREIRA; GIRALDI, 2017).

As camadas não lineares ou estágio de detector são usadas para detectar as ativações lineares usando uma função de ativação não linear, assim, a não linearidade que permite o melhor aprendizado de modelos mais complexos. Existem várias funções de ativação não lineares, as mais conhecidas podem ser a função tangente hiperbólica, a sigmoide e a Unidade Linear Retificada. Essa última, torna o treinamento várias vezes mais rápido do que a demais e, por isso, é a mais usada (MURUGAN, 2017; IVARS, 2017).

As camadas de *pooling* são executadas após a ativação não linear, onde as camadas de *pooling* fazem a redução da resolução diminuindo as características e evitando o *overfitting*. Dessa forma, o aprendizado torna-se robusto a pequenas variações de características aprendidas anteriormente, garantindo que a rede se concentre nos padrões mais importantes. Após essa camada, os *pixels* das camadas agrupadas são estendidas para o vetor de coluna única, que serão vetorizados e concatenados em camadas densas, conhecidas como camadas totalmente conectadas para a classificação (IVARS, 2017; FERREIRA; GIRALDI, 2017).

As camadas totalmente conectadas são consideradas uma rede multicamada genérica. A partir dessas camadas, é possível extrair características para treinar outro classificador, que por sua vez, usam funções de ativações de perda como *softmax*, entropia cruzada, sigmoide ou perda (IVARS, 2017).

2.7.5.1 Rede convolucional YOLOv2 - “You Only Look Once”

A rede convolucional YOLO (acrônimo da língua inglesa para “*You Only Look Once*”), consiste numa única rede convolucional que prediz tanto as caixas de detecção, quanto as probabilidades dos objetos das caixas pertencerem a uma classe (REDMON et al., 2016a). Para isso, ela utiliza pesos pré-treinados, ocasionando uma maior rapidez e eficiência computacional ao analisar uma imagem de teste. A arquitetura da YOLO permite treinamento de extremo reforço e velocidades em tempo real, mantendo a precisão média alta, em relação as demais redes convolucionais (REDMON; FARHADI, 2017).

A rede convolucional YOLOv2 é a segunda versão da YOLO (REDMON et al., 2016b), essa rede é capaz de fazer detecções de objetos com desempenho superior aos métodos de detecções convencionais. A rede YOLOv2 é executada em diferentes tamanhos, combinando várias técnicas e treinamento em várias escalas (REDMON; FARHADI, 2017; LIU et al., 2018). Para o funcionamento do algoritmo da YOLOv2, a imagem é dividida em $M \times N$ grades que detectará um objeto que se encontra no centro da grade, fazendo com que as caixas delimitadoras candidatas tenham a mesma densidade do eixo X e Y. A Figura 12 apresenta o processo de detecção de objetos em uma imagem, usando YOLOv2.

Cada grade, contém caixas delimitadoras iniciais com parâmetros diferentes e índice de confiança a partir de uma convolução. Esse índice é a probabilidade do objeto cair na caixa delimitada. Após isso, a YOLOv2 tenta eliminar ao máximo as caixas que não correspondem a classe do objeto, isso reduzirá a dificuldade de aprendizagem da rede (DING et al., 2019; REDMON; FARHADI, 2017). Depois da saída da rede, um processo de montagem das grades é estabelecido para a formação da imagem completa, usando sobreposição de bordas das imagens. Nesse processo, pode haver objetos localizados nas bordas da imagem e, conseqüentemente, a detecção do mapa poderá ser duplicada. Para solucionar essa duplicação, utiliza-se o método da mínima interseção, calculados pela

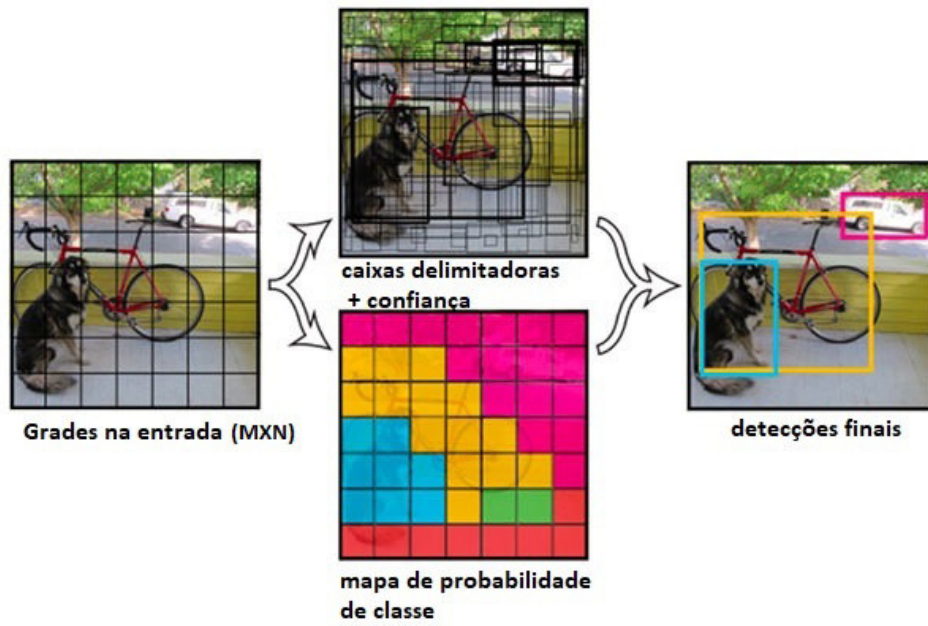


Figura 12 – Etapas do processo de detecção de objetos em uma imagem, usando YOLOv2. Uma imagem em grade cortada $M \times N$, e para cada célula, destaca várias caixas delimitadoras atribuindo um valor de confiança e a probabilidade do objeto ser de uma determinada classe, que será a detecção final do objeto dentro da caixa mais correspondente. (REDMON et al., 2016a).

Equação 2.9.

$$Min = \frac{area(A \cap B)}{\min(area(A), area(B))} \quad (2.9)$$

sendo A e B representam as caixas delimitadoras da detecção do objeto. O resultado é um valor de *score* definido que passará por um limiar de decisão.

A rede YOLOv2 possui várias camadas como a convolução, a *Max Pooling*, a *Relu*, a *Batch Normalization* e a *Anchor boxes*. Na camada de convolução, é iniciado a extração das características da imagem enquanto as camadas totalmente conectadas possuem a capacidade de prever as probabilidades e as coordenadas de saída, assim, o algoritmo de retropropagação treina os pesos de núcleo de convolução, compartilhada por toda imagem com os mesmos parâmetros. A *Relu* é uma camada que usa uma função de ativação para restringir a saída da rede de forma não linear da função de decisão e da rede geral, além de aumentar a velocidade do treinamento da rede. A camada *Max Pooling*, serve para discretização da imagem, realizando amostragem não lineares na imagem de entrada, dividindo em conjuntos de regiões não sobrepostas. A camada *Batch Normalization* serve para aumentar as melhorias na convergência, sem necessidade de outros métodos de melhorias (LIU et al., 2018). Por fim, a camada *Anchor boxes* serve para prever as coordenadas das caixas delimitadoras. Essa rede neural foi usada nessa tese para detectar os peixes nas imagens e, em seguida, rastreá-los no tanque.

3 METODOLOGIA PROPOSTA

3.1 Animais e Declarações Éticas

Zebrafish adultos, *Danio rerio*, de ambos os sexos (n=32), foram obtidos de uma loja de animais locais (Terrazoo, São Luís-MA, Brasil), alojados em dois grupos com 16 peixes em cada tanque para os testes de aprendizagem condicionada (dois estímulos: *vibracall* e luz vermelha), sendo usados também como grupo controle, filmados antes de qualquer estímulo acionado. Os grupos de peixes foram alojados em tanques de vidros opacos de 22,5L (220 mm x 200 mm x 550 mm) com água aerada e filtrada. Os peixes foram mantidos em sistema fechado de água gaseificada e filtrada durante duas semanas para aclimatização no ambiente, antes de os treinamentos serem estabelecidos. A qualidade da água foi monitorada semanalmente, mantendo a temperatura em $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH $7,2 \pm 0,3$, amônia $0,00 \pm 0,01$ ppm, nitrito $0,00 \pm 0,01$ e nitrato ≈ 40 ppm, com filtração biológica, mecânica e química. A troca da água (40%) era feita a cada 10 dias para garantir a qualidade, usando 5 ml para cada 38 L de *MICROBE - LIFT/XTreme* para condicionamento da água, *MICROBE - LIFT/Bio-Active Booster* para a nitrificação da água e controle de pH, *MICROBE - LIFT/Special Blend* para estabilizar o ciclo biológico de água e as condições naturais, *MICROBE - LIFT/Nite-out II* que contém bactérias nitrificantes vivas para eliminar os efeitos tóxicos de amônia e nitrito no aquário doce ou marinho, e em caso de acidez na água, foi usado aproximadamente 100 ppm para 38 L de *LABCON/Acid* para corrigir o PH da água. A iluminação foi ajustada em um ciclo de 12/12 luz/escurecimento. E, os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia com ração comercial de flocos triturados (38% de proteína, 4% de lipídios, Nutricom Pet) composta de peixes e subprodutos de peixes, cereais, extratos de proteínas vegetais, moluscos e crustáceos (farinha de *krill min.* 1%, farinha de lula min. 1%), carnes e subprodutos animais, subprodutos de origem vegetal, algas (*Spirulina platensis* min. 0,5%), leveduras (incluindo Beta-1,3/1,6-Glucan 1000 mg/kg), óleos e gorduras, substâncias minerais. Contendo: vitaminas, pró-vitaminas, lecitina, corantes e antioxidantes. No período de manutenção ou aclimação dos peixes no tanque (duas semanas antes de qualquer experimento), os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, *ad libitum*, mas durante o treinamento condicionado a alimentação foi restrita ($\approx 2\text{g}$ a cada treinamento).

Todos os procedimentos experimentais com animais seguiram as diretrizes ARRIVE (SERT et al., 2020) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), campus de São Luís - MA, Brasil (Protocolo nº 23115.006194/2018-01 e Protocolo nº 23115.024712/2020-96). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes do comitê de ética.

3.2 Sala Experimental

Os peixes foram mantidos em uma sala experimental, situada no prédio de Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – CCET, localizada no bloco 6, sob a responsabilidade do laboratório de Processamento da Informação Biológica, Departamento de Engenharia Elétrica da UFMA, São Luís, MA. Essa sala experimental possui 5 m x 2 m (comprimento x largura), climatizada e equipada com duas mesas, um computador, duas cadeiras, um termômetro digital, um medidor de pH, quatro aquários, produtos para preparação da água e produtos para alimentação dos peixes. Um controle diário foi feito para a climatização do ambiente e da água dos aquários, para manter a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Os peixes foram mantidos sob um ciclo de 12/12 luz/escuro (controle programado da luz ambiente).

3.3 Tarefa Experimental

Verificou-se a decodificação comportamental de um grupo de *zebrafish* poderia ser transmitida diretamente para outro grupo de *zebrafish*, controlando o comportamento dos peixes que receberiam a informação. Assim, os peixes “receptores” da informação poderiam aprender comportamentos semelhantes aos dos peixes “emissores”, guiados apenas pelas informações transmitidas ao tanque. Além disso, analisou-se a informação transmitida de um grupo de peixes para outro grupo, de forma desavisada, verificando se poderia ser respondida pelos peixes receptores com a mesma intensidade dos peixes emissores da informação. Para isto, foram conduzidos experiências comportamentais condicionadas de um grupo de *zebrafish* (emissor), em uma série de tentativas consecutivas e, transmitindo informações comportamentais diretamente para outro grupo de *zebrafish* não estimulado (receptor).

Nesse experimento, um grupo de *zebrafish*, denominado de “emissor” foi condicionado com dois estímulos: um *vibracall* e uma luz de LED vermelha. O LED estava localizado no fundo do aquário, situado ao lado direito, já o *vibracall* estava localizado no lado esquerdo do aquário, posicionado na área externa e no fundo do aquário (veja Figura 15). Cada estímulo correspondia um lado do despejo da comida no alimentador, e os peixes precisariam saber qual estímulo era associado ao lado correto da alimentação naquele instante de tempo. Assim, dois alimentadores automáticos foram ajustados para sincronizar a alimentação com o estímulo correspondente.

O treinamento foi estabelecido em períodos alternados para que os peixes não aprendessem a sequência dos estímulos. Os peixes que conseguissem permanecer próximo ao compartimento delimitado em período hábil, estavam respondendo aos estímulos naquele instante. Dessa forma, o *zebrafish* era considerado condicionado com sucesso quando foi direcionado à arena alimentar durante a fase luminosa ou sonora que antecedia a alimentação. E, todos os experimentos foram estabelecidos no mesmo horário (8h, 11h,

14h e 17h), automaticamente, pelo sistema de condicionamento, a fim de evitar quaisquer efeitos diurnos. Os peixes considerados condicionados foram apenas aqueles que estavam em uma área com dimensão 25 cm x 22,5 cm correspondente ao estímulo.

A avaliação comportamental dos peixes nesse treinamento foi analisada por um minuto de gravação de vídeo a cada tentativa, divididos em quatro períodos observatórios: 20 segundos antes de o estímulo luminoso, 5 segundos durante o estímulo luminoso, 10 segundos durante a alimentação e 25 segundos após o estímulo desligado.

Quando mais de 60% dos peixes “emissores” conseguiram direcionar-se para o lado correto durante o treinamento, foi considerado tentativa condicionada. Logo, foi construído um modelo de ensaio do padrão de comportamento para avaliação dos testes seguintes. E, em seguida, as sessões de transferência de informação foram iniciadas para o grupo de peixes “receptor”. Após o envio da informação, se o grupo de peixes “receptor” desloca-se para a direção correta do estímulo apresentado (5 segundos), superando a média do teste padrão, e se a rede neural classificasse o comportamento como condicionado, ambos os grupos de peixes receberiam uma recompensa alimentar. E, assim, uma transferência de informação entre aquários seria bem-sucedida.

3.4 Sistema de Transferência da Informação Aquário-Aquário

O sistema de transferência de informação comportamental é baseado em *hardware* e *software*, a fim de gerenciar o fluxo das informações do trabalho experimental nos grupos de peixes. A transmissão da informação aquário-computador e computador-aquário foi realizada usando tecnologias de inteligência artificial baseadas em redes neurais artificiais para controlar a informação transmitida.

A Figura 14 descreve o fluxo do sistema proposto para transferência da informação entre grupos de *zebrafish*, incluindo a avaliação do comportamento dos peixes. O sistema possui vários estágios importantes que serão abordados a seguir.

No primeiro estágio, uma rotina de treinamento para o condicionamento de *zebrafish* é acionada no tanque “emissor”, descrita anteriormente. Nesse condicionamento, os peixes do tanque “emissor” receberam dois estímulos: luz vermelha e vibração no tanque. Sendo que a luz vermelha correspondia ao lado direito do aquário e a vibração correspondia ao lado esquerdo do aquário. Os peixes precisariam entender o estímulo recebido e, em seguida, posicionar-se ao lado correspondente do tanque à espera de recompensa. Enquanto isso, os vídeos foram capturados e processados para obter a identificação e a localização de cada peixe no tanque.

À medida que os vídeos foram processados, uma base de dados de treinamento da rede neural foi montada, conforme a aprendizagem do grupo de peixes “emissor” durante

o processo de condicionamento. Uma combinação de redes neurais convolucionais e LSTM (CNNLSTM) foi configurada e treinada com vídeos do padrão de comportamento do teste modelo (Figura13). Esta rede neural serviu como avaliador automático do comportamento dos peixes e parâmetro para entrega da alimentação, evitando que um humano precisasse verificar os vídeos manualmente do experimento. A rede neural foi submetida a classificação do condicionamento dos peixes em três classes: nado livre, nado condicionado com luz e nado condicionado com *vibracall*. Se os peixes movimentassem em direção ao local correto, naquele instante de tempo estabelecido, a rede neural classificava o comportamento em duas classes (condicionado vibração ou visual), caso contrário, se os peixes estivessem nadando desorientados e sem padrão de movimento condicionado, seriam classificados como não condicionados (nado livre). Essa rede neural, também serviu para avaliar a similaridade do comportamento do grupo de peixes “receptor” com o grupo de peixes “emissor”, servindo como um dos parâmetros para liberar recompensa alimentar.

Na sequência, um método de detecção e rastreamento de peixes foi implementado usando redes YOLOv2 e filtro de *Kalman*, dessa forma, a posição espacial de cada peixe (x, y) no aquário “emissor” foi extraída de cada quadro, durante todo percurso de treinamento do condicionamento. Em seguida, uma informação é gerada a partir do comportamento dos peixes durante o condicionamento no tanque “emissor” para ser transferida aos peixes no tanque “receptor”. A partir do rastreamento do grupo de peixes “emissor”, durante o estímulo acionado, uma matriz de quantidade de peixes condicionados foi registrada comparando com o teste modelo (previamente construído com a média da quantidade de peixes condicionados). A diferença entre o número de peixes em um determinado ensaio e o teste modelo é usada para calcular o *Z-score*. O *Z-score* foi então convertido, através de uma função ativação sigmoide. A saída da função sigmoide permite informar a quantidade de informação a ser transmitida, transformada em intensidades dos estímulos acionados no aquário “receptor” (baixa, média e alta). Assim, o padrão de intensidade variava a cada atividade de condicionamento estabelecido no tanque “emissor”.

No próximo estágio, a transmissão da informação foi baseada em estímulos controlados pelo tanque “emissor” e enviada ao tanque “receptor”. Assim, o grupo de peixes “receptor” teria que entender o estímulo e, posicionar-se ao lado correto do tanque para receber a recompensa alimentar. Os vídeos dessa atividade foram processados e comparados com o padrão de comportamento do tanque “emissor”, via teste na rede neural CNNLSTM. Além disso, uma série de restrições foram adaptadas ao sistema para avaliar o comportamento dos peixes (descritas na seção 3.4.1). Dessa forma, quando os peixes que foram classificados como condicionados (lado correto do estímulo acionado), e as demais restrições foram executadas, uma recompensa foi despejada no compartimento alimentar (suficiente para todos os peixes) e um *feedback* alimentar para o tanque “emissor” foi processado.

O *feedback* alimentar foi estabelecido a partir da classificação correta do comportamento dos peixes e o valor de *Z-score* for maior ou igual a 0,5, durante as tentativas. Neste caso, sendo feita a partir da detecção e rastreamento do grupo de peixes “receptor” direcionados ao compartimento correto. Assim, uma matriz de quantidade de peixes condicionados foi registrada e comparada com o teste modelo, anteriormente, estabelecido. O *Z-score* foi calculado e convertido através da função ativação sigmoide. A saída da função sigmoide e a classificação da rede neural CNNLSTM decidiram o acionamento do *feedback* alimentar como recompensa adicional pela transferência de informação bem-sucedida. Por fim, os comportamentos dos peixes de ambos os tanques foram avaliados e comparados.

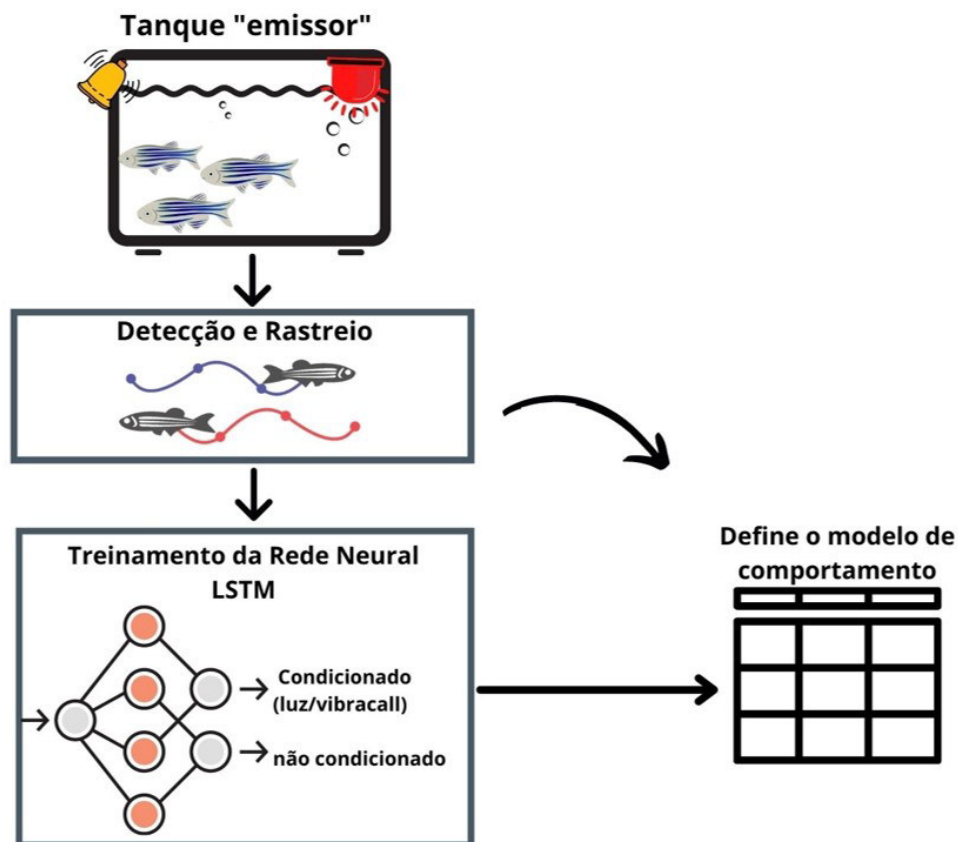


Figura 13 – Metodologia experimental proposta para definir o modelo de comportamento ideal para a transferência da informação entre grupos de *zebrafish*. Na tarefa inicial, os peixes precisavam identificar o estímulo acionado e posicionar-se ao lado correto do aquário para receber alimentação. Enquanto isso, os vídeos foram processados e uma detecção e rastreamento do comportamento dos peixes do grupo “emissor” foi estabelecida. Após a coleta de dados do comportamento condicionado, uma rede neural LSTM foi treinada para criar um teste modelo do comportamento dos peixes condicionados. Esse modelo foi usado para comparar o padrão de comportamento dos peixes durante as demais atividades. Essa rede neural serve como avaliador automático do comportamento, classificando em condicionados (luz ou vibração) e não condicionados, além disso, a rede serve como parâmetro para liberar recompensa.

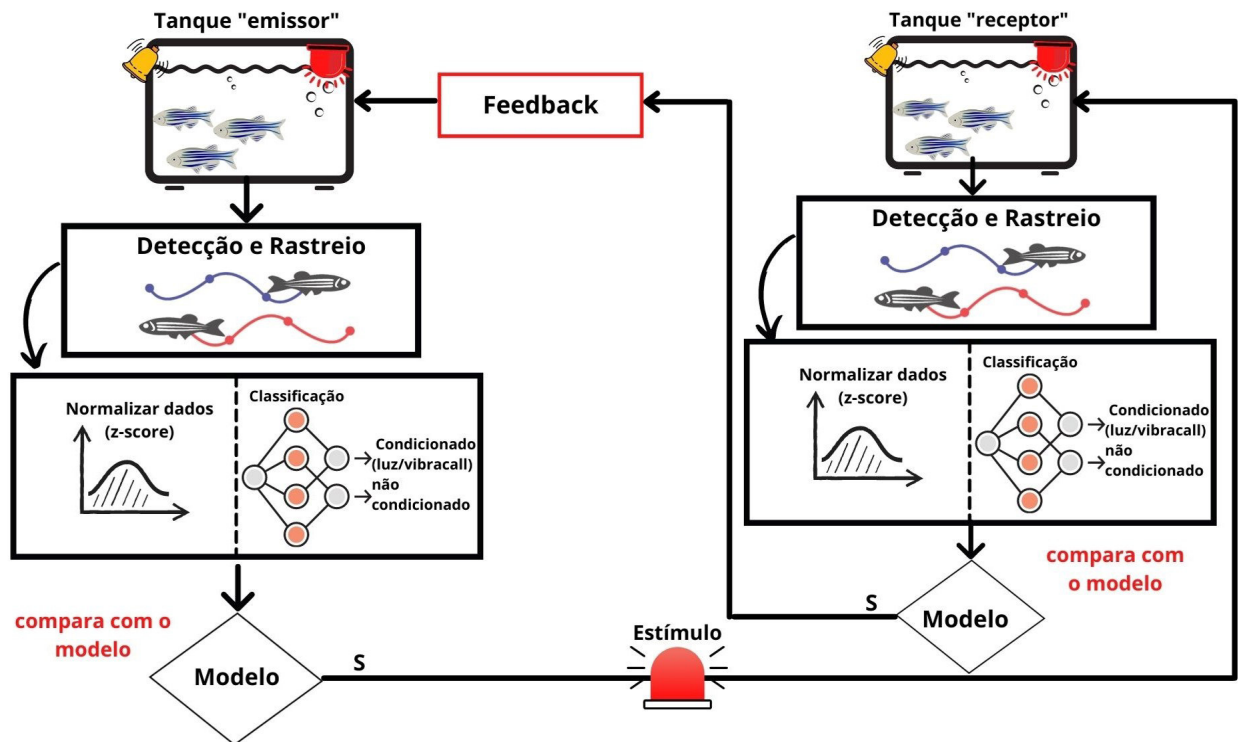


Figura 14 – Visão geral da metodologia experimental proposta para a transferência da informação entre grupos de *zebrafish*. Na tarefa inicial, os peixes precisavam identificar o estímulo acionado e posicionar-se ao lado correto do aquário para receber alimentação. Enquanto isso, os vídeos foram processados do comportamento dos peixes do grupo “emissor”. Em seguida, a detecção e rastreamento dos peixes foram capturados. A diferença entre a média de peixes e o teste modelo foi calculado pelo *Z-score* (normalizado), e em seguida, esses dados foram transformados em intensidade de estímulos (luz ou *vibracall*). A informação foi transmitida e os comportamentos dos peixes são comparados com o teste modelo e classificado pela rede neural. Além disso, a detecção e rastreamento dos peixes receptores, são usados para calcular o *Z-score* do grupo e, acionar a alimentação e *feedback* para o aquário “emissor”. Por fim, os comportamentos dos peixes de ambos os tanques foram avaliados e comparados

3.4.1 Definição das restrições para avaliação do comportamento

Para evitar qualquer viés comportamental, não esperado, durante o processo de condicionamento dos peixes, uma sequência de restrições foi estabelecida em diferentes condições. Os exemplos de vieses comportamentais que poderiam acontecer durante o treinamento, seriam: os peixes poderiam estar na área alimentar antes de o estímulo ser ligado; ou os peixes poderiam ter movimentos semelhantes ao padrão condicionado e a rede neural poderia classificar como um comportamento condicionado, porém, os peixes poderiam estar nadando em sentido contrário. Para validar as discussões anteriormente apontadas, a fim de avaliar o condicionamento do grupo de peixes “receptor”, foram definidas três estratégias experimentais contendo restrições distintas, descritas a seguir:

- Restrição Total: nessa restrição as duas condições deveriam ser verdadeiras. 1) Se o comportamento dos peixes do grupo “receptor” fosse classificado pela rede neural artificial como comportamento condicionado, correspondente ao estímulo enviado (luz ou vibração); e 2) se o valor do *Z-score*, que foia diferença da média de peixes pelos dados do teste modelo, fosse maior ou igual 0,5, o grupo de peixe receberia uma recompensa alimentar; caso contrário, nenhuma recompensa alimentar seria despejada.
- Restrição Parcial: nessa restrição uma das três condições deveria ser verdadeira. 1) Se o comportamento dos peixes do grupo “receptor” fosse classificado pela rede neural artificial como comportamento condicionado, correspondente ao estímulo enviado (luz ou vibração); ou 2) se o valor do *Z-score*, que foia diferença da média de peixes pelos dados do teste modelo, fosse maior ou igual 0,5; ou 3) se a frequência de peixes dos últimos 30 quadros do vídeo durante o estímulo acionado fosse maior que 8 peixes, o grupo de peixe receberia uma recompensa alimentar; caso contrário, nenhuma recompensa alimentar seria despejada.
- Sem Restrição: independente dos peixes se deslocarem ou não, para o compartimento alimentar correto, durante o estímulo ligado (5 segundos), a alimentação era despejada após ao período estimulado, na fase seguinte, no compartimento alimentar correspondente (lado esquerdo ou direito). E, assim, os peixes iam aprendendo o lado correto da alimentação durante o estímulo acionado a cada tentativa experimental.

3.5 Hardware

Um rack experimental foi projetado numa sala, possuindo dois tanques idênticos de vidros opacos de 22,5L (550 mm x 200 mm x 250 mm, largura x altura x profundidade), contendo dois grupos de peixes. Os aparatos dos tanques eram conectados por um computador para controle automático do treinamento, ambientação, oxigenação e alimentação dos peixes. Cada tanque era dividido em duas arenas: espaço da oxigenação (100 mm x 250 mm x 200 mm) e espaço de treinamento (450 x 200 x 250 mm). Furos de 8 mm foram criados na parede interna do tanque que separava os dois ambientes, para que a água oxigenada circulasse no ambiente de treinamento dos peixes sem formação de bolhas ou interferência na análise dos vídeos.

O controle automático dos tanques foi feito por componentes microcontrolados (Arduíno MEGA), controlando a oxigenação dos peixes, a luz ambiente, o estímulo luminoso e o alimentador, obedecendo ao cronograma de atividades do treinamento (quatro vezes ao dia). Alimentadores automáticos foram produzidos na impressora 3D, usando filamentos de *Acrilonitrila Butadieno Estireno* (ABS), sendo acoplados na parte externa e superior do tanque. O alimento era colocado no reservatório do alimentador e podia ser dispensado

por meio de um servomotor, que girava uma engrenagem na saída do alimentador para ter um controle uniforme da quantidade de ração moída (cerca de $\approx 2g$).

A divisão interna no tanque era ajustada de acordo com a atividade estabelecida naquele instante e com as experiências propostas. Assim, as divisórias de vidro (250 mm x 80 mm x 4 mm) eram adicionadas dentro do tanque, a fim de separar o espaço da alimentação, durante o condicionamento alimentar. Dois estímulos foram ajustados para o experimento, luz de LED na cor vermelha (espectro ≈ 663 nm) e *vibracall* foram colocados na área externa no aquário. A iluminação vermelha foi escolhida com base na sensibilidade do *zebrafish*, onde possuía maior preferência na cor vermelha do que as demais cores (AVDESH et al., 2012; SPENCE; SMITH, 2008; ROY et al., 2019).

Em experimentos que não consistiram em condicionamento alimentar, o tanque não possuía divisão e os peixes puderam nadar normalmente em todo o tanque. Além disso, uma única câmera foi montada aproximadamente a 40 centímetros acima de cada tanque para capturar os vídeos do treinamento proposto. Os vídeos foram gravados a 30 quadros por segundo com resolução de 1920x1080 *pixels* (câmera C920 Logitech). O foco da câmera foi definido manualmente, ajustando as dimensões do tanque (Figura 15).

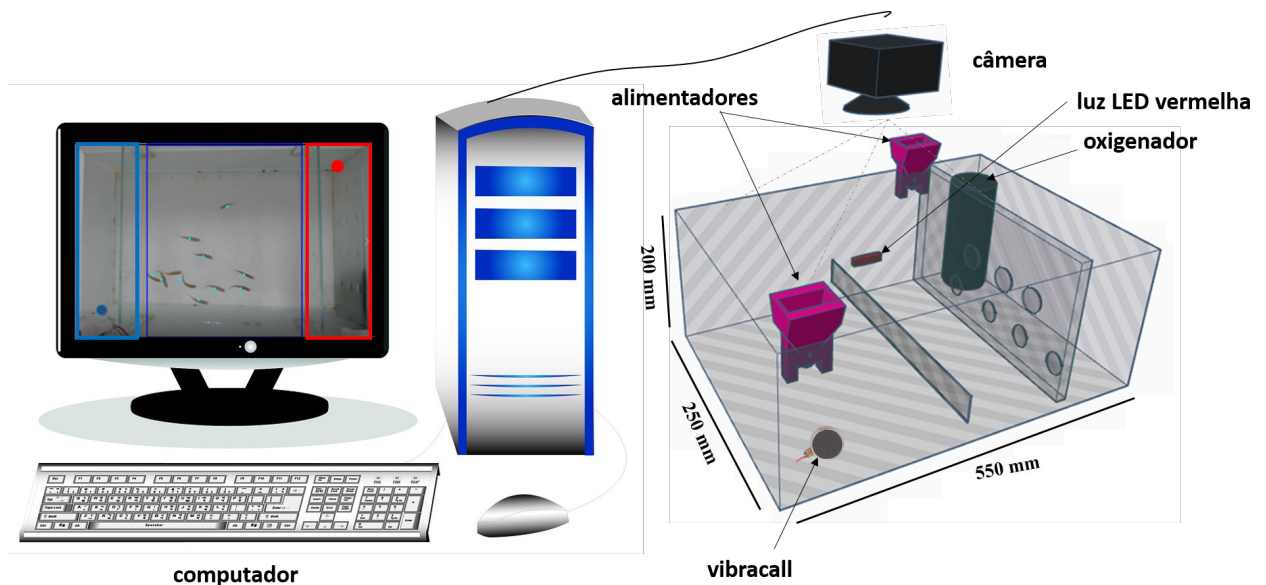


Figura 15 – Configuração experimental para a transferência da informação entre grupos distintos de *zebrafish*. Os grupos de *zebrafish* nadam em tanques separados, dividido em duas arenas de alimentação. Uma fita de LED (cor vermelha) e um *vibracall* foram acoplados na parede externa do tanque. Uma câmera está montada acima do tanque. Toda a avaliação da transmissão da informação foi enviada e avaliada por um sistema baseado em redes neurais artificiais.

Para o controle do *hardware*, foram produzidos *scripts* em Matlab e Python para o controle total do sistema de condicionamento automático. Esse mecanismo servia para distribuir alimentos, acender e apagar a luz ambiente, controlar a bomba de oxigênio e ativar os estímulos no horário definido dos experimentos. Todos os comandos pré-definidos eram

imediatamente transmitidos para o algoritmo na matriz do Arduíno, na qual controlaram os *hardwares* acoplados no aquário e na sala experimental.

Um cronograma virtual de atividades experimentais foi programado, a fim de organizar a rotina de treinamento dos peixes em horários pré-definidos. O cronograma de horários consistia em quatro períodos de treinamento: 08:00h, 11:00h, 14:00h e 17:00h. E, a oxigenação era mantida no tanque, mas desligada 10 minutos antes do início dos testes para que não houvesse fluxo de bolhas na água, sendo religada 10 minutos após os testes, seguindo um cronograma de atividades para treinamento, implementado automaticamente. Todos os experimentos foram estabelecidos no mesmo ambiente em que os peixes estavam mantidos.

3.6 Software

O algoritmo baseado em inteligência artificial para transmissão da informação consistiu em várias etapas: processamento de vídeos, avaliação e controle integrado usando redes neurais CNNLSTM, detecção e rastreamento dos peixes para modelagem da informação, controle da transferência da informação entre aquários e avaliação do comportamento condicionado entre os grupos de peixes “emissor” e “receptor”. Assim, um sistema foi configurado para sincronizar a aprendizagem dos peixes entre os tanques do treinamento, acoplando as estruturas físicas e monitorando a comunicação entre um tanque e outro, a fim de avaliar a resposta por reforço dos *zebrafish*.

3.6.1 Processamento dos vídeos

Os vídeos foram capturados por uma câmera em cada tanque durante o treinamento. Dois tipos de vídeos foram salvos automaticamente. O primeiro tipo de vídeo possuía 5 segundos, sendo 1 segundo antes do condicionamento e 4 segundos durante o estímulo acionado, antes da alimentação. O segundo tipo de vídeo era composto de 60 segundos e possuía o processo completo de treinamento nos períodos antes, durante e após o estímulo ser desligado. Dessa forma, o vídeo mais curto era usado no treinamento da rede neural CNNLSTM e na detecção dos peixes para envio da transferência de informação. O segundo vídeo era usado para conferência dos testes e análises do comportamento após o estímulo.

Os vídeos de 5 segundos que possuem 150 quadros no total, para serem usados pela rede neural CNNLSTM foram dimensionados para o tamanho de 160 *pixels* de altura e 160 *pixels* de comprimento, em seguida, reduziu-se o número de quadros para 76 por vídeo, de maneira mais uniformemente possível no tempo. Em seguida, foi realizada uma subtração entre as imagens, sendo formada uma nova imagem composta pela subtração da imagem do quadro seguinte com a imagem do quadro atual. Ao final, a quantidade de quadros foi reduzida para 75 quadros por vídeo.

3.6.2 Sistema de Avaliação e Controle Integrado

Após uma rotina de treinamento para o condicionamento do grupo de peixes “emissor”, uma base de dados para treinamento da rede neural CNNLSTM foi montada (Figura 16). Um total de 164 vídeos de 160×160 *pixel* com duração de 5 segundos (75 quadros) foram usados para treinar a rede neural e, também, usada para criar o modelo de teste do comportamento condicionado, referente aos peixes do grupo “emissor”. Desses, foram 110 vídeos de peixes não condicionados (nadando livremente), 32 vídeos de peixes condicionados com luz vermelha e 22 vídeos condicionados com vibração.

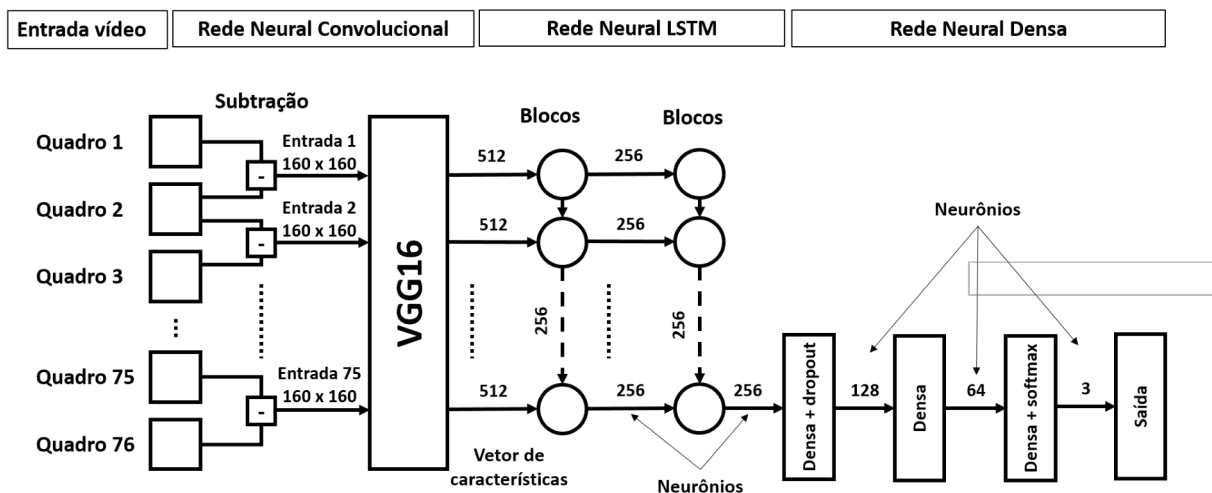


Figura 16 – Arquitetura de rede neural CNNLSTM. A rede neural inicia com a entrada de dados (quadros), em seguida, foi feita a subtração entre os canais para obter uma nova imagem com pixels relevantes. Essa nova imagem foi processada pela rede VGG16 para extração de características relevantes, após esse processo, a saída da rede foi vetorizada, servindo de entrada na rede LSTM. Em seguida, os dados de saída da rede LSTM foram enviados a um conjunto de camadas densas para a classificação do comportamento dos peixes em cada vídeo de 5 segundos.

A rede neural CNNLSTM foi composta por uma rede convolucional que extrai as características das imagens de vídeo e uma rede neural recorrente LSTM para extração de características temporais em relação a todos os quadros e uma rede densa para classificação dos vídeos. Esse modelo de rede neural foi implementado devido a sua característica de extrair informações de imagens relacionadas no tempo, importante em análise de vídeos. Então, a rede neural CNNLSTM foi usada para avaliação automática do condicionamento dos *zebrafish* em ambos os tanques (“receptor” e “emissor”).

Muitas arquiteturas de redes convolucionais foram desenvolvidas e treinadas em grandes conjuntos de dados para demonstrar sua eficiência. Algumas dessas arquiteturas estão disponíveis em plataformas e bibliotecas. Neste trabalho, foi usada a arquitetura de rede convolucional VGG-16 modificada (SIMONYAN; ZISSERMAN, 2014), por ser uma arquitetura simples, possuindo apenas blocos compostos por um número incremental

de camadas convolucionais com filtros de tamanho 3x3. Os blocos de *MaxPooling* foram intercalados entre os blocos convolucionais para reduzir o tamanho dos mapas de ativação obtidos. Nesse trabalho, foi usada apenas as camadas de extração de características das camadas convolucionais da VGG-16, retirando as camadas de classificação. Na saída da rede VGG-16 modificada foi adicionada uma camada Global MaxPool2D, que serve para transformar uma imagem de três canais de cores RGB (*Red, Green e Blue*) em um vetor de uma dimensão contendo os valores mais relevantes de cada canal. A Tabela 2 apresenta a configuração da arquitetura da rede convolucional para extração de características.

Tabela 2 – Arquitetura da rede convolucional VGG16 com os tamanhos de cada camada.

Camada		Tamanho
Entrada	Imagem	160x160x3
1	2x Convolução	160x160x64
	Max Pooling	80x80x64
3	2x Convolução	80x80x128
	Max Pooling	40x40x128
5	3x Convolução	40x40x256
	Max Pooling	20x20x256
8	3x Convolução	20x20x512
	Max Pooling	10x10x512
11	3x Convolução	10x10x512
	Global MaxPool 2d	512

Em seguida, foi adicionada duas camadas da rede neural recorrente LSTM contendo 256 neurônios na camada escondida em cada camada, sendo a primeira camada distribuída no tempo. Após a camada LSTM, foi adicionada três camadas densas, sendo a primeira camada densa possuindo 128 neurônios na camada escondida, *dropout* com o valor de 0,5 para evitar o *overfitting* e função de ativação Relu; a segunda camada densa possuía 64 neurônios na camada escondida e função de ativação Relu. A terceira camada densa, possuía 3 neurônios e função *Softmax* saída da rede para classificação do comportamento dos peixes (condicionados por luz, por vibração e não condicionados). A Tabela 3 apresenta as camadas das redes neurais profundas para extrair características e classificar o comportamento dos peixes.

A rede CNNLSTM foi treinada com dados da atividade condicionada no tanque “emissor”, em 50 épocas, usando otimizador Adam, taxa de aprendizagem 0,00001 e função de perda *categorical crossentropy*. Os dados foram divididos em 90% para treino e 10% para a validação da rede neural. E, assim, foi criado um modelo de aprendizado que serviu para avaliar as tentativas no treinamento, tanto para o grupo de peixes “emissor”, quando para o grupo de peixes “receptor”. Dessa forma, a semelhança na movimentação dos peixes em ambos os tanques foi comparada. Na Figura 16 está apresentada a arquitetura completa da rede CNNLSTM proposta.

Tabela 3 – Arquitetura da rede neural profunda baseada em redes neural LSTM e redes multicamadas densas.

	Camada	Tamanho saída
Entrada	VGG16 distribuída no tempo	75x512
1	LSTM	75x256
2	LSTM	256
3	Densa	128
	Dropout	-
4	Densa	64
5	Densa + Softmax	3

3.6.2.1 Algoritmo de detecção

Para quantificar a intensidade de informação transmitida entre os aquários, foi usada a detecção e o rastreamento dos peixes, durante uma atividade experimental. Para o algoritmo de detecção foi usada a rede YOLOv2. A arquitetura da rede YOLOv2 foi mostrada na Figura 17. Nesta arquitetura, existem 24 camadas, sete camadas de convolução, seis camadas de Relu, três camadas de *MaxPooling*, seis camadas de Batch Normalization e duas camadas de *Anchor*. A camada de entrada corresponde a entrada de rede, com o tamanho de imagem de $480 \times 480 \times 3$. As camadas convolucionais do YOLO diminuem a amostra por um fator de 32, obtendo as delimitações da região da cabeça do peixe, com o tamanho do filtro de convolução sendo um bloco de $3 \times 3 \times 1$. A camada MaxPooling tem o tamanho 2×2 , com etapa 2 e preenchimento 0. Todos os blocos principais têm uma camada de operação Relu. No final do bloco, possui duas camadas de caixas de *Anchor*: uma para transformação e uma para a saída. A primeira camada *Anchor* transforma a saída da rede convolucional bruta em um formato necessário para produzir detecções de objetos; e a segunda define os parâmetros da *Anchor*, implementando a função de perda utilizada para treinar o detector. Desta forma, a YOLOv2 será capaz de aumentar a precisão da detecção da região da cabeça do peixe na imagem.

Foi escolhido a cabeça do peixe nas imagens como objeto de detecção e reconhecimento da rede YOLOv2 nas imagens, por causa da baixa taxa de oclusão durante o nado dos peixes aglomerado. Para o treinamento da rede YOLOv2 foi usado um conjunto de imagens contendo 365 imagens referentes aos vídeos prévios dos peixes, onde a região da cabeça do peixe foi marcada manualmente em todas as imagens, sendo usadas para o aprendizado da rede YOLOv2 para a detecção dos peixes no tanque. Em seguida, a rede treinada foi usada para detectar os peixes durante a experiência comportamental. O protocolo de treinamento YOLOv2 foi baseado em ferramentas MATLAB para redes convolucionais, seguindo os parâmetros das camadas de convolução. O processo de treinamento foi realizado em 300 épocas, com taxa de aprendizagem de 0,001 e otimizador Gradiente Descendente Estocástico com *Momentum* (SGDM) para ajustar os pesos e aprender os rótulos de identificação de peixes, aprendendo pelo reconhecimento de padrões.

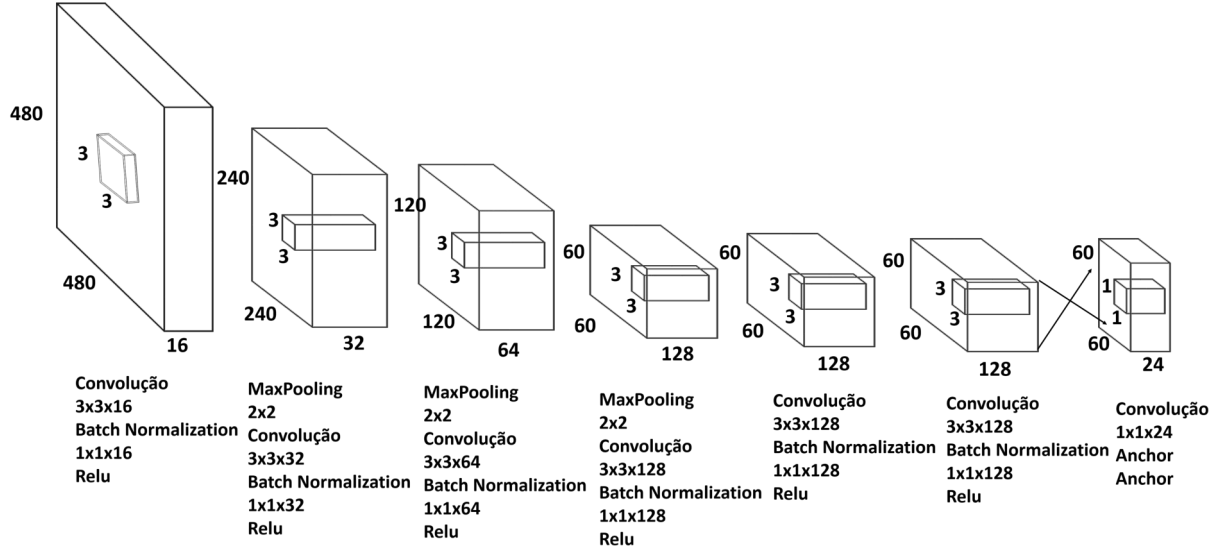


Figura 17 – Arquitetura da estrutura de rede YOLOv2 proposta. A imagem de entrada tem um tamanho de 480x480 e cada camada foi reduzida por filtros de atfoi60x60. Todas as combinações dos blocos de arquitetura de rede possuem uma camada de convolução, normalização em lote e Relu, com exceção da última camada que apresenta a saída por convolução e as caixas de ancoragem. Apenas três nas camadas iniciais têm o MaxPooling

Após a detecção das caixas delimitadoras da região da cabeça do peixe, foi calculado o centro da cabeça do peixe, ilustrado na Figura 18. Assim, a posição central da região determinada corresponde ao centroide da cabeça peixe em movimento. A partir da equação do momento dada pela Equação 3.1, foram calculados os momentos de ordem zero e de primeira ordem pela Equação 3.2((ZHAO; YAN; GAO, 2019)).

$$M_{pq} = \sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h i^p \times j^q \times R(i, j) \quad (3.1)$$

$$\begin{cases} M_{00} = \sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h R(i, j) \\ M_{10} = \sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h i \times R(i, j) \\ M_{01} = \sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h j \times R(i, j) \end{cases} \quad (3.2)$$

sendo M_{pq} representa o momento de ordem $(p + q)$; M_{00} representa o momento de ordem zero; M_{10} e M_{01} representam o momento de primeira ordem; e R foi uma imagem binária encontrada a partir da filtragem da imagem delimitada pela caixa delimitadora da saída da detecção da rede YOLOv2, que possui comprimento w e largura h em *pixels*.

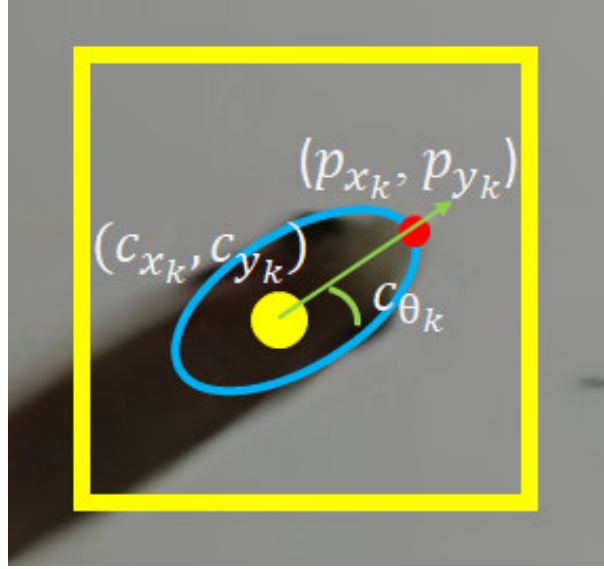


Figura 18 – A caixa delimitadora é representada pela moldura amarela. A posição do centroide (c_{x_k}, c_{y_k}) é representada pelo ponto amarelo. O fim da posição da cabeça (p_{x_k}, p_{y_k}) é representado pelo ponto vermelho. A direção do movimento do peixe é representada pela seta verde que tem um ângulo igual a c_{θ_k} .

As coordenadas da posição do centroide (c_{x_k}, c_{y_k}) da k -ésima cabeça de peixe detectada é mostrada na Equação 3.3,

$$\begin{cases} c_{x_k} = \frac{M_{10}}{M_{00}} \\ c_{y_k} = \frac{M_{01}}{M_{00}} \end{cases} \quad (3.3)$$

A direção do movimento do peixe está relacionada à elipse ajustada na cabeça do peixe. A direção do movimento é c_{θ_k} , com um intervalo de $[0, 2\pi]$. A Equação 3.4 é usada para encontrar o ângulo de orientação do movimento do peixe.

$$c_{\theta_k} = \begin{cases} \arctan \frac{p_{y_k} - c_{y_k}}{p_{x_k} - c_{x_k}}, & p_{x_k} > c_{x_k} \\ \arctan \frac{p_{y_k} - c_{y_k}}{p_{x_k} - c_{x_k}} + \pi, & p_{x_k} < c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} \geq c_{y_k} \\ \arctan \frac{p_{y_k} - c_{y_k}}{p_{x_k} - c_{x_k}} - \pi, & p_{x_k} < c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} < c_{y_k} \\ \frac{\pi}{2}, & p_{x_k} = c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} > c_{y_k} \\ -\frac{\pi}{2}, & p_{x_k} = c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} < c_{y_k} \end{cases} \quad (3.4)$$

sendo, p_{x_k} e p_{y_k} representam, respectivamente, a posição x e y do final da k -ésima cabeça do peixe detectada.

3.6.2.2 Algoritmo de rastreamento

Para estimar com precisão o movimento dos peixes no aquário, o filtro de *Kalman* foi usado para realizar a tarefa de rastreamento, e configurado para estimar as coordenadas do peixe na falha de detecção, durante os momentos de oclusões por outros peixes durante

o nado, sendo assim, o rastreo do peixe consegue ser mantido. Como o movimento do peixe foi considerado um movimento linear uniforme de um quadro para o outro, o sistema pode ser aproximado como um modelo dinâmico linear dado pela Equação 3.5 (WANG et al., 2016; QIAN; CHENG; CHEN, 2014),

$$\begin{aligned}
 c_{x_k,t} &= c_{x_k,t-1} + dt\dot{c}_{x_k,t-1} + \frac{dt^2}{2}\ddot{c}_{x_k,t-1} \\
 c_{y_k,t} &= c_{y_k,t-1} + dt\dot{c}_{y_k,t-1} + \frac{dt^2}{2}\ddot{c}_{y_k,t-1} \\
 c_{\theta_k,t} &= c_{\theta_k,t-1} + dt\dot{c}_{\theta_k,t-1} + \frac{dt^2}{2}\ddot{c}_{\theta_k,t-1} \\
 \dot{c}_{x_k,t} &= \dot{c}_{x_k,t-1} + dt\ddot{c}_{x_k,t-1} \\
 \dot{c}_{y_k,t} &= \dot{c}_{y_k,t-1} + dt\ddot{c}_{y_k,t-1} \\
 \dot{c}_{\theta_k,t} &= \dot{c}_{\theta_k,t-1} + dt\ddot{c}_{\theta_k,t-1}
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

sendo $c_{x_k,t}$, $c_{y_k,t}$, $c_{\theta_k,t}$ as coordenadas x , y e orientação respectivamente do centroide da k -ésima cabeça de peixe detectado no quadro t ; $\dot{c}_{x_k,t}$, $\dot{c}_{y_k,t}$, $\dot{c}_{\theta_k,t}$ as velocidades x , y e angular respectivamente do centroide da k -ésima cabeça de peixe detectado no quadro t ; $\ddot{c}_{x_k,t}$, $\ddot{c}_{y_k,t}$, $\ddot{c}_{\theta_k,t}$ as acelerações x , y e angular respectivamente do centroide da k -ésima cabeça de peixe detectado no quadro t e dt é o intervalo de tempo entre dois quadros

As configurações do algoritmo começam com o vetor de estado da localização e orientação do peixe. As coordenadas da k -ésima cabeça de peixe detectada no quadro t são indicadas como $(c_{x_k,t}, c_{y_k,t}, c_{\theta_k,t})$, portanto, o vetor de estado x_t é definido como $[c_{x_k,t}, c_{y_k,t}, c_{\theta_k,t}, \dot{c}_{x_k,t}, \dot{c}_{y_k,t}, \dot{c}_{\theta_k,t}]^T$. A equação de estado e observação no filtro *Kalman* podem ser descritos pela Equação 3.6:

$$\begin{cases} x_t = Fx_{t-1} + w_t \\ z_t = Hx_t + v_t \end{cases} \tag{3.6}$$

sendo F e H a transição de estado e a matriz de observação do alvo no tempo t , respectivamente, w_t e v_t , são o ruídos de transição de estado e o ruído de observação.

O filtro de *Kalman* se divide em duas fases dentro da iteração: a fase de predição e a fase de correção. Na primeira fase, atualiza as equações de tempo, prevendo o vetor de estado no momento t . A estimativa do vetor de estado $\hat{x}_t$ e sua covariância de erro $\hat{P}_t$ no momento t podem ser previstas pelas Equações 3.9 e 3.8 respectivamente:

$$\hat{x}_t = Fx_{t-1} \tag{3.7}$$

$$\hat{P}_t = F P_{t-1} F^T + Q \tag{3.8}$$

$$F = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & \Delta t & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & \Delta t & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & \Delta t \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

sendo Q é a matriz de covariância do ruído w_t , P_{t-1} é a matriz de covariância do erro em $t - 1$.

$$Q = \begin{bmatrix} 20.5 & 0 & 0 \\ 0 & 3.1 & 0 \\ 0 & 0 & 22.7 \end{bmatrix}$$

O segundo passo é a associação das posições preditas de cada cabeça de peixe pelo filtro de *Kalman* com o centroide calculado de cada peixe, a fim de formar uma trajetória contínua entre quadros. A associação de dados deve seguir o critério um-para-um, em que um rastreador deve está associado a no máximo a um centroide (c_{x_k}, c_{y_k}) da cabeça do peixe.

Quando a associação de dados termina o vetor de estado e a matriz de covariância de erros é atualizada pelas Equações 3.9 e 3.10.

$$x_t = \hat{x}_t + K_t(\hat{z}_t - HK_t) \quad (3.9)$$

$$\hat{P}_t = (I - K_t H) \hat{P}_t \quad (3.10)$$

sendo I a matriz identidade e K_t o ganho de *Kalman* no tempo t , calculado pela Equação 3.11,

$$K_t = \hat{P}_t H^T (H \hat{P}_t H^T + R)^{-1} \quad (3.11)$$

$$H = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (3.12)$$

sendo R a matriz de covariância do ruído de observação v_t .

$$R = \begin{bmatrix} 20.1 & 0 & 0 \\ 0 & 24.8 & 0 \\ 0 & 0 & 22.7 \end{bmatrix}$$

A construção das trilhas seguidas pelos peixes é desenvolvida através da implementação de *Muncres* do algoritmo *Hugrian* (DATE; NAGI, 2016). Esse algoritmo faz uma atribuição direta de m fontes a k destinos por meio de uma matriz $m \times k$ chamada matriz de custo. Uma matriz $P_{m \times k}$, mostrada na Equação 3.13, é criada para minimizar o custo da associação dos objetos de origem $S = \{s_1, s_2, \dots, s_m\}$ aos objetos de destino $R = \{r_1, r_2, \dots, r_k\}$ no quadro t , sendo s_m é uma coordenada da variável de estado da variável de observação no quadro $t - 1$, m é o número de coordenadas previstas, r_n é a variável de coordenadas da observação, k é o número de detectados coordenadas.

$$P(s_i, r_j) = \begin{bmatrix} f_{s_1, r_1} & f_{s_1, r_2} & \cdots & f_{s_1, r_n} \\ f_{s_2, r_1} & f_{s_2, r_2} & \cdots & f_{s_2, r_n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ f_{s_m, r_1} & f_{s_m, r_2} & \cdots & f_{s_m, r_n} \end{bmatrix} \quad (3.13)$$

O elemento f_{s_i, r_j} na matriz indica o custo para conectar a i -ésima faixa de coordenadas de previsão s à j -ésima coordenada de detecção r . O valor de f_{s_i, r_j} é calculado de acordo com a Equação 3.14,

$$f_{s_i r_j} = w_1(\sqrt{(s_x - r_x)^2 + (s_y - r_y)^2}) + w_2(\sqrt{(s_x - r_x)^2 + (s_y - r_y)^2}) \cdot \frac{|s_\theta - r_\theta|}{2\pi} \quad (3.14)$$

sendo w_1 e w_2 são escalares usados para ponderar cada parte da função, s_x , s_y e s_θ são, respectivamente, os valores das coordenadas dos eixos x , y e orientação θ do peixe detectado, r_x , r_y e r_θ são respectivamente os valores de coordenadas dos eixos x , y e orientação θ da coordenada estimada. A atribuição do caminho para cada quadro de peixes por quadro é realizada usando a implementação de *Muncres* do algoritmo *Hungrian*, que procura atribuições únicas, ou seja, atribui o objeto do quadro anterior i a apenas um objeto de destino j no quadro atual.

Algumas trajetórias podem se perder ao longo do tempo, devido à oclusão do peixe e ao intervalo correspondente entre as imagens, causando fragmentação da trajetória. Se a trajetória for incompleta em comparação à trajetória inicial, um segundo cálculo da trajetória foi proposto com base em Qian et al. e Wu et al., (WANG et al., 2016; QIAN; CHENG; CHEN, 2014). Se nenhuma coordenada foi associada em β quadros consecutivos, a trajetória foi interrompida. Posições e tempos $(x_{end}, y_{end}, t_{end})$ da trajetória Γ_i são armazenadas em τ_i , sendo i é o número da trajetória. Se uma nova coordenada aparecer sem nenhuma atribuição, suas posições e tempo $(x_{start}, y_{start}, t_{start})$ da trajetória Γ_j serão armazenadas em ρ_j , sendo j o número da trajetória. Supondo que Γ_i uma trajetória interrompida e Γ_j uma trajetória com uma coordenada não atribuída, a conexão de uma

trajetória com a outra pode ser realizada usando a condição da Equação 3.15.

$$\text{condição de distância: } \begin{cases} 1 & \text{Dist}(\tau_i, \rho_j) < d \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3.15)$$

$$\text{Dist}(\tau_i, \rho_j) = \sqrt{(x_{\text{end}} - x_{\text{start}})^2 + (y_{\text{end}} - y_{\text{start}})^2} \quad (3.16)$$

A condição na Equação 3.15 indica se a distância entre a posição inicial de ρ_j e a extremidade τ_i é menor que d , se trajetórias verdadeiras estiverem conectadas. Se houver mais de uma trajetória interrompida, a condição da Equação 3.15 é calculada seguindo a ordem da trajetória com o valor mais baixo de t_{end} até o t_{end} mais alto. Nos casos em que há mais de um caminho sem atribuição, a conexão é feita com as coordenadas ρ_j que apresentam uma distância menor entre a trajetória τ_i , dada pela Equação 3.16. A Figura 19 ilustra o processo de conexão de uma trajetória interrompida com uma nova trajetória.

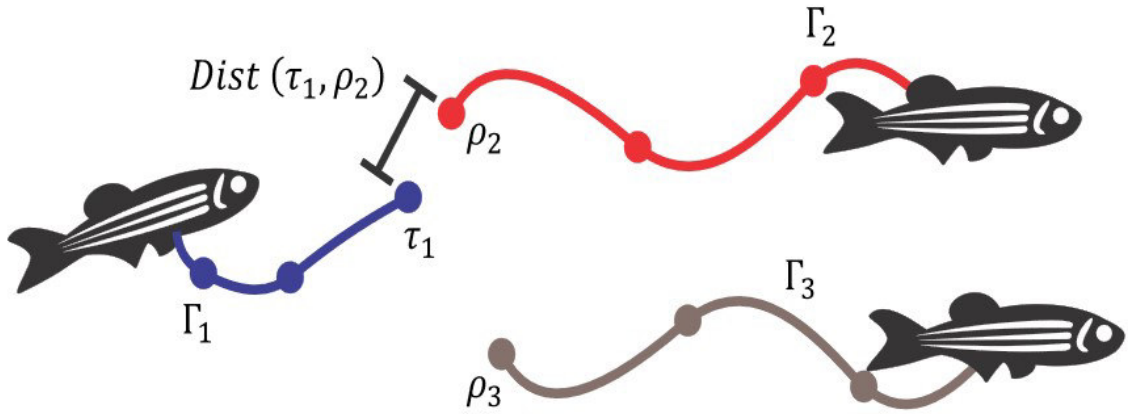


Figura 19 – Reconexão da trajetória do peixe. Nesta situação, há uma trajetória interrompida Γ_1 e duas novas trajetórias Γ_2 e Γ_3 . Para a conexão da trajetória Γ_1 , a condição da equação 3.15 é verificada em relação às trajetórias Γ_2 e Γ_3 . Se o resultado for verdadeiro para ambas as trajetórias, a trajetória escolhida para a conexão é aquela com a menor distância definida pela equação 3.16. Na figura, o valor mais baixo é $\text{Dist}(\tau_i, \rho_j)$, então suas trajetórias são conectadas.

3.6.3 Transferência da Informação Aquário-Aquário

Para transmitir uma informação, a partir do rastreamento do grupo de peixes “emissor”, uma matriz de quantidade de peixes por quadros foi registrada (Equação 3.17),

$$\text{PeixeCond} = \begin{bmatrix} f_{1,1} & f_{1,2} & \cdots & f_{1,q} \\ f_{2,1} & f_{2,2} & \cdots & f_{2,q} \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ f_{p,1} & f_{p,2} & \cdots & f_{p,q} \end{bmatrix} \quad (3.17)$$

em seguida, foi feita a média da frequência dos peixes condicionados no treinamento experimental, conforme a Equação 3.18,

$$medpeixe = \frac{1}{p \times q} \sum_{i=1}^q \sum_{j=1}^p f_{i,j} \quad (3.18)$$

sendo *PeixeCond* a matriz que armazena os rótulos dos peixes, condicionados ou não condicionados, presentes no lado correto do tanque, durante o estímulo. O $f_{i,j}$ representa um valor binário da presença ou não do peixe no local correto, sendo 1 para peixe condicionado e 0 para não condicionado, os valores de i e j correspondem, respectivamente, a coluna e a linha da matriz, sendo a coluna o valor do quadro no vídeo e a linha é identificação do peixe. O q é o último quadro do processo e p o número do peixe. O valor *medpeixe* é a média dos peixes condicionados do treinamento modelo padrão.

O próximo treinamento é comparado com esse modelo padrão de atividade condicionada. Assim, a diferença entre a quantidade de peixes de uma determinada tentativa condicionada e a tentativa do modelo padrão é calculado o *Z-score*, pela Equação 3.19.

$$zscore = \frac{num_{peixe} - \overline{medpeixe}}{S} \quad (3.19)$$

sendo *zscore* o valor de *Z-score*, num_{peixe} é a quantidade de peixes condicionados no quadro, *medpeixe* é a média do modelo padrão e S o seu desvio padrão.

O *Z-score* é convertido pela função sigmoide (Equação 3.20) centralizada na média do teste de modelo (Equação 3.21), em um padrão de intensidade de estímulos (visual e vibração): baixa, média e alta. Esse padrão de intensidade variaram em tempo real, de acordo com o número de peixes registrados no treinamento do tanque “emissor”.

$$sigmoide(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}} \quad (3.20)$$

$$resultado = \begin{cases} \text{alta} & 0,67 < sigmoide(x) \leq 1,00 \\ \text{media} & 0,33 < sigmoide(x) \leq 0,67 \\ \text{baixa} & 0,00 \leq sigmoide(x) \leq 0,33 \end{cases} \quad (3.21)$$

Uma vez que o estímulo foi entregue ao tanque “receptor”, os *zebrafish* devem seguir para o lado correto do espaço alimentar, no tanque, a espera de recompensa. Os peixes “receptores” só receberão comida se fizerem a tarefa correta, feito isso, ambos os grupos de peixes receberão recompensa, como um sinal de *feedback* para grupo “emissor”.

3.6.4 Análise do Comportamento dos grupos de *zebrafish*

Para avaliar o comportamento dos peixes em grupo e individual, implementou-se algumas métricas de avaliação, como descrita a seguir.

3.6.4.1 Polarização

O *zebrafish* apresenta distribuições de polarização diferentes a cada grupos de peixes formados. Esses grupos podem se organizar como “cardumes”, que são apenas agregados de indivíduos, ou “escolas”, onde os agregados de indivíduos possuem um movimento sincronizado e altamente polarizado (SOCCOL, 2015).

Então, para medir o grau de coordenação do grupo de peixes em cada quadro, usou-se a polarização $pol(t)$, quantificando a intensidade da orientação paralela em uma escola de peixes, pela Equação 3.22:

$$pol(t) = |M(t)| \quad (3.22)$$

$$M(t) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \hat{v}_k(t) \quad (3.23)$$

$$\hat{v}_k(t) = \frac{v_k(t)}{|v_k(t)|} \quad (3.24)$$

sendo $pol(t)$, a norma da média aritmética da direção de todos os peixes no quadro t ; $\hat{v}_k(t)$ é o versor que indica direção do movimento do peixe k no quadro t ; $v_k(t)$ é a velocidade do peixe k no quadro t ; N é o número total de peixes. O valor de $|M(t)|$ assume valores entre $[0, 1]$ sendo que o valor mais próximo de 1, maior a intensidade da orientação paralela do grupo dos peixes.

3.6.4.2 Rede de Interação entre *zebrafish*

O comportamento coletivo foi resultado de diversas dinâmicas e pode ser comparado a sistemas vivos. Quando um grupo de peixes se desloca, geralmente esses animais processam informações para coordenar seus movimentos. Os indivíduos respondem de forma dinâmica, podendo obter boas decisões como um coletivo (BHAT; GREULICH; MARTINS, 2015). Estudos recentes, em teoria da informação, começaram a aplicar métodos para quantificar esse processamento distribuído dos animais (PAPASPYROS et al., 2019; CROSATO et al., 2018; NIIZATO et al., 2020; OWOEYE; MUSOLESI; HAILES, 2018).

A entropia de Shannon serviu para quantificar as informações de um conjunto de dados, pensada como a incerteza média para encontrar o sistema em um estado particular x de um conjunto de estados X , sendo $p(x)$ a probabilidade desse estado, Equação 3.25.

$$H(X) = - \sum_{x \in X} p(x) \log p(x) \quad (3.25)$$

Pretende-se quantificar os fluxos dinâmicos de informações que ocorrem no momento que a escola de peixes passa do seu momento de repouso para o seu momento de alimentação.

Através dos valores coletados, espera-se que o peixe com maior valor de interação, com os demais peixes do tanque, seja o peixe influenciador daquele momento, pois o seu movimento no instante em que o estímulo foi acionado, resultou na movimentação dos outros peixes.

Para o cálculo da influência do movimento de um peixe em relação aos demais peixes no tanque, foi usado a variação de virada do peixe, que em outros trabalhos foram obtidos bons resultados.

Para o cálculo da variação da direção do peixe no tempo foi usada a Equação 3.26:

$$c_{\phi_{k,t}} = c_{\theta_{k,t}} - c_{\theta_{k,t-1}}, \quad (3.26)$$

sendo $c_{\phi_{k,t}}$, a diferença da direção da cabeça do peixe k no tempo t em relação ao tempo passado $t - 1$.

Logo, para medir a informação entre um peixe e seu vizinho, foi usada a informação mútua. A informação mútua de duas variáveis aleatórias foi a quantidade de informação que cada uma carrega sobre a outra, usada para medir relações não lineares entre duas variáveis, sendo definida como uma soma de diferenças das entropias de Shannon, dada pela Equação 3.27.

$$I(X; Y) = H(X) + H(Y) - H(X, Y) \quad (3.27)$$

sendo $H(X, Y)$ é a entropia conjunta de Shannon, X e Y são variáveis aleatórias. A equação 3.27 pode ser reescrita na forma da Equação 3.28.

$$I(X; Y) = \sum_x \sum_y p(x, y) \log \frac{p(x, y)}{p(x)p(y)} \quad (3.28)$$

sendo $I(X; Y)$ pode ser pensado como a informação mútua de um par de peixes. Se as duas variáveis de entrada X e Y são independentes, o critério de informação mútua será zero, se duas variáveis são fortemente dependentes, a informação mútua terá um valor alto. A informação mútua é simétrica, ou seja, o valor de $I(X; Y)$ é igual ao valor de $I(Y; X)$.

Para calcular a informação mútua é usada uma variável de origem Φ_i e uma variável de destino Φ_j , sendo ambas definidas em termos da variação da direção da cabeça peixe no tempo e i e j representam o peixe no cardume. Sendo $\Phi_k = (c_{\phi_{k,1}}, c_{\phi_{k,2}}, \dots, c_{\phi_{k,N}})$ a série temporal do k -ésimo peixe com N o número total de quadros.

Os valores da informação mútua foram calculados em pares com todas combinações de peixes, armazenando em uma matriz as relações entre o peixe origem e peixe destino,

pela Equação 3.29:

$$MuIn = \begin{bmatrix} 0 & MI(\Phi_1, \Phi_2) & \cdots & MI(\Phi_1, \Phi_N) \\ MI(\Phi_2, \Phi_1) & 0 & \cdots & MI(\Phi_2, \Phi_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ MI(\Phi_N, \Phi_1) & MI(\Phi_N, \Phi_2) & \cdots & 0 \end{bmatrix} \quad (3.29)$$

sendo $MuIn$ é a matriz que armazena a relação de informação mútua em relação a todos os pares de peixes, o valor de todos os elementos da diagonal são iguais a zero e $MI(., .)$ é a função da informação mútua dada pela equação 3.28.

3.6.4.3 Velocidade

Para avaliar a locomoção do peixe no tanque e a velocidade de processamento da informação adquirida, foi usada a velocidade escalar, calculada a partir da relação do seu deslocamento em relação ao tempo, dada pela Equação 3.30.

$$dist_k(t) = \sqrt{(c_{x_k,t} - c_{x_k,t-1})^2 + (c_{y_k,t} - c_{y_k,t-1})^2} \quad (3.30)$$

sendo $dist_k(t)$ é a distância percorrida pelo peixe k no quadro t .

A partir da distância percorrida pela k -ésima cabeça do peixe é possível calcular sua velocidade a partir da Equação 3.31.

$$vel_k(t) = \frac{\sqrt{dist_k(t) - dist_k(t-1)}}{\Delta t} \quad (3.31)$$

sendo $vel_k(t)$ é a velocidade da k -ésima cabeça do peixe no quadro t e Δt é o tempo em segundos entre a captura dos quadros, que é dada pelo tempo de $\Delta t = 0.03segundos$.

3.7 Análise Estatística

A resposta condicionada dos peixes pelos estímulos consecutivos no dia experimental foi comparada. As análises estatísticas dos dados foram realizados no software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Inc., Chicago, IL, USA) versão 25.0, os gráficos foram feitos usando o software *GraphPad* 2020. O teste *Kolmogorov-Smirnov* foi usado para verificar a normalidade dos dados. As estatísticas paramétricas foram usadas para comparar os grupos de peixes estimulados com dois estímulos (luz vermelha e *vibracall*), utilizando os teste *t Student* (Test t) para comparar o número de peixes localizados na área delimitada para condicionamento no tanque, além da velocidade, da distância e da polarização dos grupos de peixes condicionados com dois estímulo; *one-way* ANOVA (F) foi usada para avaliar a progressão de cada grupo. Para todos os testes, o nível alfa foi ajustado para 0,05.

A capacidade de resposta do *zebrafish* foi medida como o aumento médio do número de *zebrafish* na arena alimentar após a iniciação do estímulo luminoso e usando $\text{média} \pm \text{desvio padrão (DP)}$. E, a informação enviada e recebida pelos grupos de peixes foi comparada usando correlação (r). Além disso, foi usado o teste de causalidade de Granger em dados da transmissão da informação emissor-receptor para verificar se havia causalidade na resposta condicionada dos peixes emissores em relação aos peixes receptores da informação. Contudo, essa causalidade diz respeito à existência de uma precedência temporal de uma variável sobre a outra, observando se a precedência é estatisticamente significativa. Com isso, foi possível verificar se o comportamento do grupo emissor influenciou no comportamento no grupo receptor. Dessa forma, a causalidade de Granger aborda a hipótese de não causalidade, ou seja, se uma variável não causa outra, obtendo $p\text{-value} > 0,05$, e seu grau de associação aumenta na medida das defasagens do indicador, escolhida pela quantidade de *Lag* (GRANGER; HUANG, 1997; LOUZANO et al., 2019). O teste de causalidade de Granger foi medido nos dados de posição espacial centro de massa dos peixes no aquário (x,y) e em relação à distância do centro massa a área alimentar estimulada.

4 RESULTADOS

Será apresentado, neste capítulo, a avaliação do canal de comunicação para transferência de informação entre grupos de *zebrafish*, o teste modelo e os resultados das tentativas de transferência da informação em três estratégias experimentais: restrição total, restrição parcial e sem restrição. Além disso, apresenta uma avaliação com maior detalhamento de como a comunicação pode ter sido interpretada entre os peixes do mesmo grupo (emissor/receptor) e entre os peixes de grupos distintos, mostrando uma interação dinâmica entre os peixes dos grupos "emissor" e "receptor".

4.1 Avaliação do Teste Modelo

Primeiramente, os peixes do grupo "emissor" (N=16) aprenderam uma tarefa de associação alimentar antes de qualquer experimento envolvendo a transferência de informação aquário-aquário. Os peixes foram condicionados em dois estímulos (luz de LED vermelha e *vibracall*) apresentados durante a alimentação. Assim, quando a quantidade de peixes condicionados atingiu 60% durante a tarefa experimental, foi construído um modelo de teste comparativo de aprendizagem. Um teste modelo para cada estímulo foi usado. Para os testes luminosos, o modelo foi construído de 32 tentativas condicionadas, apresentando média de peixes condicionados de $11,76 \pm 1,97$ (média $\pm$ DP), velocidade média de $14,65 \pm 2,15$ cm/s (média $\pm$ DP) e polarização de $0,34 \pm 0,049$ (média $\pm$ DP). Já no modelo vibracall, foram usados 22 tentativas com média de peixes condicionados de $10,87 \pm 2,17$ (média $\pm$ DP), velocidade média do grupo de $14,3 \pm 3,1$ cm/s (média $\pm$ DP) e polarização de $0,30 \pm 0,056$ (média $\pm$ DP).

Uma rede neural CNNLSTM foi usada para reconhecer os padrões de comportamento dos peixes durante as tentativas de condicionamento. O desempenho do treinamento da rede neural alcançou cerca de $95,90\% \pm 0,076$ (média $\pm$ DP) de acurácia, e o desempenho da rede neural no período de teste foi de $98,62\% \pm 0,052$ (média $\pm$ DP). Na Figura 20 está o desempenho da rede neural com dados de treino, teste e função de perda. Depois que esse treinamento preliminar foi concluído, os comportamentos dos grupos "emissor" e "receptor" foram sincronizados entre os aquários.

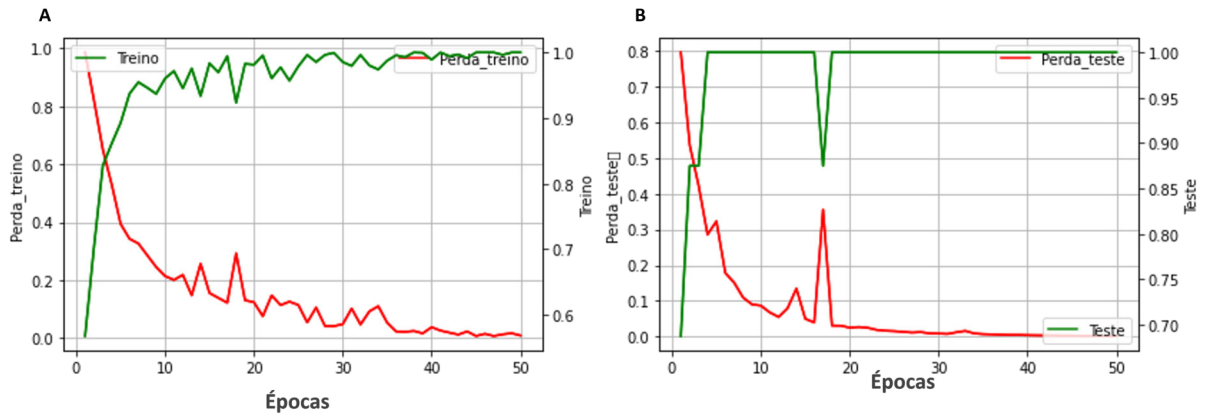


Figura 20 – Desempenho da rede neural CNNLSTM para reconhecer os padrões comportamentais dos *zebrafish* no teste modelo. A) Resultado do treinamento da rede neural. B) Resultado do teste da rede neural.

4.2 Avaliação Comportamental do Grupo “emissor”

Para fins de análise, a Figura 21, apresenta as 10 tentativas iniciais de treinamentos referente ao aprendizado do grupo de peixes “emissor”. Os peixes aprenderam a associar rapidamente o estímulo luminoso com a alimentação. No entanto, os peixes tiveram maiores dificuldades para aprender o estímulo *vibracall*.

Durante o LED aceso, houve forte mudança de comportamento entre o grupo estimulado e o grupo controle em todas as tentativas (tentativa 1: $test\ t = -43,77, p < 0,0001$; tentativa 2: $test\ t = -51,51, p < 0,0001$; tentativa 3: $-29,57, p < 0,0001$; tentativa 4: $test\ t = -13,09, p < 0,0001$; tentativa 5: $-28,25, p < 0,0001$; tentativa 6: $test\ t = -17,08, p < 0,0001$; tentativa 7: $test\ t = -19,79, p < 0,0001$; tentativa 8: $test\ t = -28,45, p < 0,0001$; tentativa 9: $test\ t = -33,31, p < 0,0001$; tentativa 10: $test\ t = -33,71, p < 0,0001$), os peixes associaram o estímulo ao período alimentar rapidamente, deslocando-se para o espaço reservado para alimentação, mostrando que o comportamento dos peixes sofreu mudança em todas as tentativas, tendo progressão durante o treinamento ($F_{(9,149)} = 11,55, p < 0,0001$) (Figura 21A).

No período estimulado com a vibração acionada, houve mudança significativa do comportamento dos peixes estimulados em relação ao grupo controle durante todas as tentativas (tentativa 1: $test\ t = 7,69, p < 0,0001$; tentativa 2: $test\ t = -23,50, p < 0,0001$; tentativa 3: $-10,97, p < 0,0001$; tentativa 4: $test\ t = 16,03, p < 0,0001$; tentativa 5: $7,43, p < 0,0001$; tentativa 6: $test\ t = -9,85, p < 0,0001$; tentativa 7: $test\ t = -23,38, p < 0,0001$; tentativa 8: $test\ t = -14,13, p < 0,0001$; tentativa 9: $test\ t = -37,08, p < 0,0001$; tentativa 10: $test\ t = -10,20, p < 0,0001$). Em todos os períodos de treinamento, durante o estímulo acionados, houve progressão significativa no comportamento dos peixes ($F_{(9,149)} = 236,5, p < 0,0001$) (Figura 21A).

O grau de coordenação do grupo de *zebrafish* foi medido para quantificar a intensidade da orientação paralela da escola de peixe. Em todas as tentativas de condicionamento usando o estímulo luz vermelha, encontrou-se uma maior polaridade entre os grupos de *zebrafish* estimulados em relação ao grupo controle (tentativa1: $test\ t = 3,21$, $p=0,002$; tentativa2: $test\ t = 1,077$, $p=0,283$; tentativa3: $11,76$, $p<0,0001$; tentativa4: $test\ t = 10,47$, $p<0,0001$; tentativa5: $t = 2,10$, $p=0,037$; tentativa6: $test\ t = 7,59$, $p<0,0001$; tentativa7: $test\ t = 1,92$, $p=0,057$; tentativa8: $test\ t = 7,81$, $p<0,0001$; tentativa9: $test\ t = 10,50$, $p<0,0001$; tentativa10: $test\ t=4,41$, $p<0,0001$) (Fig. 5A). Porém, a polarização dos peixes durante o *vibracall* ligado parecia ser mais variável do que no estímulo vermelho. Em algumas tentativas de ensaio não houveram diferenças significativas entre o grupo estimulado e o grupo controle (tentativa 6: $test\ t = -1,13$, $p>0,05$; tentativa 7: $test\ t = 0,757$, $p>0,05$) (Figura 21B).

Observa-se, que os *zebrafish* aprenderam a associar o estímulo de luz vermelha mais rapidamente do que o estímulo por vibração. Houve forte diferença significativa em todas as tentativas (tentativa 1: $test\ t = 75,92$, $p<0,0001$; tentativa 2: $test\ t = 28,89$, $p<0,0001$; tentativa 3: $10,01$, $p<0,0001$; tentativa 4: $test\ t = 28,39$, $p<0,0001$; tentativa 5: $25,05$, $p<0,0001$; tentativa 6: $test\ t = 33,28$, $p<0,0001$; tentativa 7: $test\ t = 7,36$, $p<0,0001$; tentativa 8: $test\ t = 27,79$, $p<0,0001$; tentativa 9: $test\ t = 29,87$, $p<0,0001$; tentativa 10: $test\ t=21,21$, $p<0,0001$). Além disso, o comportamento dos peixes parecia ser mais estável em todas as tentativas durante a luz acesa (média $\pm$ DP: $11,67\pm0,98$, variação de 8,45%) em relação a estimulação pelo *vibracall* (média $\pm$ DP: $5,39\pm2,74$, variação de 50,76%) (Figura 21C).

Os peixes estimulados com o estímulo LED vermelho eram mais rápidos em todas as tentativas de condicionamento em relação ao grupo não estimulado (tentativa1: $test\ t = 24,01$, $p<0,0001$; tentativa2: $test\ t = 25,46$, $p<0,0001$; tentativa3: $23,64$, $p<0,0001$; tentativa4: $test\ t = 16,022$, $p<0,0001$; tentativa5: $t = 18,39$, $p<0,0001$; tentativa6: $test\ t = 19,79$, $p<0,0001$; tentativa7: $test\ t = 19,60$, $p<0,0001$; tentativa8: $test\ t = 24,52$, $p<0,0001$; tentativa9: $test\ t = 25,39$, $p<0,0001$; tentativa10: $test\ t=-5,26$, $p<0,0001$), os *zebrafish* conseguiram acessar a área delimitada para alimentação em rápida progressão, mostrando que os peixes entendiam que era o período antecedente à alimentação ($F_{(9,149)} = 11,11$, $p<0,0001$) (Figura 22A). No entanto, os peixes estimulados pelo *vibracall* apresentaram algumas instabilidades na velocidade percorrida em relação ao grupo controle e, em algumas tentativas, não apresentaram diferenças significativas (tentativa 5: $test\ t = -0,028$, $p=0,978$; tentativa 9: $-1,87$, $p=0,063$), mas houve mudança de comportamento durante todas as tentativas ($F_{(9,149)} = 70,03$, $p<0,0001$). Além disso, os peixes estimulados viajaram mais pelo tanque durante as tentativas estimuladas de condicionamento em relação aos peixes do grupo controle ($F_{(3,36)} = 53,48$, $p<0,0001$) (Figura 22B).

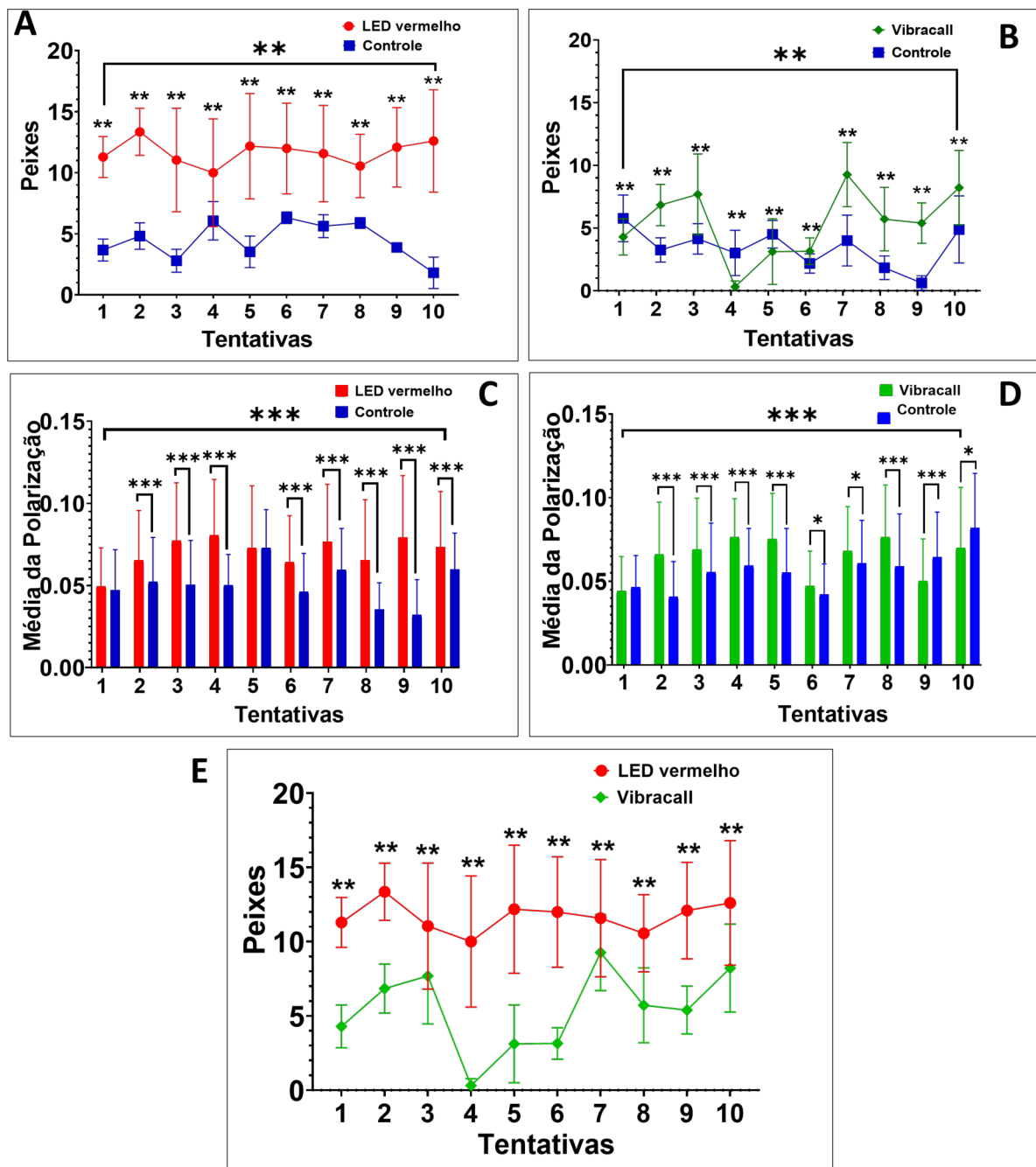


Figura 21 – Respostas do condicionamento apetitivo do *zebrafish* usando dois estímulos: luz de LED vermelha e vibração. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo LED vermelho. B) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo *vibracall*. C) Média de polarização durante o período estimulado com LED vermelho. D) Média de polarização durante o período estimulado com *vibracall*. E) Comparação da quantidade de peixes entre o período estimulado com LED vermelho e *vibracall*. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste *t student* ($*p < 0,05$; $**p < 0,001$, $***p < 0,0001$)

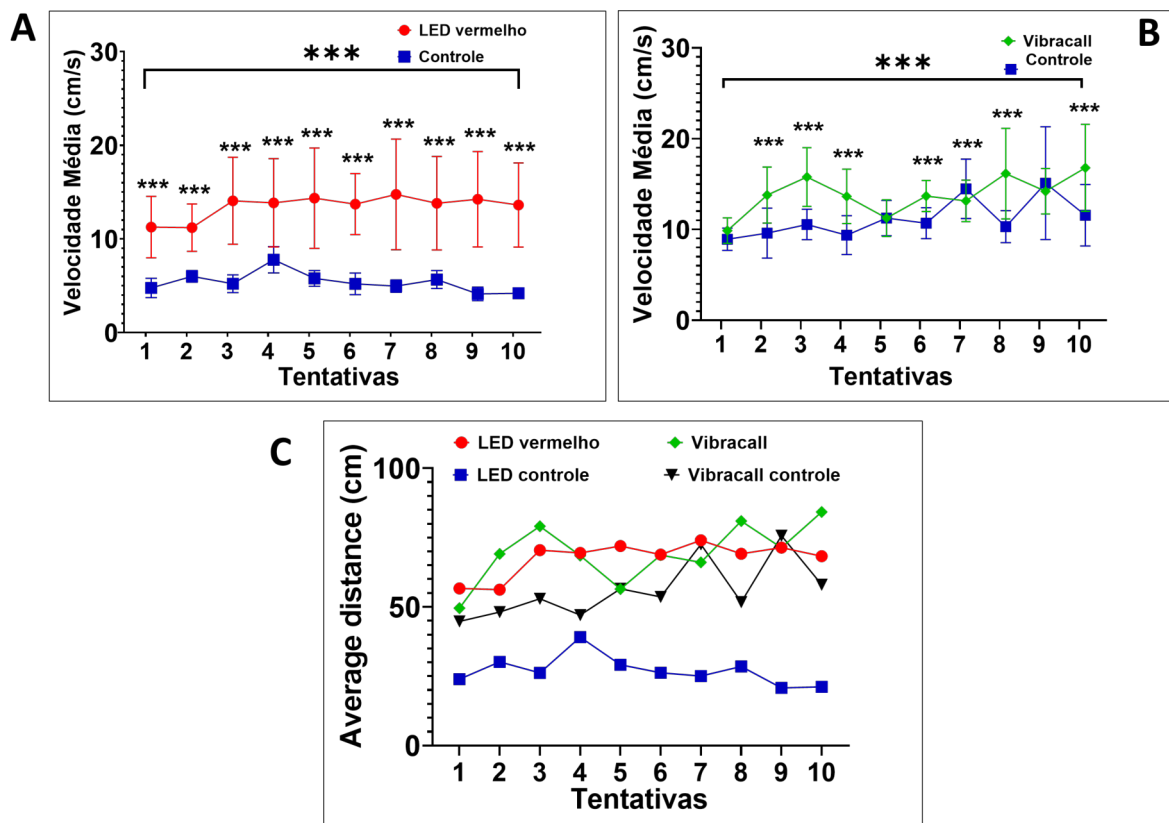


Figura 22 – Respostas de comportamento de grupo de *zebrafish* estimuladas com luz de LED vermelho e *vibracall*. A) Velocidade média dos peixes estimulados pelo LED vermelho. B) Velocidade média dos peixes estimulados pelo *vibracall*. C) Distância média percorrida pelos peixes estimulados e grupo controle. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste t *student* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)

4.3 Avaliação da Transferência de Informação

4.3.1 Análise da Transferência da Informação com Restrição Total

4.3.1.1 Estímulo luminoso

Após o condicionamento dos peixes do grupo “emissor” e a construção de um modelo comportamental, ou seja, um modelo padrão das respostas condicionadas, iniciou-se o processo da transferência de informação entre os aquários. A partir dessa fase de treinamento, todas as atividades foram comparadas ao teste modelo comportamental e, dessa forma, o fluxo da informação foi processado. Nessa experiência, verificou-se uma informação enviada de forma totalmente desavisada aos peixes receptores, poderia ser respondida com o mesmo padrão comportamental dos peixes emissores da mensagem.

A primeira tarefa iniciou-se no aquário com peixes do grupo “emissor”, que de-

sempenharam uma atividade condicionada, com atividade luminosa e vibracall. Essa atividade foi também comparada ao modelo e, assim, seguiu-se a sessão de transferência de informação aquário-aquário, baseada em intensidade de estímulos, proporcional à diferença entre as taxas de quantidades de peixes condicionados na tentativa atual e o teste modelo normalizado, referente ao grupo “emissor”. Assim, os peixes do grupo “receptor” receberam a informação pela intensidade de estímulos. Para avaliar a resposta dos peixes do grupo “receptor”, nessa experiência, foi adicionada o método de Restrição Total, que levava em conta a classificação do comportamento dos peixes (condicionados luz/vibração ou não condicionados) e o valor de *Z-score* acima do limiar, para avaliar se os peixes receptores estavam reagindo ao padrão da informação enviada no aquário, e não a quaisquer outras interferências no tanque.

A Figura 23, apresentada a resposta dos peixes dos grupos “receptor” e “emissor”. Como esperado, os peixes do grupo “emissor” obtiveram melhor desempenho nas tentativas com média de peixes de $9,34 \pm 1,86$ (média $\pm$ DP) e desempenho de 78,57% de acerto, em comparação ao grupo “receptor” ($1,57 \pm 1,86$; 0,0% (média $\pm$ DP;acurácia). Houve diferença significativa do teste modelo com o grupo “emissor” ($test\ t = -4,676$, $p < 0,0001$) e com o grupo “receptor” ($test\ t = 17,58$, $p < 0,0001$); também houve diferença entre o grupo “emissor” e o “receptor” ($test\ t = 15,60$, $p < 0,0001$); e o grupo “receptor” e controle ($test\ t = 4,33$, $p = 0,0001$). Houve mudança de comportamento entre todos os grupos de peixes ($F_{(3,94)} = 166,2$; $p < 0,0001$)(Figura 23A).

Durante as tentativas estimuladas, os peixes do grupo “emissor” nadavam mais rápidos do que o grupo “receptor” e o grupo controle, respectivamente ($test\ t = 8,58$; $p < 0,0001$ e $test\ t = 13,10$; $p < 0,0001$). Não houve mudança significativa no comportamento do grupo “receptor” e controle ($test\ t = 1,356$; $p = 0,208$) Figura 23B)). Os peixes do grupo “receptor” estavam menos polarizados em relação ao grupo “emissor” durante as tentativas de condicionamento usando o estímulo de luz vermelha ($test\ t = 3,07$, $p = 0,0048$), e mais polarizados em relação ao grupo controle ($test\ t = 7,056$, $p < 0,0001$), houve diferença significativa entre todos os grupos de peixes ($F_{(2,63)} = 63,31$; $p < 0,0001$) (Figura 23C)). Observa-se que os peixes do grupo receptor tiveram poucas mudanças de comportamento durante as tentativas, mas houve diferença entre a tentativa inicial e a última tentativa dessa experiência ($test\ t = 1,29$; $p < 0,0001$). Houve uma mudança de comportamento instável em relação a todas as tentativas estimuladas pela transferência da informação ($F_{(3,94)} = 166,2$; $p < 0,0001$) (Figura 23D).

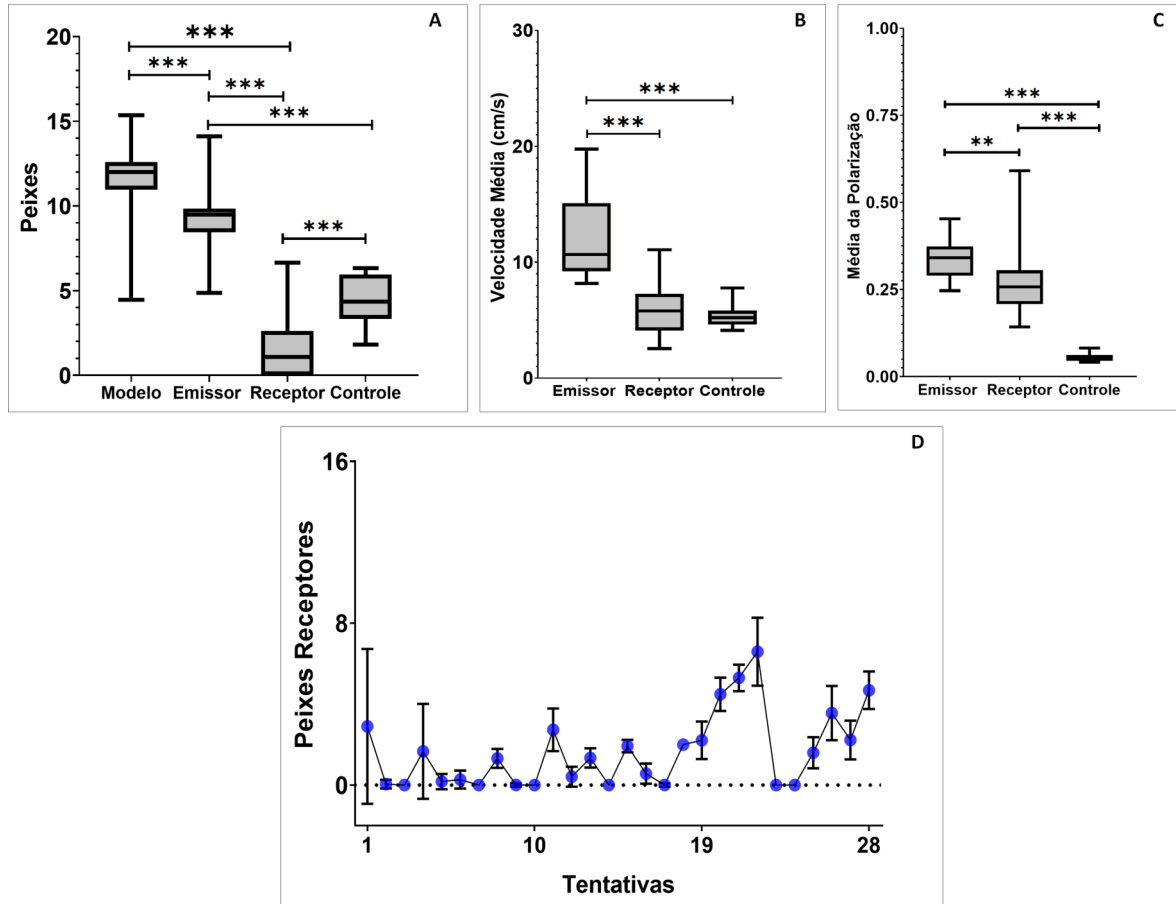


Figura 23 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário com restrição total, usando estímulo LED vermelho. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo aceso. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D) Quantidade de peixes receptores durante o estímulo luminoso em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste *t student* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)

O principal fator para melhorar a transmissão da informação do aquário “emissor” para o “receptor”, foi a qualidade do comportamento dos peixes condicionados. Com isso, a detecção e o rastreamento foram ajustados para obter informações precisas da movimentação dos peixes aos logo das tentativas. Dessa forma, o desempenho era alto quando a maioria dos peixes emissores desempenhavam as tarefas corretamente. Assim, quanto maior o desvio do modelo, melhor seria a intensidade de informação acionada no aquário “receptor”. Logo, observa-se que a transferência da informação foi na maioria das vezes fraca ou média (53,57% ou 39,28%, respectivamente)(Figura 24A). Além da transferência da informação, informações de *feedback* dos peixes do grupo “receptor” para o grupo “emissor” durante as tentativas (Figura 24B) foi relacionada as tentativas. Esse

feedback foi programado para enviar recompensa alimentar ao grupo “emissor”, porém, a resposta do grupo “receptor” não foi suficiente para encadear uma resposta com sucesso. Além disso, uma análise da variação nos *Z-score* mostrou uma fraca correlação entre a mensagem recebida e a resposta do grupo “receptor” ($r = 0,11$).

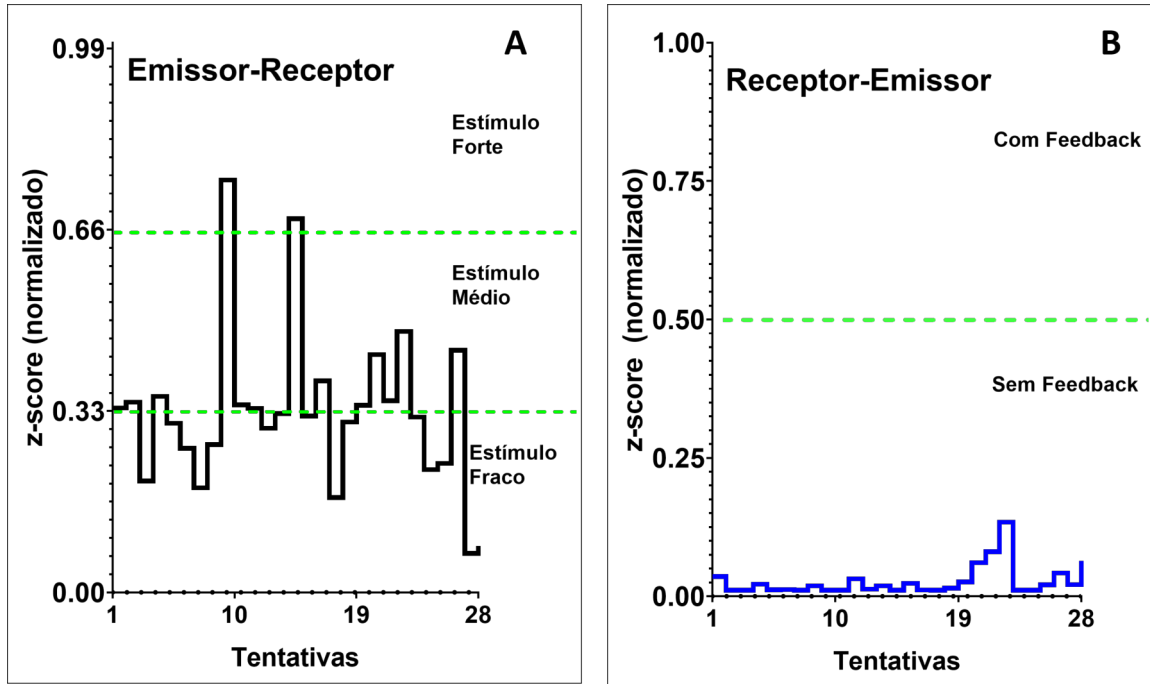


Figura 24 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário com restrição total usando estímulo LED vermelho. A) Quantidade de informação modelada por *Z-score* das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por *Z-score* para *feedback* do grupo receptor-emissor.

4.3.1.2 Estímulo *vibracall*

Nesse experimento, testou-se a transmissão da informação usando o estímulo *vibracall* para verificar a resposta dos *zebrafish* do grupo “receptor”. Para esse ensaio, as tentativas foram comparadas em um novo teste modelo, montado anteriormente, contendo apenas o padrão das respostas condicionadas com estímulo *vibracall* e, em seguida, iniciou-se o processo da transferência de informação entre os aquários.

A Figura 23, apresentada a resposta dos peixes dos grupos “receptor” e “emissor”. Os peixes do grupo “emissor” obtiveram melhor comportamento na maioria das tentativas, com desempenho de 58% de acerto, em comparação ao grupo “receptor” com 2,77% de acurácia. Porém, o grupo “emissor” obteve média de peixes mais baixa ($10,34 \pm 2,84$ (média $\pm$ DP)) em relação ao grupo “receptor” ($13,67 \pm 3,08$; (média $\pm$ DP)). Houve diferença significativa com o grupo “receptor” e o teste modelo ($test\ t = 2,708$, $p=0,0132$), com o grupo “emissor” e o “receptor” ($test\ t = 5,539$, $p<0,0001$); também houve diferença entre o grupo “receptor” e o controle ($test\ t = 4,633$, $p=0,0012$); e o grupo “emissor” e controle

($test\ t = 6,609$, $p < 0,0001$). Não houve diferença entre o grupo "emissor" e "receptor". Mas houve mudança de comportamento entre todos os grupos de peixes ($F_{(3,10)} = 38,32$; $p < 0,0001$) (Figura 25A).

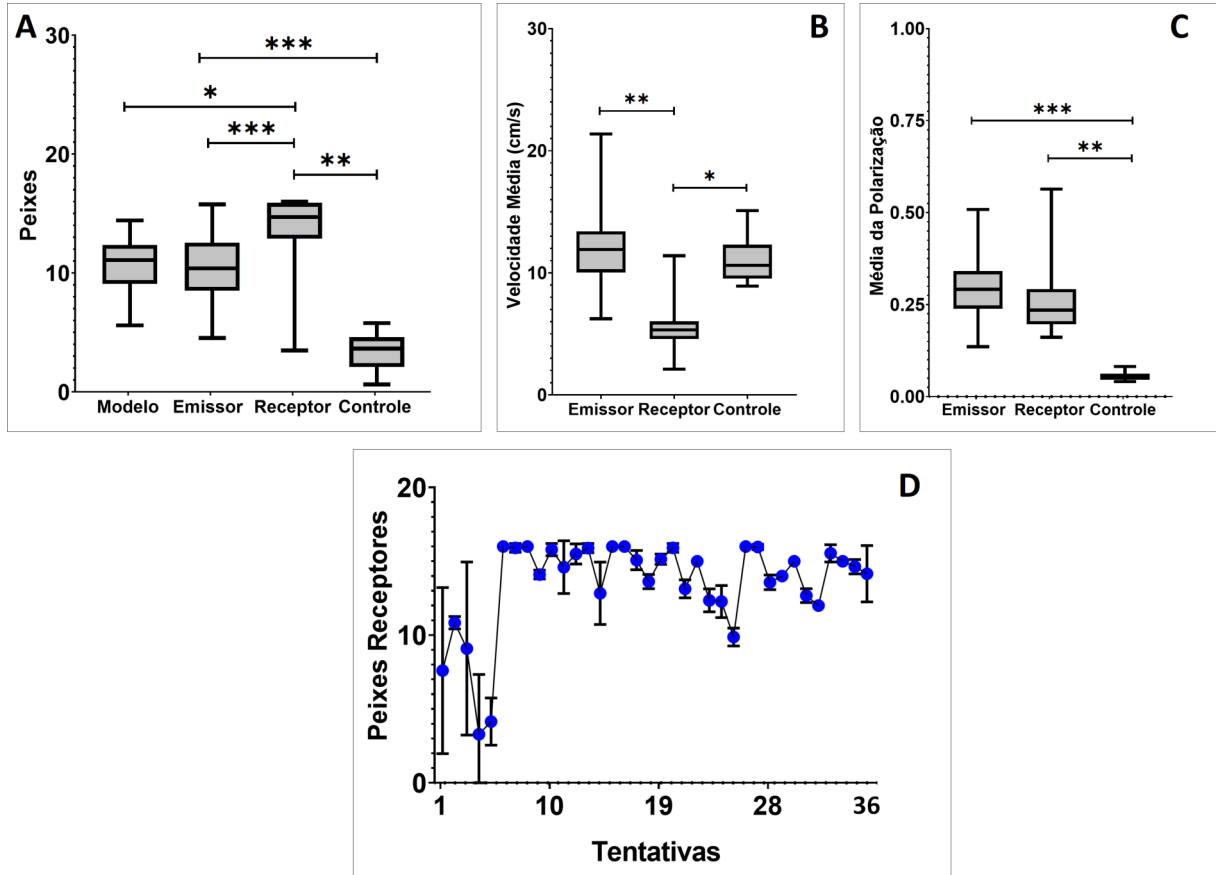


Figura 25 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário com restrição total, usando estímulo *vibracall*. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo ligado. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D) Quantidade de peixes receptores durante o estímulo *vibracall* em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste *t student* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)

Como esperado, os peixes do grupo “emissor” eram mais rápidos em relação ao grupo “receptor” ($test\ t = 10,79$; $p < 0,0001$) durante as tentativas estimuladas. E, o grupo “receptor” também era mais ágil do que o grupo controle ($test\ t = 4,85$; $p < 0,0001$). Em relação a todos os grupos, houve diferença significativa ($F_{(2,79)} = 59,25$; $p < 0,0001$). Além disso, os peixes dos grupos “emissor” e “receptor” pareciam obter semelhança na polarização, não havendo diferenças significativas ($test\ t = 1,708$; $p = 0,09$); porém, em todos os grupos o comportamento possuía variações significativas ($F_{(2,279)} = 33,34$; $p < 0,0001$).

Curiosamente, os peixes do grupo "receptor" tiveram poucas mudanças de comportamento durante as tentativas, obtendo altos índices de acesso a área alimentar, com diferença significativas ($F_{(35,5364)} = 540,1$; $p < 0,0001$). No entanto, esse fato não garante que os peixes aprenderam o percurso na primeira tentativa de envio da informação, porém essa análise foi tendenciosa. Os peixes desse experimento estavam mais tempo dentro da área alimentar, antes mesmo dos períodos estimulados (dados não mostrados), sendo observado na análise da velocidade média do grupo, pois os peixes não se moveram o suficiente para mostrar um aprendizado condicionado. Devido esse ocorrido, os demais experimentos para testar a transmissão da informação foi estabelecida apenas com o estímulo LED vermelho. (Figura 25D).

Em relação a transferência da informação, observa-se que na maioria das vezes foi enviado um estímulo médio (100%) (Figura 26A). Apesar dos valores de *z-score* terem sido altos, a rede neural não classificou o comportamento dos peixes como condicionado, por isso, não houve *feedback* adequada para a recompensa alimentar dos peixes do grupo "receptor" para o grupo "emissor" durante as tentativas (Figura 26B)). A variação nos *Z-score* apresentou uma correlação entre a mensagem recebida e a resposta do grupo "receptor" ($r = 0,263$). Esses dados não foram suficiente para haver uma transferência de informação adequada, pois apresentou um viés comportamental inesperado.

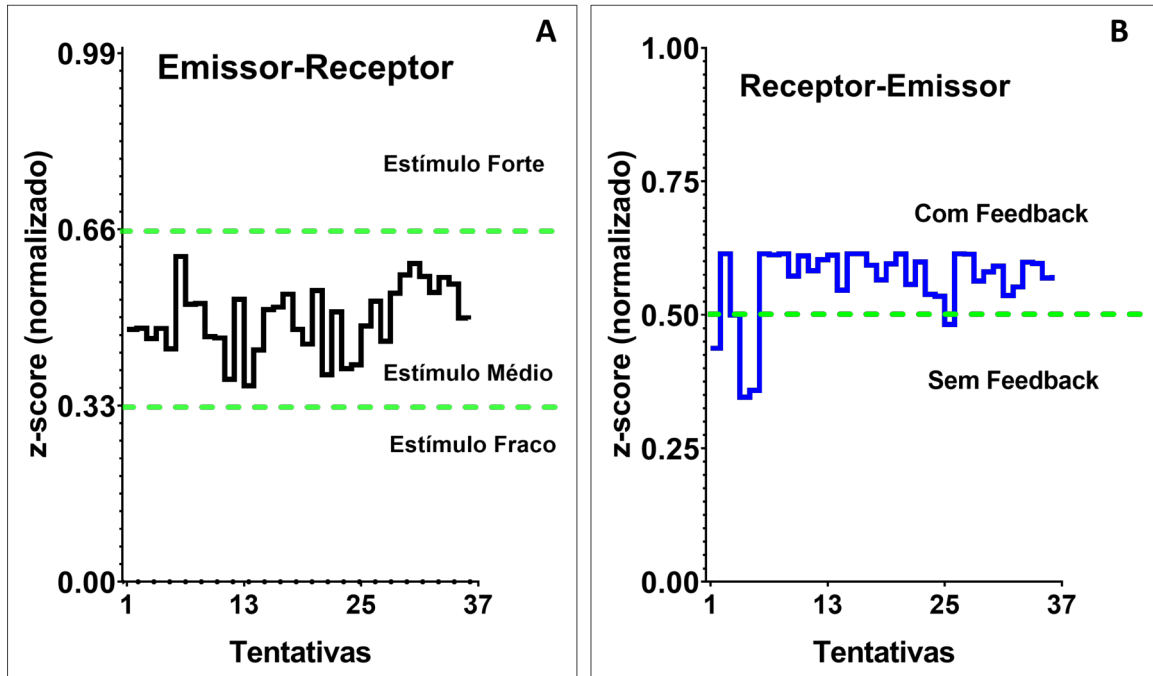


Figura 26 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário com restrição total usando estímulo *vibracall*. A) Quantidade de informação modelada por *Z-score* das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por *Z-score* para *feedback* do grupo receptor-emissor.

4.3.2 Análise da Transferência da Informação com Restrição Parcial

Nessa experiência, testou se as restrições mais brandas durante o processo de avaliação comportamental dos peixes receptores, poderiam melhorar a aprendizagem dos peixes gradativamente durante as tentativas. O método usado foi a restrição parcial, onde durante as tentativas, o sistema de transmissão e avaliação da informação verificava se uma das condições era verdadeira, ou seja, se os peixes receptores estavam classificados corretamente ou se o valor de *Z-score* normalizado estava acima do limiar ou se no último segundo do período estimulado, os peixes estavam no compartimento alimentar aguardando recompensa. Dessa vez, apenas uma informação foi transmitida de um aquário para outro. Semelhantemente da primeira experiência, a diferença entre as taxas o número de peixes condicionados registrados na tentativa atual era comparado ao modelo e transformada em intensidade de estímulos, enviados ao aquário receptor.

A Figura 27A, apresenta a resposta dos peixes dos grupos “receptor” e “emissor”. A precisão da transferência da informação foi melhor em relação a experiência anterior. Os peixes do grupo “emissor” obtiveram desempenho de 100% de acerto durante as tentativas, com média de peixes de $10,18 \pm 1,72$ (média $\pm$ DP), em comparação ao grupo “receptor” ($6,3 \pm 6,69$; 0,0% (média $\pm$ DP;acurácia). Apesar de haver uma mudança no comportamento dos peixes do grupo “receptor”, essa mudança não foi suficiente para ser semelhante ao comportamento do grupo “emissor” e, conseqüentemente, o sistema de avaliação não classificou nenhuma das tentativas como condicionadas ao longo da experiência.

Houve uma pequena diferença significativa do teste modelo com o grupo “emissor” (*test t* = 3,40; *p*=0,002) e com o grupo “receptor” (*test t* = 17,58, *p*<0,0001); também houve diferença entre o grupo “emissor” e o “receptor” (*test t* = 16,39, *p*<0,0001); e o grupo “receptor” e controle (*test t* = 7,07, *p*=0,0001). Houve mudança de comportamento entre todos os grupos de peixes ($F_{(3,95)} = 184,3$; *p*<0,0001)(Figura 27A). Durante os treinamentos, os peixes do grupo “emissor” nadavam mais rápidos do que o grupo “receptor” e o grupo controle, respectivamente (*test t* = 9,132; *p*<0,0001 e *test t* = 7,85; *p*<0,0001). Não houve mudança significativa no comportamento do grupo “receptor” e controle (*test t* = 1,65; *p*=0,133) (Figura 27B).

Os peixes do grupo “receptor” estavam menos polarizados em relação ao grupo “emissor” durante as tentativas de condicionamento usando o estímulo luz vermelha (*test t* = 5,87, *p*<0,0001), e mais polarizados em relação ao grupo controle (*test t* = 8,41, *p*<0,0001). Houve diferença significativa entre todos os grupos de peixes ($F_{(2,65)} = 85,10$; *p*<0,0001) (Figura 27C).

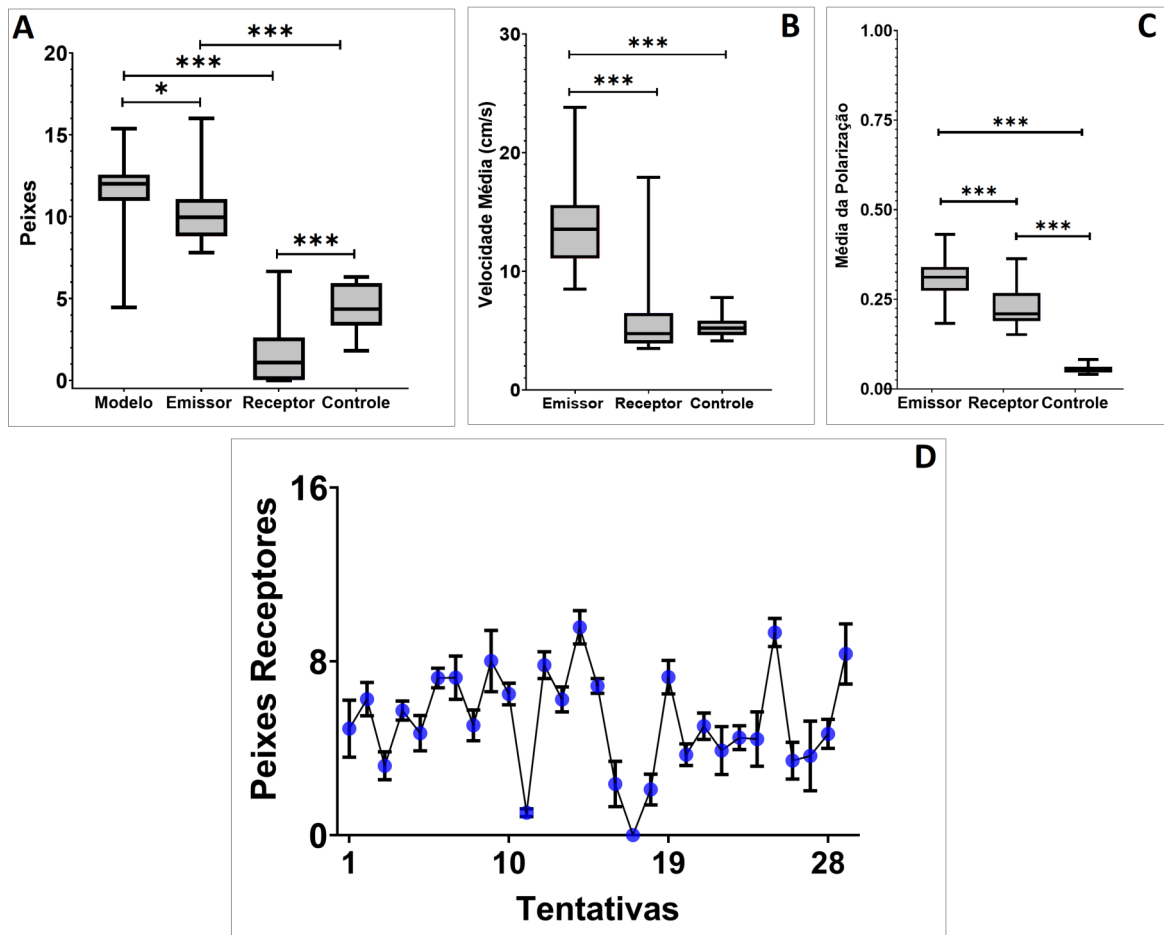


Figura 27 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário com restrição parcial, usando estímulo LED vermelho. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo aceso. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D) Quantidade de peixes receptores durante o estímulo luminoso em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste *t student* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)

Observa-se uma pequena mudança de comportamento dos peixes do grupo receptor durante as tentativas, tendo diferença entre a tentativa inicial a última tentativa dessa experiência ($test\ t = 32,26$; $p < 0,0001$). Houve uma mudança de comportamento instável em relação a todas as tentativas estimuladas pela transferência da informação ($F_{(28,43)} = 1.187$; $p < 0,0001$).

A transmissão da informação do aquário “emissor” para o “receptor” foi na maioria das tentativas com intensidade média (55,17%)(Figura 28A), havendo pelo menos um *feedback* em todas as tentativas (Figura 28B). Mesmo que os peixes receptores conseguissem obter um comportamento condicionado, a diferença entre o comportamento dos peixes

receptores em relação ao comportamento de teste modelo foi baixa, e não suficiente para enviar uma resposta aos peixes emissores, a fim de estabelecer uma comunicação fechada. Dessa forma, não houve uma correlação entre a mensagem recebida e a resposta do grupo “receptor” ($r = -0,00932$).

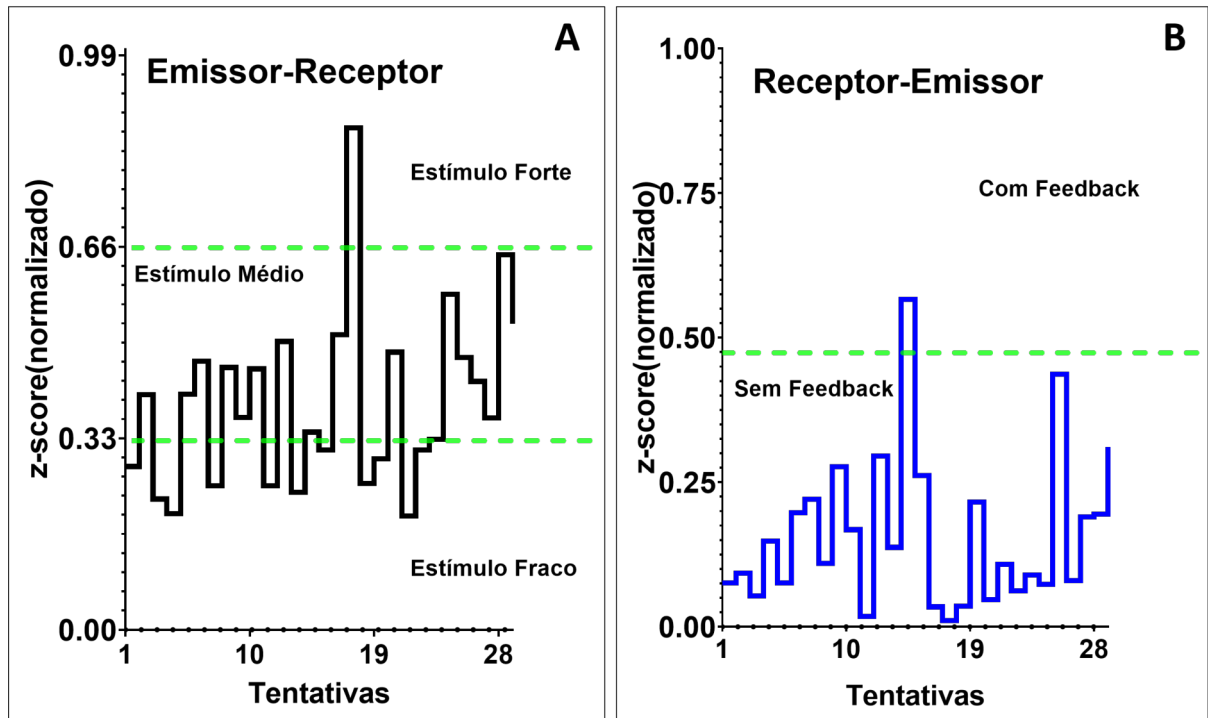


Figura 28 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário com restrição parcial usando estímulo LED vermelho. A) Quantidade de informação modelada por *Z-score* das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por *Z-score* para *feedback* do grupo receptor-emissor.

4.3.3 Análise da Transferência da Informação com Sem Restrição

Nessa experiência, todas as restrições foram retiradas durante o processo de avaliação comportamental dos peixes receptores, onde pôde melhorar o fluxo de informação entre os aquários, durante as tentativas. O método usado foi o Sem Restrição, que durante as tentativas, o sistema de transmissão da informação liberava alimentação após os estímulo de condicionamento, independente dos peixes se deslocarem ou não para o compartimento alimentar correto, durante o estímulo ligado (5 segundos). E, assim, os peixes tinham a possibilidade de aprender o lado correto da alimentação durante um único estímulo acionado a cada tentativa experimental. Além disso, a diferença entre as taxas do número de peixes condicionados da tentativa atual do aquário “emissor” era comparado ao teste modelo e, transformada em intensidade de estímulos, enviados ao aquário receptor. Em seguida, se a diferença entre as taxas de condicionamento receptor fosse superior ao teste modelo, um *feedback* alimentar era enviado ao grupo “emissor”, estabelecendo uma

comunicação fechada.

A Figura 29A, apresenta a resposta dos peixes dos grupos “receptor” e “emissor”. Houve um aumento na transferência da informação, desempenhando melhor em relação a experiência anterior. Os peixes do grupo “emissor” obtiveram desempenho de 100% de acerto durante todas as tentativas, com média de peixes de $10,05 \pm 0,96$ (média $\pm$ DP), em comparação ao grupo “receptor” com 63,63% de acurácia e média de peixes condicionados de $9,90 \pm 2,09$ (média $\pm$ DP). Houve uma similaridade no comportamento dos peixes receptores em relação aos peixes emissores, com pouca diferença significativa (*test t* = 2,75; *p*=0,012), essa semelhança foi suficiente para que o sistema de avaliação classificasse as tentativas como condicionadas ao longo das experiências, formando uma comunicação fechada com retorno de informação ao aquário “emissor”. Houve uma pequena diferença significativa do teste modelo com o grupo “emissor” (*test t* = 3,23; *p*=0,004), mas não houve diferença com o grupo “receptor” (*test t* = 0,89, *p*=0,378); também teve diferença entre o grupo “receptor” e controle (*test t* = 5,79, *p*=0,0003); e mudança de comportamento entre todos os grupos de peixes ($F_{(3,85)} = 29,65$; *p*<0,0001).

Em todas as tentativas, os peixes do grupo “emissor” eram mais rápidos do que o grupo “receptor” e o grupo controle, respectivamente (*test t* = 2,608; *p*=0,0016 e *test t* = 7,83; *p*<0,0001). O comportamento do grupo “receptor” era diferentemente significativo ao grupo controle (*test t* = 5,90; *p*=0,0002). De maneira geral, houve diferença significativa em todas os grupos ($F_{(2,515)} = 30,05$; *p*<0,0001) (Figura 29B).

Os peixes do grupo “receptor” estavam menos polarizados em relação ao grupo “emissor” durante as tentativas de condicionamento usando o estímulo luz vermelha (*test t* = 4,51, *p*=0,0002), e mais polarizados em relação ao grupo controle (*test t* = 7,61, *p*<0,0001). Houve diferença significativa entre todos os grupos de peixes ($F_{(2,51)} = 141,5$; *p*<0,0001) (Figura 29C). Observa-se uma mudança significativa no comportamento dos peixes do grupo “receptor” durante todas as tentativas (Figura 29D), tendo diferença entre a tentativa inicial a última tentativa dessa experiência (*test t* = 3,260; *p*=0,0014); e com mudança comportamental durante em relação a todas as tentativas estimuladas pela transferência da informação ($F_{(21,32)} = 198,4$; *p*<0,0001).

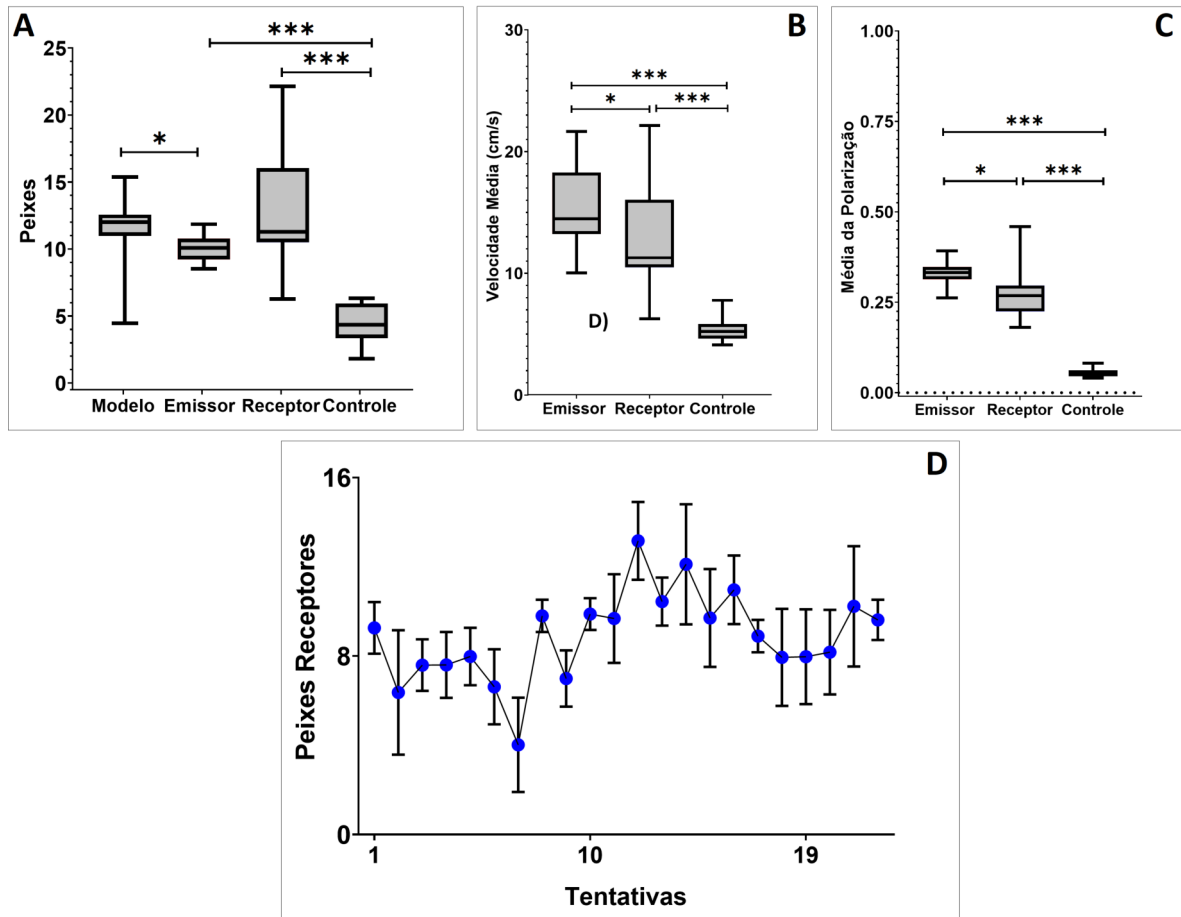


Figura 29 – Desempenho comportamental da transferência de informação aquário-aquário sem restrição, usando estímulo LED vermelho. A) Número de peixes que estiveram no comportamento alimentar durante o estímulo aceso. B) Velocidade média dos peixes dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. C) Média de polarização dos grupos “emissor”, “receptor” e controle. D) Quantidade de peixes receptores durante o estímulo luminoso em todas as tentativas. As linhas horizontais de cada grupo denota a média $\pm$ DP e os asteriscos sobre os colchetes indicam diferença estatística em comparação com aos grupos de peixes e as tentativas e o grupo controle por teste *t student* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)

Na maioria das tentativas, a intensidade da transmissão da informação do aquário “emissor” para o “receptor” foi com a intensidade média (59%)(Figura 30A), havendo *feedback* em 22,72% das tentativas (Figura 30B)), estabelecendo uma informação fechada entre os dois aquários. Observa-se também, que a medida em que o experimento foi sendo estabelecido, o comportamento dos peixes foram semelhante ao do grupo “emissor”, com variação dos *Z-score* obtendo uma correlação entre a mensagem recebida e a resposta enviada de $r = -0,51$. Se houvessem mais tentativas experimentais, o desempenho comportamental, dos peixes “receptores” da informação, poderia aumentar gradativamente, possuindo uma tendencia nos padrões comportamentais do grupo “emissor”.

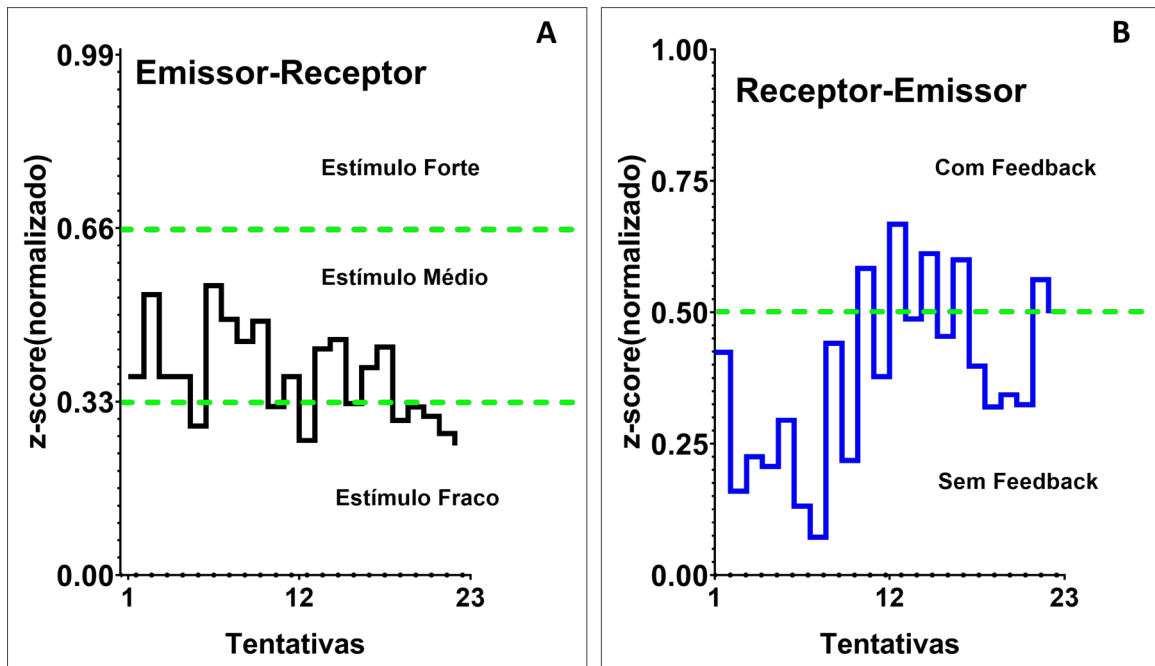


Figura 30 – Taxas da transferência de informação aquário-aquário sem restrição usando estímulo LED vermelho. A) Quantidade de informação modelada por Z -score das tentativas acionadas para envio da informação do grupo emissor-receptor. B) Quantidade da informação modelada por Z -score para *feedback* do grupo receptor-emissor.

4.3.4 Informação Bilateral

A qualidade da informação transmitida aos peixes do grupo “receptor” era baseada no comportamento extraído do grupo “emissor” e, também, a liberação das restrições. Observa-se que uma informação desavisada comprometeu o desempenho dos peixes receptores, e a medida que as restrições foram liberadas como alternativas ou foram excluídas, os peixes conseguiram obter bons desempenhos durante as tentativas. Em todas as experiências com restrições ou não, o desempenho dos peixes foi de 92,4% para o grupo “emissor” e 17,17% para o grupo “receptor”. Os peixes começaram a associar o estímulo ao período alimentar quando tiveram uma pista sobre a informação adicionada ao tanque (período sem restrições), onde obtiveram precisão de 63,63% de acertos, como mostrado na Figura 31.

Para verificar a existência de uma relação de causalidade entre o comportamento dos peixes dos grupos “emissor” e “receptor”, foi usado o teste de causalidade proposto por Granger. Logo, foi verificado se as intenções do grupo “receptor” não foram influenciadas no grupo “emissor”. Para essa análise, foi calculado o centro de massa dos peixes, em todos os quadros dos vídeos, em todas as tentativas, pegando a posição espacial do centro (X,Y); nesse caso, usou-se apenas a posição espacial (X) em uma dimensão do grupo “emissor” e “receptor”. Além disso, foi calculada a distância do centro de massa em relação

ao compartimento alimentar, a fim de saber se os peixes estavam se deslocando com a mesma intensidade entre os dois grupos ou se possuíam algum reflexo de aprendizagem em comum.

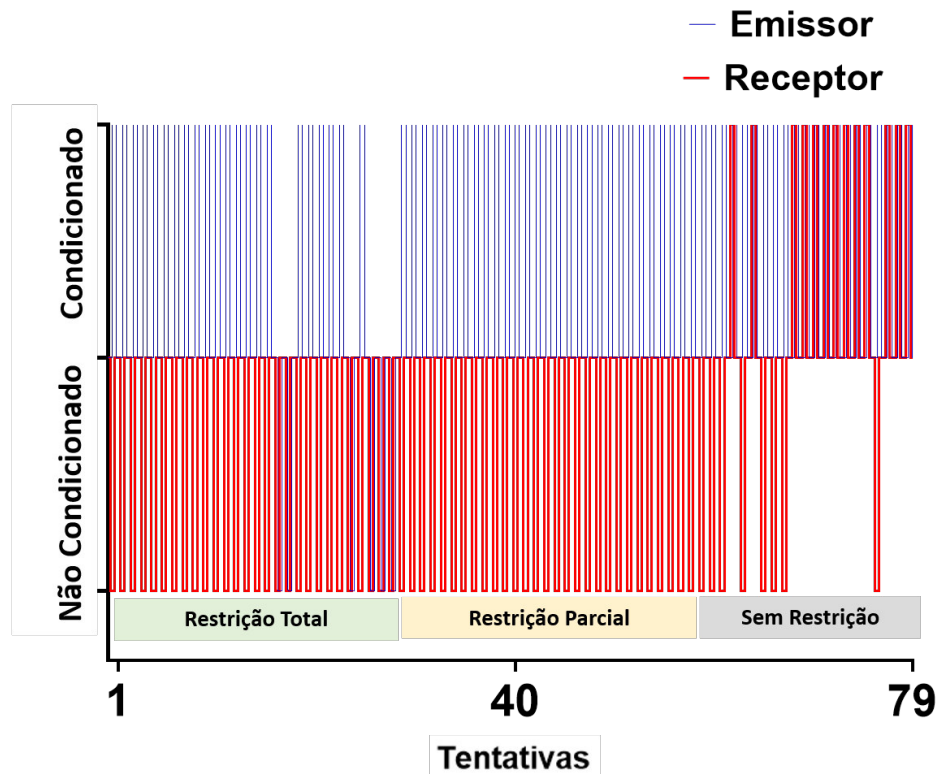


Figura 31 – Amostra da escolha de tentativa emissor-receptor durante a execução da tarefa experimental. O desempenho dos peixes do grupo “emissor” é representado por uma linha azul, enquanto uma linha vermelha indica as escolhas dos peixes do grupo “receptor” nas mesmas tentativas. Nos ensaios entre 67-74 e 76-79, a resposta comportamental do grupo “receptor” correspondeu as intensões do grupo “emissor”, sendo classificado pela rede neural de comportamento condicionado. O melhor desempenho foi alcançado no período sem restrição, obtendo 63,63% de acerto.

Verifica-se, com base na Tabela 4 e Tabela 5, que a Hipótese nula (H_0), “emissor não causa receptor”, com uma defasagem (*Lag*) é aceita na maioria das análises, pois o resultado da estatística X^2 é superior ao valor da distribuição. Assim, pode-se inferir que valores com uma defasagem do grupo “emissor”, nas tentativas totais, restrição total e restrição parcial, não contêm informações suficientes para prever as variações no comportamento do grupo “receptor”, porém, não é estendida na *Lag* 2. No entanto, ao analisar, apenas o período sem restrição, observa-se que a hipótese nula é rejeitada; ou seja, estatisticamente, os peixes do grupo “emissor” conseguiram controlar o comportamento dos peixes do grupo “receptor”, que tiveram seu comportamento replicado.

Os peixes do grupo “receptor” se deslocaram em direção ao espaço alimentar na mesma proporção ao grupo “emissor”, mas apenas quando o treinamento não teve restrição,

Tabela 4 – Análise de causalidade entre os grupos Emissor e Receptor usando o centro de massa

Centro de massa (X)	Lag 1		Lag 2	
	X ²	p-value	X ²	p-value
Todas as tentativas	0,2767	0,5989	5,6145	0,0603
Restrição Total	1,7573	0,185	6,8918	0,0319
Restrição Parcial	0,0512	0,8211	2,3657	0,3064
Sem Restrição	38,67	p<0,0001	30,3597	p<0,0001

*X² = Qui – quadrado

invalidando a hipótese nula. Dessa forma, observa-se que a hipótese nula é rejeitada; ou seja, estatisticamente, os peixes do grupo “receptor” conseguiram mudar seu comportamento na mesma intensidade do grupo “emissor” quando as restrições foram liberadas.

Tabela 5 – Análise de causalidade entre os grupos Emissor e Receptor da distância entre o centro de massa e a área alimentar.

Distância	Lag 1		Lag 2	
	X ²	p-value	X ²	p-value
Todas as tentativas	0,3891	0,5328	10,8016	0,0045
Restrição Total	2,5128	0,1129	11,5912	0,003
Restrição Parcial	0,1169	0,7324	0,4945	0,781
Sem Restrição	28,6904	p<0,0001	26,1224	p<0,0001

Na Figura 32(AB), está apresentada a relação da localização do centro de massa de peixe e da distância do centro em relação à área alimentar, no período estimulado, em toda as tentativas. Além disso, apresentada a relação da localização do centro de massa dos peixe dos grupos “emissor” e “receptor” no período estimulado e da distância do centro em relação à área alimentar, em toda as tentativas pelas experiências: restrição total (BC), restrição parcial (EF) e sem restrição (GH).

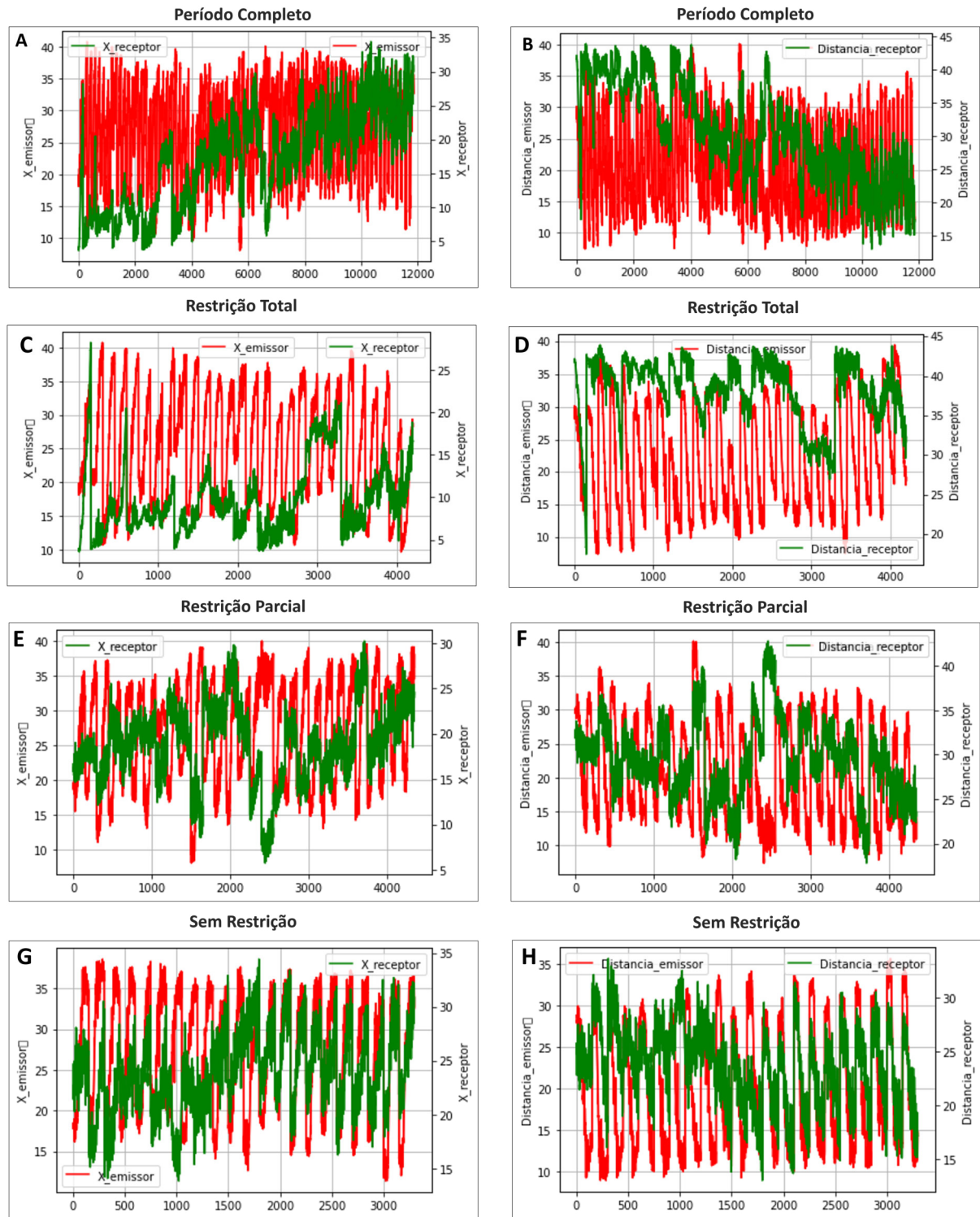


Figura 32 – Relação da localização do centro de massa de peixe e da distância do centro em relação a área alimentar, no período estimulado, pelas experiências: restrição total (AB), restrição parcial (CD) e sem restrições (EF).

4.3.4.1 Rede de Interação entre *zebrafish*

Na Figura 33, apresenta os mapas de calor das tentativas 1 (restrição total Figura 33A), tentativa 29 (restrição parcial Figura 33B) e tentativa 74 (sem restrição Figura 33C).

do treinamento luminoso da cor vermelha (lado direito do aquário). Observa-se pelo mapa de calor, criado com base na posição espacial dos peixes, no período estimulado, mostra a intensão dos peixes durante as tentativas. Dessa maneira, os peixes do grupo "emissor", na sua maioria, deslocaram-se para o lado direito do aquário a espera de alimento. No entanto, os peixes do grupo "receptor" não se deslocaram corretamente em todas as tentativas, mas nas últimas tentativas, seu comportamento começou a ser semelhante ao grupo "emissor".

Para avaliar o processamento da informação distribuída entre os peixes no tanque do grupo "emissor" e "receptor", usou-se a informação mútua, da diferença do ângulo da cabeça do peixe durante o movimento entre os quadros. Na figura 34 está apresentada a dinâmica comportamental do cardume (restrição total, Figura 34A), tentativa 29 (restrição parcial Figura 34B) e tentativa 74 (sem restrição, Figura 34C) do treinamento luminoso da cor vermelha, a seta entre os nós indica que o peixe desencadeou uma mudança locomotora, e a espessura dessa seta é o valor da medida da informação mútua entre um par de peixes, medida pela frequência das interações entre os peixes. Dessa forma, os peixes mais ativos influenciavam o comportamento dos peixes menos ativos.

Observa-se que os peixes do grupo "emissor" interagem mais entre eles durante as atividades na tentativa 1 (34A), do que os peixes do grupo "receptor", que possuía pouca interação de comunicação. Interessantemente, nas últimas tentativas, ambos os grupos "emissor" e "receptor" obtiveram boas interações de comunicação interna ao aquário, entre a maioria dos peixes. Mostrando que o comportamento do grupo "emissor" foi replicado no tanque do grupo "receptor" (34C).

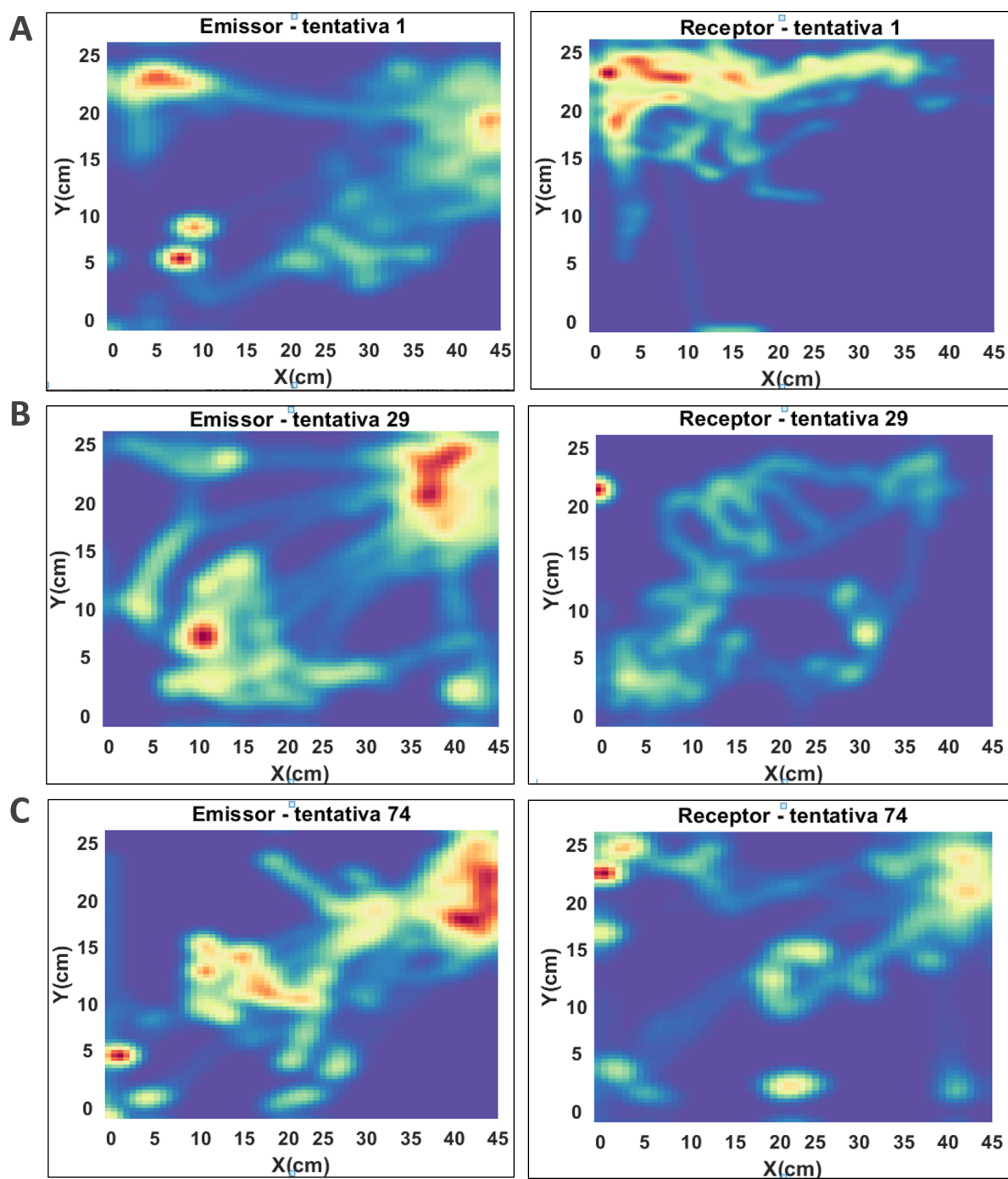


Figura 33 – Mapa de calor do cardume de *zebrafish* durante as tentativas. A) Mapa de calor das tentativas 1 (restrição total), B) tentativa 29 (restrição parcial) e, C) tentativa 74 (sem restrição) do treinamento luminoso da cor vermelha.

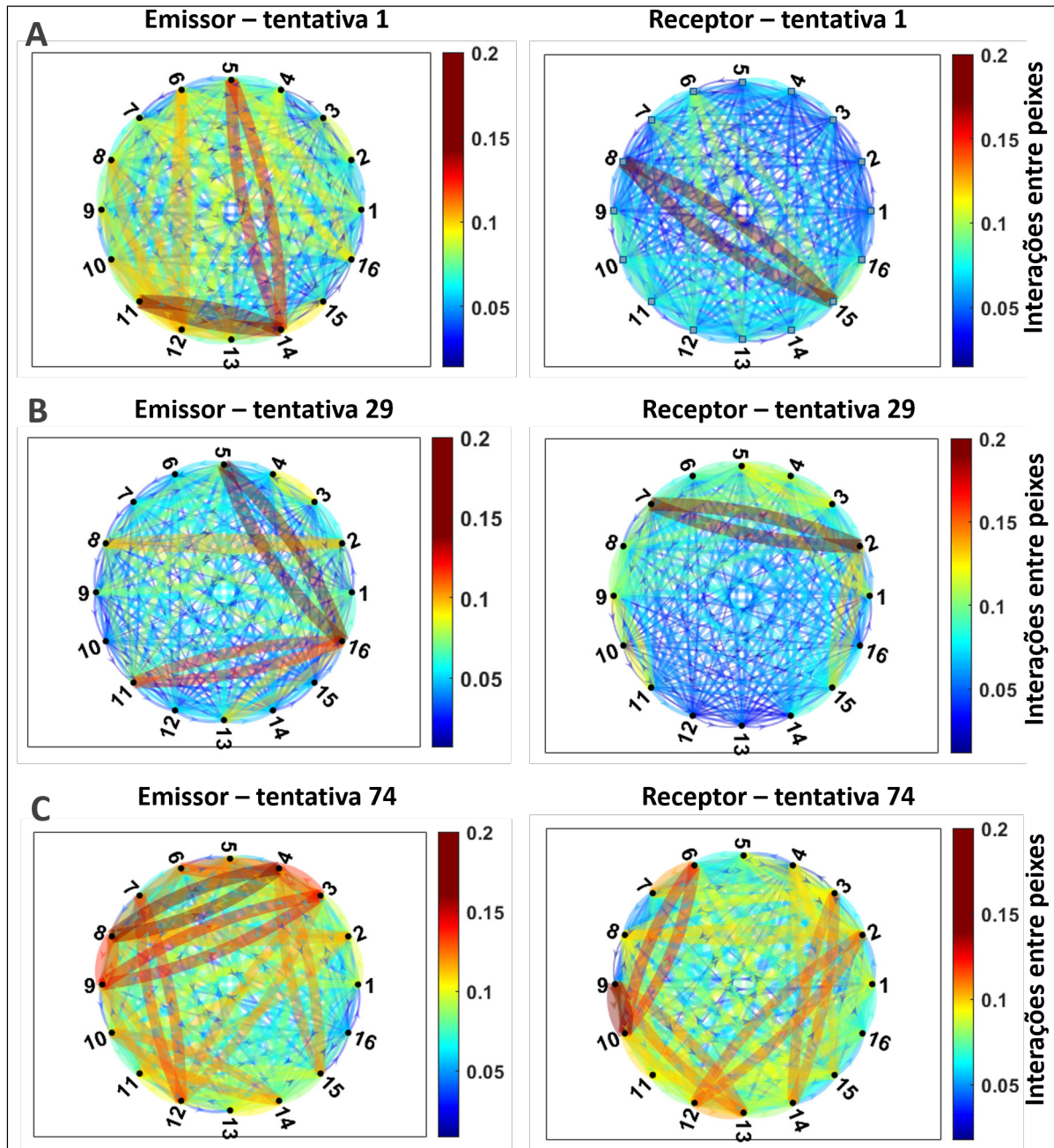


Figura 34 – Rede de interações de cardume de *zebrafish*. A informação mútua foi medida a partir da diferença do ângulo da cabeça do peixe durante o movimento no vídeo, A) nas tentativas 1 (restrição total), B) tentativa 29 (restrição parcial) e, C) tentativa 74 (sem restrição). Duas setas conectam dois peixes durante uma a atividade locomotora, sendo a resposta da influência de um peixe para outro peixe alvo. A espessura da linha representa a frequência das interações.

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo, desenvolveu-se um canal de comunicação baseado em inteligência artificial, a fim de transmitir informações comportamentais de um grupo de *zebrafish*, denominado “emissor”, a outro grupo de *zebrafish*, denominado de “receptor”. Nesse sistema, o fluxo de informação era controlado, obtendo uma avaliação comportamental simultânea, totalmente automático, para medir a quantidade de informações enviada e a resposta do recebimento da informação. Essa abordagem é uma analogia da transferência de informação direta entre cérebros de Pais-Vieira et al. (2013) que conseguiu implementar um canal de comunicação para enviar informações de um cérebro a outro cérebro de ratos acordados.

O ambiente entregava automaticamente os estímulos e a comida durante uma tarefa de condicionamento de *zebrafish*. Além disso, o algoritmo desenvolvido verificou os vídeos capturados da tarefa estabelecida, analisando os peixes individualmente e em grupos, apresentando uma avaliação da dinâmica comportamental dos peixes condicionados e, gerando uma informações baseado em intensidade de comportamento dos peixes emissores para ser enviada aos peixes receptores. Apesar de haver alguns sistemas automáticos de condicionamento de *zebrafish* (PARKER et al., 2012; PARKER et al., 2013; DOYLE et al., 2017; MANABE; DOOLING; TAKAKU, 2013c; CERUTTI; JOZEFOWIEZ; STADDON, 2013), o presente estudo demonstra pela primeira vez a possibilidade de sincronizar uma informação de modo fechado entre aquários, assim, informações foram extraídas em tempo real durante uma atividade condicionada de um grupo de peixes e enviada a outro grupo de peixes que ainda não tinha sido estimulado. A operação desse canal de comunicação permitiu que um grupo de peixes controlasse a rotina comportamental de outro grupo, recebendo uma *feedback* alimentar como resposta de sucesso.

Antes de sincronizar a transferência de informação entre aquários, um modelo padrão de comportamento foi adotado com um condicionamento prévio bem-sucedido para duas atividades, luminosa e sonora. Os padrões do comportamento de cada atividade eram comparados com os dados do teste modelo, refletindo na qualidade da informação enviada ao aquário “receptor”, durante as tentativas experimentais. Com isso, a detecção e o rastreamento foram ajustados para obter informações precisas da movimentação dos peixes ao longo das tentativas. Todos os algoritmos foram testados para garantir a qualidade da informação transmitida, o desempenho do algoritmo de rastreamento está disponível em Barreiros et al. (2021).

A informação foi alcançada usando informações coletadas dos peixes condicionados, naquele instante, mostrando que a informação não foi gerada aleatoriamente, mas proporcionalmente ao comportamento de acordo com as tentativas executadas. Assim, três pontos da função de transferência (*Z-score* normalizado, definido com base no teste

modelo) foram obtidas para enviar níveis de intensidade de estímulos, e a resposta do grupo “receptor” foi comparada com a informação transmitida. Assim, descobriu-se que durante as tentativas sem restrições, os peixes receptores da informação responderam com intenções semelhantes aos peixes emissores da informação, detectado pela rede neural CNNLSTM desenvolvida para avaliar o comportamento dos peixes, sugerindo um comportamento similar ao executar uma atividade.

Após o processamento dos dados, os resultados demonstram que o *zebrafish* aprendeu rapidamente no condicionamento luminoso com LED vermelho, onde fez uma associação eficaz entre um estímulo luminoso condicionado com uma recompensa alimentar. Dessa maneira, o *zebrafish* do grupo “emissor” foi capaz de aprender nas primeiras tentativas experimentais de condicionamento apetitoso. No entanto, outra pesquisa com aparatos semelhantes demonstrou que o *zebrafish* aprendia com pelo menos cinco tentativas diárias para de treinamento (DOYLE et al., 2017). Na avaliação mais complexa, os *zebrafish* encontraram dificuldades em algumas tentativas com o estímulo *vibracall* durante a associação do estímulo acionado ao compartimento correspondente. No entanto, obteve sucesso ao relacionar o estímulo com LED vermelho. Os estudos mostram que *zebrafish* é capaz de diferenciar cores (AVDESH et al., 2012; SPENCE; SMITH, 2008; ROY et al., 2019), e outros, o *zebrafish* consegue aprender adequadamente com estímulos de luz LED.

Estudos anteriores mostraram que os *zebrafish* podem formar associações duplas (estímulo e ambiente). Nisso, o peixe pode associar tanto entre o tempo de estímulos acionado e uma recompensa alimentar quanto entre a recompensa e sua localização (DOYLE et al., 2017; BRAUBACH et al., 2009). Dessa maneira, dividiu-se a área do aquário, sendo as áreas consideradas para o condicionamento (direita e esquerda). Esta estratégia foi usada para evitar o viés na análise dos resultados. Além disso, foi estabelecida três estratégias de avaliação do comportamento dos peixes, onde possuía restrições que considerava um comportamento condicionado com o mínimo de viés. Assim, foi demonstrado nessas análises que os *zebrafish* pertencentes ao grupo “receptor” conseguiram associar a informação recebida no aquário com semelhança ao grupo “emissor” quando as restrições foram liberadas. Com isso, ainda não está totalmente claro se o *zebrafish* formou um mapa cognitivo do ambiente ou apenas formou associações entre um espaço delimitado para alimentação (como por exemplo, a área do compartimento alimentar) e a localização do alimentador. Porém, houve uma semelhança significativa do comportamento entre os grupos distintos, principalmente, com a utilização contínua da transferência da informação sem restrições.

Apesar das restrições totais e parciais não terem tido respostas significativa de comunicação fechada, ou seja, não houve envio de *feedback* ao aquário controlador da informação, esses estudos serviram para avaliar se uma informação enviada de maneira desavisada poderia ser interpretada com as mesmas intenções do emissor da informação.

Ao que indica, uma informação é respondida com maior intensidade se o receptor souber um mínimo possível da utilização da informação. Nesse caso, os peixes receberam a informação mas não sabia que seguindo o estímulo poderia ganhar recompensa alimentar. No entanto, no momento em que as pistas alimentares foram enviadas, em seguida a fase de transferência da informação, os peixes observaram que em um determinado local poderia haver alimento seguinte ao estímulo.

Observou-se também, que o grupo de *zebrafish* que recebia o estímulo associativo possuía polaridade maior em relação ao grupo controle, assim, os peixes receptores foram ajustando seu comportamento ao longo das tentativas. Quando os peixes começaram a associar o estímulo, seu comportamento era mais agitado durante o estímulo ligado e rapidamente se dirigia para a área de condicionamento alimentar e, por isso, a coordenação de movimento em grupo era mais firme. Apesar de o *zebrafish* apresentar distribuições de polarização diferentes para cada tentativa, esses grupos podem se organizar como “cardumes”, que são apenas agregados de indivíduos, ou “escolas”, onde os agregados de indivíduos possuem um movimento sincronizado e altamente polarizado (MILLER; GERLAI, 2012). Outras características do movimento do grupo de peixes podem variar entre cardumes e escolas, sendo que a escola de *zebrafish* é mais rápida e menos densa em comparação ao cardume de *zebrafish*.

Ao analisar a dinâmica da rede de interação entre os peixes durante o condicionamento, percebeu-se que o estímulo deixava os peixes mais agitados e, conseqüentemente, trocavam mais informações, influenciando na dinâmica dos movimentos da escola de peixe. Dessa forma, percebeu-se que os peixes mais ativos influenciam na mudança do comportamento dos peixes menos ativos. E que grupo maiores de peixes pareciam estar mais estáveis na mudança do comportamento. Além disso, observou uma similaridade de interação entre os peixes dos grupos “emissores” e “receptores”, durante a estratégia sem restrições. Observa-se também, que os peixes obtiveram 63,63% de respostas assertivas durante a fase sem restrições, tendo fluxo de *feedback* em 22,72% de tentativas. Ainda nessa análise, observou-se pelo método de causalidade de Granger, que o comportamento dos peixes emissores influenciou o comportamento dos peixes receptores.

De modo geral, demonstrou-se que é possível transmitir de maneira não invasiva, uma informação comportamental de um grupo de *zebrafish* para outro grupo de *zebrafish* localizados em outro compartimento, obtendo respostas semelhantes. No entanto, ainda não está claro como as informações precisas chegam ao cérebro para uma interação simultânea com o mínimo de pistas aos cérebros receptores. Estudos anteriores, baseados em transferências de informações direta entre cérebros, demonstraram que é possível compartilhar uma informação entre animais (PAIS-VIEIRA et al., 2013; PAIS-VIEIRA et al., 2015; RAMAKRISHNAN et al., 2015) e entre pessoas para uma tarefa comportamental (GRAU et al., 2014; STOCCO et al., 2015; RAO; STOCCO, 2014; LEE et al., 2017;

MASHAT; LI; ZHANG, 2017), porém, essas informações foram rodeadas de pistas para uma tomada de decisão. No entanto, quando a informação foi de maneira desavisada, os animais criaram comportamentos simples por impulsos (YOO et al., 2004), e em outros casos, houve movimentos involuntários dos animais e não controlados (KOO et al., 2017). Em humanos, experiências com pares de cérebros conseguiram responder um questionário (STOCCO et al., 2015; RAO; STOCCO, 2014) ou jogar um jogo de comportador (RAO; STOCCO, 2014), mas não houve uma progressão contínua das respostas, porém com resultados alternados ou aleatórios.

Por fim, nesse trabalho, os resultados descritos aqui mostram a capacidade do canal de comunicação, que envia quantidades precisas de informação. No entanto, esse sistema vai além da transferência da informação; usado também para um monitoramento automatizado de *zebrafish*, oferecendo vantagens para uma análise comportamental mais precisa em relação aos sistemas manuais, garantindo um trabalho mais controlado e sem intervenção humana. O sistema proposto pôde avaliar claramente o interesse e a dinâmica comportamental de peixes individualmente e organizados em grupos. Assim, o sistema proposto aqui, permite o monitoramento de peixes em movimentos condicionados e livres, reduzindo a invasividade humana na pesquisa. Além disso, é um sistema totalmente automático que pode ser ajustado conforme um determinado protocolo escolhido. Pois, algumas ferramentas de controle automático podem ser limitadas a experimentos e não ajustável para outras experiências. Nesse sistema, pode-se ajustar para várias experiências como avaliar o comportamento por toxicidade, sono, aprendizado por aversão e vários outros comportamentos dos peixes que demandam o processamento de vídeo.

Acredita-se que esse estudo é importante para avançar a pesquisa sobre transferência de informação. Além disso, essa proposta é uma novidade e usa tecnologias atuais, suficientes para enviar informações e controlar as informações recebidas. Como as tecnologias não invasivas são atualmente mais simples e mais seguras, essa proposta têm uma gama potencialmente mais ampla de aplicabilidade, podendo ser testada a outras espécies de animais.

6 TRABALHOS FUTURO

Ao todo, os resultados que foram descritos anteriormente indicam que o canal de comunicação possui capacidade de transferir informações comportamentais de um grupo de peixes para outro grupo, possuindo assim, uma quantidade e uma precisão na informação durante o processo de transferência. Por isso, esta tese possui muitas perspectivas para trabalhos futuros, bem como novos testes, mais melhorias na técnica e novas discussões sobre o uso do canal de comunicação.

Para o trabalho futuro, é possível incluir um estímulo adicional na tarefa experimental, a fim de que os peixes receptores da informação passam a ser guiados por esse estímulo decisório. Nessa abordagem, o terceiro estímulo poderia definir para onde os peixes poderá seguir, dando uma nova visão sobre análise do comportamento dos peixes após o recebimento da informação.

Além disso, outra proposta será disponibilizar um software para análise comportamental dos *zebrafish* com base nos algoritmos já desenvolvido. Todos os algoritmos desenvolvidos podem ser usados de maneira única, ajudando na análise do comportamento dos peixes durante uma atividade comportamental. Disponibilizar uma ferramenta que integra todos os algoritmos poderá ajudar demais pesquisadores que trabalham com comportamento de *zebrafish*. Até o momento, esta ideia está sendo estabelecida e uma plataforma estará disponível em breve em <https://ztracker-ai.vercel.app/>.

Além disso, pode-se usar novas tecnologias não invasivas para transferir de informações de um-para-muitos ou muitos-para-um, em que um sinal de um único grupo de peixes emissores fosse transmitido para vários grupos receptores, ou vários grupos emissores enviando sinais para o mesmo grupo receptor. Dessa forma, o comportamento dos peixes poderão ser avaliados sob novas perspectivas, entendendo como a transferência de informação pode influenciar vários grupos distintos e um único grupo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese, apresentou-se o desenvolvimento de um canal de comunicação baseada em inteligência artificial. Esse canal, extraiu informações comportamentais de um grupo de peixes transmitiu essas informações para outro grupo de peixes. O fluxo da informação foi controlado à medida que os peixes emissores da informação foram executando uma atividade condicionada. O método foi eficaz para entregar e controlar informações durante uma atividade com ciclo fechado de comunicação.

Os resultados mostraram que os peixes não respondem uma informação totalmente desavisada, mas que algumas pistas são suficientes para desencadear um aprendizado associativo. Além disso, foi observado que o comportamento de um grupo de peixes pôde ser controlado por outro grupo de peixes em uma comunicação fechada.

Percebeu-se uma diferença de aprendizagem em relação aos estímulos luz de LED vermelha e *vibracall*, onde os peixes aprenderam mais facilmente quando eram estimulados pela luz. Peixes condicionados apresentaram alta polarização em relação aos peixes não estimulados. E, a medida que os peixes foram aprendendo no processo de transferência da informação, os peixes foram ajustando sua comunicação interna, criando uma rede de comunicação mais intensa.

Acredita-se que a metodologia utilizada neste trabalho servirá para avançar a pesquisa sobre transferência de informação. Além disso, essa proposta é uma novidade e usa tecnologias atuais, podendo ser ajustadas para novas experiências. E, por ser uma tecnologia não invasivas, essa proposta têm potencial para mais aplicabilidades, podendo ser testada a outras espécies de animais.

REFERÊNCIAS

- AKHTARI, M. et al. Conductivities of three-layer live human skull. *Brain topography*, Springer, v. 14, n. 3, p. 151–167, 2002. Citado na página 31.
- AL-IMARI, L.; GERLAI, R. Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (danio rerio). *Behavioural brain research*, Elsevier, v. 189, n. 1, p. 216–219, 2008. Citado na página 44.
- AMIRI, S.; FAZEL-REZAI, R.; ASADPOUR, V. A review of hybrid brain-computer interface systems. *Advances in Human-Computer Interaction*, Hindawi Publishing Corp., v. 2013, p. 1, 2013. Citado na página 31.
- AVDESH, A. et al. Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 28, n. 2, p. 459–469, 2012. Citado 5 vezes nas páginas 43, 44, 45, 68 e 107.
- AZEVEDO, L. P. D. *APLICAÇÃO DE REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS NO PROCESSO DE CLASSIFICAÇÃO DE ORQUÍDEAS DO GÊNERO CATTLEYA*. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso) — Instituto Federal de Minas Gerais, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 48.
- B., J. S. W. Pavlov's reflex before pavlov: Early accounts from the english, french and german classic literature. *European Neurology*, v. 77, p. 322–326, 2017. Citado na página 42.
- BAI, Y.-X. et al. Automatic multiple zebrafish tracking based on improved hog features. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 1, p. 10884, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 45 e 46.
- BAKER, M. R.; WONG, R. Y. Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. *Scientific Reports*, v. 9, n. 9935, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 45.
- BARREIROS, M. et al. Zebrafish tracking using yolov2 and kalman filter. *Scientific Reports*, v. 11, 2021. Citado na página 106.
- BERES, A. M. Time is of the essence: A review of electroencephalography (eeg) and event-related brain potentials (erps) in language research. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, v. 42, n. 4, p. 247–255, Dec 2017. ISSN 1573-3270. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10484-017-9371-3>>. Citado na página 34.
- BHANDIWAD, A. A. et al. Auditory sensitivity of larval zebrafish (danio rerio) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *Journal of Experimental Biology*, The Company of Biologists Ltd, v. 216, n. 18, p. 3504–3513, 2013. Citado na página 44.
- BHAT, A.; GREULICH, M. M.; MARTINS, E. P. Behavioral plasticity in response to environmental manipulation among zebrafish (danio rerio) populations. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 10, n. 4, p. 1–13, 04 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125097>>. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 80.

- BILOTTA, J. et al. Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. *Zebrafish*, Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, v. 2, n. 4, p. 259–268, 2005. Citado na página 44.
- BLAKELY, T. et al. Robust, long-term control of an electrocorticographic brain-computer interface with fixed parameters. *Neurosurgical focus*, American Association of Neurological Surgeons, v. 27, n. 1, p. E13, 2009. Citado na página 33.
- BLANK, M. et al. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an nmda-dependent long-term memory. *Neurobiology of learning and memory*, Elsevier, v. 92, n. 4, p. 529–534, 2009. Citado na página 44.
- BLASER, R.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (danio rerio). *Behavioural brain research*, Elsevier, v. 208, n. 1, p. 56–62, 2010. Citado na página 44.
- BOOK, D. L. *O Que São Redes Neurais Artificiais Profundas ou Deep Learning?* 2020. Disponível em: <<http://deeplearningbook.com.br/o-que-sao-redes-neurais-artificiais-profundas/>>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 57.
- BRAUBACH, O. R. et al. Olfactory conditioning in the zebrafish (danio rerio). *Behavioural brain research*, Elsevier, v. 198, n. 1, p. 190–198, 2009. Citado na página 107.
- BREMBS, B.; HEISENBERG, M. The operant and the classical in conditioned orientation of drosophila melanogaster at the flight simulator. *Learning & Memory*, Cold Spring Harbor Lab, v. 7, n. 2, p. 104–115, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.
- CERUTTI, D.; JOZEFOWIEZ, J.; STADDON, J. Rapid, accurate time estimation in zebrafish (danio rerio). *Behavioural Processes*, v. 99, p. 21–25, 2013. ISSN 0376-6357. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376635713001204>>. Citado na página 106.
- CERVI, A. L.; POLING, K. R.; HIGGS, D. M. Behavioral measure of frequency detection and discrimination in the zebrafish, danio rerio. *Zebrafish*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 45.
- CHACON, D. M.; LUCHIARI, A. C. A dose for the wiser is enough: The alcohol benefits for associative learning in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Elsevier, v. 53, p. 109–115, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 44.
- CHENG, Z. X. . X. E. Zebrafish tracking using convolutional neural networks. *Scientific Reports*, Nature, v. 7, n. 42815, p. 443–450, 2017. Citado na página 46.
- COLLINGER, J. L. et al. High-performance neuroprosthetic control by an individual with tetraplegia. *The Lancet*, Elsevier, v. 381, n. 9866, p. 557–564, 2013. Citado na página 33.
- COLWILL, R. M. et al. Visual discrimination learning in zebrafish (danio rerio). *Behavioural Processes*, Elsevier, v. 70, n. 1, p. 19–31, 2005. Citado na página 44.
- CROSATO, E. et al. Informative and misinformative interactions in a school of fish. *Swarm Intelligence*, v. 12, p. 283–305, 2018. Citado na página 80.

- CROSSON, B. et al. Functional imaging and related techniques: an introduction for rehabilitation researchers. *Journal of rehabilitation research and development*, NIH Public Access, v. 47, n. 2, p. vii, 2010. Citado na página 24.
- DATE, K.; NAGI, R. Gpu-accelerated hungarian algorithms for the linear assignment problem. *Parallel Comput.*, Elsevier Science Publishers B. V., NLD, v. 57, n. C, p. 52–72, set. 2016. ISSN 0167-8191. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parco.2016.05.012>>. Citado na página 77.
- DELCOURT, J. et al. Video multittracking of fish behaviour: a synthesis and future perspectives. *Fish and Fisheries*, Wiley Online Library, v. 14, n. 2, p. 186–204, 2013. Citado 3 vezes nas páginas 45, 46 e 47.
- DELCOURT, J. et al. Video tracking in the extreme: A new possibility for tracking nocturnal underwater transparent animals with fluorescent elastomer tags. *Behavior research methods*, Springer, v. 43, n. 2, p. 590, 2011. Citado na página 46.
- DING, C. et al. Req-yolo: A resource-aware, efficient quantization framework for object detection on fpgas. *Proceedings of the 2019 ACM/SIGDA International Symposium on Field-Programmable Gate Arrays*, 2019. Citado na página 59.
- DORIGO, M. et al. *Ant Colony Optimization and Swarm Intelligence: 5th International Workshop, ANTS 2006, Brussels, Belgium, September 4-7, 2006, Proceedings*. [S.l.]: Springer, 2006. v. 4150. Citado na página 45.
- DOYLE, J. M. et al. A simple automated system for appetitive conditioning of zebrafish in their home tanks. *Behavioural brain research*, Elsevier, v. 317, p. 444–452, 2017. Citado 3 vezes nas páginas 44, 106 e 107.
- EDWARDS, C. A. et al. Neurostimulation devices for the treatment of neurologic disorders. In: ELSEVIER. *Mayo Clinic Proceedings*. [S.l.], 2017. v. 92, n. 9, p. 1427–1444. Citado na página 24.
- ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, v. 4, n. 1, p. 21–40, 2007. Citado na página 43.
- FERNEDA, E. Redes neurais e sua aplicaÃ§Ã£o em sistemas de recuperaÃ§Ã£o de informaÃ§Ã£o. *CiÃda InformaÃ§Ã£o*, scielo, v. 35, p. 25 – 30, 04 2006. ISSN 0100-1965. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652006000100003&nrm=iso>. Citado na página 48.
- FERREIRA, A.; GIRALDI, G. Convolutional neural network approaches to granite tiles classification. *Expert Systems with Applications*, v. 84, n. 30, p. 1–11, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 58 e 59.
- GRANGER, C.; HUANG, L. Evaluation of panel data models: Some suggestions from time series. *Econometrics eJournal*, 1997. Citado na página 83.
- GRAU, C. et al. Conscious brain-to-brain communication in humans using non-invasive technologies. *PLoS One*, Public Library of Science, v. 9, n. 8, p. e105225, 2014. Citado 12 vezes nas páginas 23, 24, 25, 27, 31, 32, 35, 37, 40, 41, 108 e 109.

- Greff, K. et al. Lstm: A search space odyssey. *IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems*, v. 28, n. 10, p. 2222–2232, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 53 e 56.
- GRELLA, S. L.; KAPUR, N.; GERLAI, R. A y-maze choice task fails to detect alcohol avoidance oralcohol preference in zebrafish. *International Journal of Comparative Psychology*, v. 23, n. 1, 2010. Citado na página 44.
- HAYKIN, S. *Redes Neurais: Princípios e Prática*. Artmed, 2007. ISBN 9788577800865. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=bhMwDwAAQBAJ>>. Citado 8 vezes nas páginas 11, 47, 48, 49, 50, 51, 52 e 53.
- HOCHREITER, S.; SCHMIDHUBER, J. Long short-term memory. *Neural computation*, MIT Press, v. 9, n. 8, p. 1735–1780, 1997. Citado na página 53.
- HOCHREITER, S.; SCHMIDHUBER, J. Long short-term memory. *Neural Comput.*, MIT Press, Cambridge, MA, USA, v. 9, n. 8, p. 1735–1780, nov. 1997. ISSN 0899-7667. Disponível em: <<https://doi.org/10.1162/neco.1997.9.8.1735>>. Citado na página 54.
- HOY, K. E.; FITZGERALD, P. B. Brain stimulation in psychiatry and its effects on cognition. *Nature Reviews Neurology*, Nature Publishing Group, v. 6, n. 5, p. 267, 2010. Citado na página 34.
- IVARS, N. Deep Convolutional Neural Networks: Structure, Feature Extraction and Training. *Information Technology and Management Science*, v. 20, n. 1, p. 40–47, December 2017. Disponível em: <<https://ideas.repec.org/a/vrs/itmasc/v20y2017i1p40-47n7.html>>. Citado 3 vezes nas páginas 57, 58 e 59.
- JOHANNSEN, W. On semantic information in nature. *Information*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 6, n. 3, p. 411–431, 2015. Citado na página 42.
- KENNEDY, P. R. et al. Direct control of a computer from the human central nervous system. *IEEE Transactions on rehabilitation engineering*, IEEE, v. 8, n. 2, p. 198–202, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 30.
- KOO, B. et al. Manipulation of rat movement via nigrostriatal stimulation controlled by human visually evoked potentials. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 2340, 2017. Citado 7 vezes nas páginas 24, 28, 32, 36, 38, 39 e 109.
- KRUSIENSKI, D.; SHIH, J. Control of a brain–computer interface using stereotactic depth electrodes in and adjacent to the hippocampus. *Journal of neural engineering*, IOP Publishing, v. 8, n. 2, p. 025006, 2011. Citado na página 31.
- KÜBLER, A. et al. The thought translation device: a neurophysiological approach to communication in total motor paralysis. *Experimental brain research*, Springer, v. 124, n. 2, p. 223–232, 1999. Citado na página 30.
- KÜBLER, A. et al. Patients with als can use sensorimotor rhythms to operate a brain-computer interface. *Neurology*, AAN Enterprises, v. 64, n. 10, p. 1775–1777, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 30.
- LE et al. Application of long short-term memory (lstm) neural network for flood forecasting. *Water*, MDPI AG, v. 11, n. 7, p. 1387, Jul 2019. ISSN 2073-4441. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/w11071387>>. Citado 6 vezes nas páginas 12, 52, 53, 54, 55 e 56.

- LEE, W. et al. Non-invasive transmission of sensorimotor information in humans using an eeg/focused ultrasound brain-to-brain interface. *PloS one*, Public Library of Science, v. 12, n. 6, p. e0178476, 2017. Citado 10 vezes nas páginas 23, 24, 27, 32, 34, 35, 38, 39, 108 e 109.
- LI, G.; ZHANG, D. Brain-computer interface controlled cyborg: establishing a functional information transfer pathway from human brain to cockroach brain. *PloS one*, Public Library of Science, v. 11, n. 3, p. e0150667, 2016. Citado 6 vezes nas páginas 24, 28, 35, 36, 38 e 40.
- LIU, Z. et al. An efficient pedestrian detection method based on yolov2. *Mathematical Problems in Engineering*, v. 2018, p. 1–10, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 60.
- LOUZANO, J. P. de O. et al. Causalidade de granger do índice de desenvolvimento socioeconômico na gestão fiscal dos municípios brasileiros. In: . [S.l.: s.n.], 2019. Citado na página 83.
- LUCHIARI, A. C.; CHACON, D. M. M. Physical exercise improves learning in zebrafish, danio rerio. *Behavioural processes*, Elsevier, v. 100, p. 44–47, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 44.
- MANABE, K.; DOOLING, R.; TAKAKU, S. An automated device for appetitive conditioning in zebrafish (danio rerio). *Zebrafish*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 10, n. 4, p. 518–523, 2013. Citado na página 46.
- MANABE, K.; DOOLING, R.; TAKAKU, S. Differential reinforcement of an approach response in zebrafish (danio rerio). *Behavioural processes*, Elsevier, v. 98, p. 106–111, 2013. Citado na página 45.
- MANABE, K.; DOOLING, R.; TAKAKU, S. Differential reinforcement of an approach response in zebrafish (danio rerio). *Behavioural Processes*, v. 98, p. 106–111, 2013. ISSN 0376-6357. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376635713001113>>. Citado na página 106.
- MASHAT, M. E. M.; LI, G.; ZHANG, D. Human-to-human closed-loop control based on brain-to-brain interface and muscle-to-muscle interface. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 11001, 2017. Citado 7 vezes nas páginas 28, 35, 38, 40, 41, 108 e 109.
- MATHWORKS. *Long Short-Term Memory Networks*. 2020. Disponível em: <https://www.mathworks.com/help/deeplearning/ug/long-short-term-memory-networks.html#mw_15473789-539c-41e5-a790-8f132dd880e1>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 54.
- MELLINGER, J. et al. An meg-based brain-computer interface (bci). *Neuroimage*, Elsevier, v. 36, n. 3, p. 581–593, 2007. Citado na página 33.
- MILLER, N. et al. Both information and social cohesion determine collective decisions in animal groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Academy of Sciences, v. 110, n. 13, p. 5263–5268, 2013. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/110/13/5263>>. Citado na página 23.

- MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (danio rerio). *Behavioural brain research*, Elsevier, v. 184, n. 2, p. 157–166, 2007. Citado na página 46.
- MILLER, N.; GERLAI, R. From schooling to shoaling: Patterns of collective motion in zebrafish (danio rerio). *PLoS ONE*, v. 7, 2012. Citado na página 108.
- MIN, B.-K.; MARZELLI, M. J.; YOO, S.-S. Neuroimaging-based approaches in the brain–computer interface. *Trends in biotechnology*, Elsevier, v. 28, n. 11, p. 552–560, 2010. Citado 3 vezes nas páginas 23, 31 e 33.
- MULLER, K.-R.; BLANKERTZ, B. Toward noninvasive brain-computer interfaces. *IEEE Signal Processing Magazine*, IEEE, v. 23, n. 5, p. 128–126, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 30.
- MURUGAN, P. Feed forward and backward run in deep convolution neural network. *ArXiv*, abs/1711.03278, 2017. Citado 3 vezes nas páginas 12, 57 e 58.
- NAUMANN, E. A. et al. From whole-brain data to functional circuit models: The zebrafish optomotor response. *Cell*, v. 167, n. 3, p. 947–960, 2016. Citado na página 45.
- NEO, Y. Y. et al. Behavioral changes in response to sound exposure and no spatial avoidance of noisy conditions in captive zebrafish. *Frontiers in behavioral neuroscience*, Frontiers, v. 9, p. 28, 2015. Citado na página 44.
- NICOLAS-ALONSO, L. F.; GOMEZ-GIL, J. Brain computer interfaces, a review. *sensors*, Molecular Diversity Preservation International, v. 12, n. 2, p. 1211–1279, 2012. Citado na página 24.
- NICOLELIS, M. *Beyond Boundaries: The New Neuroscience of Connecting Brains with Machines—and How It Will Change Our Lives*. [S.l.]: Macmillan, 2011. Citado na página 32.
- NIIZATO, T. et al. Finding continuity and discontinuity in fish schools via integrated information theory. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 15, n. 2, p. 1–29, 02 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229573>>. Citado na página 80.
- NINKOVIC, J.; BALLY-CUIF, L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*, Elsevier, v. 39, n. 3, p. 262–274, 2006. Citado na página 44.
- NUNEZ, P. L.; SRINIVASAN, R. et al. *Electric fields of the brain: the neurophysics of EEG*. [S.l.]: Oxford University Press, USA, 2006. Citado na página 33.
- O'DOHERTY, J. E. et al. Virtual active touch using randomly patterned intracortical microstimulation. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, IEEE, v. 20, n. 1, p. 85–93, 2011. Citado na página 34.
- O'SHEA, J.; WALSH, V. Transcranial magnetic stimulation. *Current Biology*, Elsevier, v. 17, n. 6, p. R196–R199, 2007. Citado na página 34.
- OWOEYE, K.; MUSOLESI, M.; HAILES, S. Characterizing animal movement patterns across different scales and habitats using information theory. *bioRxiv*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2018. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/07/29/311241>>. Citado na página 80.

- PAIS-VIEIRA, M. et al. Building an organic computing device with multiple interconnected brains. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 5, p. 11869, 2015. Citado 9 vezes nas páginas 25, 27, 33, 36, 38, 39, 40, 41 e 108.
- PAIS-VIEIRA, M. et al. A brain-to-brain interface for real-time sharing of sensorimotor information. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 3, p. 1319, 2013. Citado 15 vezes nas páginas 11, 23, 24, 25, 26, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 106 e 108.
- PAPASPYROS, V. et al. Bidirectional interactions facilitate the integration of a robot into a shoal of zebrafish danio rerio. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 14, n. 8, p. 1–25, 08 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220559>>. Citado na página 80.
- PARKER, M. O. et al. Development and automation of a test of impulse control in zebrafish. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 7, 2013. Citado na página 106.
- PARKER, M. O. et al. Development and implementation of a three-choice serial reaction time task for zebrafish (danio rerio). *Behavioural Brain Research*, v. 227, n. 1, p. 73–80, 2012. ISSN 0166-4328. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432811007704>>. Citado na página 106.
- PATHER, S.; GERLAI, R. Shuttle box learning in zebrafish (danio rerio). *Behavioural brain research*, Elsevier, v. 196, n. 2, p. 323–327, 2009. Citado na página 44.
- PAVLOV, I. P. *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. [S.l.]: Translated and edited by Anrep, GV (Oxford University Press, London, 1927), 1927. Citado na página 42.
- PEITSARO, N. et al. Modulation of the histaminergic system and behaviour by α -fluoromethylhistidine in zebrafish. *Journal of neurochemistry*, Wiley Online Library, v. 86, n. 2, p. 432–441, 2003. Citado na página 44.
- PENHA, D. de P.; CASTRO, A. R. G. Convolutional neural network applied to the identification of residential equipment in non-intrusive load monitoring systems. In: *3rd International Conference on Artificial Intelligence and Applications*. [S.l.: s.n.], 2017. p. 11–21. Citado na página 57.
- PÉREZ-ESCUADERO, A. et al. idtracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nature methods*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 7, p. 743, 2014. Citado 3 vezes nas páginas 45, 46 e 47.
- PERLMUTTER, J. S.; MINK, J. W. Deep brain stimulation. *Annu. Rev. Neurosci.*, Annual Reviews, v. 29, p. 229–257, 2006. Citado na página 34.
- PHAM, J. et al. Automated scoring of fear-related behavior using ethovision software. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 178, n. 2, p. 323–326, 2009. Citado na página 46.
- QIAN, Z.-M.; CHENG, X. E.; CHEN, Y. Q. Automatically detect and track multiple fish swimming in shallow water with frequent occlusion. *PloS one*, Public Library of Science, v. 9, n. 9, p. e106506, 2014. Citado 4 vezes nas páginas 45, 46, 75 e 77.
- RAMADAN, R. A.; VASILAKOS, A. V. Brain computer interface: control signals review. *Neurocomputing*, Elsevier, v. 223, p. 26–44, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 30.

- RAMAKRISHNAN, A. et al. Computing arm movements with a monkey brainet. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 5, p. 10767, 2015. Citado 10 vezes nas páginas 23, 24, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 41 e 108.
- RAO, R. P.; STOCCO, A. When two brains connect. *Scientific American Mind*, JSTOR, v. 25, n. 6, p. 36–39, 2014. Citado 13 vezes nas páginas 23, 24, 25, 27, 28, 32, 34, 35, 37, 40, 41, 108 e 109.
- REDMON, J. et al. You only look once: Unified, real-time object detection. In: *2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. [S.l.: s.n.], 2016. p. 779–788. Citado 3 vezes nas páginas 12, 59 e 60.
- REDMON, J. et al. You only look once: Unified, real-time object detection. In: *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*. [S.l.: s.n.], 2016. p. 779–788. Citado na página 59.
- REDMON, J.; FARHADI, A. Yolo9000: Better, faster, stronger. In: *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. [S.l.: s.n.], 2017. p. 6517–6525. Citado na página 59.
- ROY, T. et al. Color preferences affect learning in zebrafish, danio rerio. *Scientific Reports*, v. 9, 2019. Citado 2 vezes nas páginas 68 e 107.
- SAK, H.; SENIOR, A. W.; BEAUFAYS, F. Long short-term memory based recurrent neural network architectures for large vocabulary speech recognition. *ArXiv*, abs/1402.1128, 2014. Citado na página 53.
- SCHMIDHUBER, J. Deep learning in neural networks: An overview. *Neural Networks*, v. 61, p. 85 – 117, 2015. ISSN 0893-6080. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0893608014002135>>. Citado na página 57.
- SERRA, E.; MEDALHA, C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (danio rerio) for a dark environment. *Brazilian journal of medical and biological research*, SciELO Brasil, v. 32, n. 12, p. 1551–1553, 1999. Citado na página 44.
- SERT, N. Percie du et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*, Public Library of Science, v. 18, p. 1–12, 2020. Citado na página 61.
- SHIH, J. J.; KRUSIENSKI, D. J.; WOLPAW, J. R. Brain-computer interfaces in medicine. In: ELSEVIER. *Mayo Clinic Proceedings*. [S.l.], 2012. v. 87, n. 3, p. 268–279. Citado 4 vezes nas páginas 11, 30, 31 e 33.
- SILVA, I. N. da; SPATTI, D. H.; FLAUZINO, R. A. *Redes Neurais Artificiais para engenharia e ciências aplicadas*. second. São Paulo: Artliber, 2016. v. 2. Citado 8 vezes nas páginas 11, 12, 47, 49, 50, 51, 52 e 53.
- SIMONYAN, K.; ZISSERMAN, A. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. *arXiv preprint arXiv:1409.1556*, 2014. Citado na página 70.
- SINGH, N.; SAIN, B. S. An improved convolutional neural network for classification of small patches of granite tiles. In: *2018 International Conference on Advances in Computing, Communication Control and Networking (ICACCCN)*. [S.l.: s.n.], 2018. p. 1125–1130. Citado na página 58.

- SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning in zebrafish (danio rerio) in the plus maze. *Behavioural brain research*, Elsevier, v. 207, n. 1, p. 99–104, 2010. Citado 4 vezes nas páginas 42, 43, 44 e 45.
- SKINNER, B. F. The behavior of organisms: an experimental analysis. *Skinner Foundation*, 1938. Citado na página 43.
- SOCOL, R. R. R. e C. R. *BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES*. São Paulo: Blucher, 2015. v. 1. Citado na página 80.
- SPENCE, R.; SMITH, C. Innate and learned colour preference in the zebrafish, danio rerio. *Ethology*, v. 114, n. 6, p. 582–588, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0310.2008.01515.x>>. Citado 2 vezes nas páginas 68 e 107.
- STOCCO, A. et al. Playing 20 questions with the mind: collaborative problem solving by humans using a brain-to-brain interface. *PloS one*, Public Library of Science, v. 10, n. 9, p. e0137303, 2015. Citado 9 vezes nas páginas 24, 28, 32, 35, 37, 40, 41, 108 e 109.
- VAUGHAN, T. M. et al. The wadsworth bci research and development program: at home with bci. *IEEE transactions on neural systems and rehabilitation engineering*, IEEE, v. 14, n. 2, p. 229–233, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 30.
- VENKATRAMAN, S.; CARMENA, J. M. Active sensing of target location encoded by cortical microstimulation. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, IEEE, v. 19, n. 3, p. 317–324, 2011. Citado na página 34.
- VIGNET MARIE-LAURE BÉGOUT, S. P. L. L. D. L. C.; COUSIN, X. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish*, v. 10, n. 3, 2013. Citado na página 45.
- WAGNER, T.; VALERO-CABRE, A.; PASCUAL-LEONE, A. Noninvasive human brain stimulation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Annual Reviews, v. 9, p. 527–565, 2007. Citado na página 31.
- WANDER, J. D.; RAO, R. P. Brain–computer interfaces: a powerful tool for scientific inquiry. *Current opinion in neurobiology*, Elsevier, v. 25, p. 70–75, 2014. Citado na página 32.
- WANG, S. H. et al. Automated planar tracking the waving bodies of multiple zebrafish swimming in shallow water. *PloS one*, Public Library of Science, v. 11, n. 4, p. e0154714, 2016. Citado 5 vezes nas páginas 45, 46, 47, 75 e 77.
- WILLIAMS, F. E.; WHITE, D.; JR, W. S. M. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behavioural Processes*, Elsevier, v. 58, n. 3, p. 125–132, 2002. Citado na página 44.
- YOO, S.-S. et al. Brain–computer interface using fmri: spatial navigation by thoughts. *Neuroreport*, LWW, v. 15, n. 10, p. 1591–1595, 2004. Citado 3 vezes nas páginas 24, 33 e 109.
- YOO, S.-S. et al. Non-invasive brain-to-brain interface (bbi): establishing functional links between two brains. *PloS one*, Public Library of Science, v. 8, n. 4, p. e60410, 2013. Citado 7 vezes nas páginas 23, 25, 27, 32, 35, 37 e 39.

ZEDDIES, D. G.; FAY, R. R. Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones. *Journal of Experimental Biology*, The Company of Biologists Ltd, v. 208, n. 7, p. 1363–1372, 2005. Citado na página 44.

ZHAO, X.; YAN, S.; GAO, Q. An algorithm for tracking multiple fish based on biological water quality monitoring. *IEEE Access*, v. 7, p. 15018–15026, 2019. Citado na página 73.

Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA

CIAEP: 01.0341.2014



Comissão de Ética no Uso de Animais

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **“AVALIAÇÃO DOS ESTÍMULOS CONDICIONADOS EM PEIXES PARA ENTENDER A INFLUÊNCIA DOS TREINAMENTOS NA TROCA DE INFORMAÇÃO DIRETA ENTRE CÉREBROS”** registrada com o nº **23115.006194/2018-01**, sob a responsabilidade de **ALLAN KARDEC DUAILIBE BARROS FILHO**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/04/2018 à 01/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Zebrafish (<i>danio rerio</i>)
Nº de animais	36
Peso/Idade	0,6g/4 a 6 meses
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	VIEIRA BRASIL DISTRIBUIDORA LTDA (TERRA ZOO) CNPJ: 06.256.879/0007-09 Av. Mário Andreazza 537, São Luís - MA. CEP: 65068-500

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
CIAEP: 02.0341.2019



Comissão de Ética no Uso de Animais

C E R T I F I C A D O

16/2020

Certificamos que a proposta intitulada: "INTERFACE NÃO INVASIVA PARA TRANSFERÊNCIA DE INFORMAÇÃO ENTRE GRUPOS DE ZEBRAFISH", Processo n. 23115.024712/2020-96, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Allan Kardec Duailibe Barros, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 09/10/2020.

We certify that the proposal: "NON-INVASIVE INTERFACE TO TRANSFER INFORMATION BETWEEN ZEBRAFISH GROUPS ", Process n. 23115.024712/2020-96, under the responsibility of Prof. Dr. Allan Kardec Duailibe Barros, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 10/09/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa **Área:** Neurociências

Vigência da Proposta: 12/11/2020 à 11/05/2021.

Origem Não aplicável a Biotério -
Vieira Brasil Distribuidora LTDA (TERRA ZOO)
CNPJ: 06.256.879/0007-09

Espécie

Peixes
(*Danio rerio*)

Sexo

Machos
Fêmeas

Amostra

32

Idade

4 a 6 meses

Peso

0,60g

Local do experimento: Laboratório para Processamento da Informação Biológica - Centro de Ciências Exatas e Tecnologias -CCET/UFMA.

São Luís, 11 de novembro de 2020.

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA



OPEN

Zebrafish tracking using YOLOv2 and Kalman filter

Marta de Oliveira Barreiros^{1✉}, Diego de Oliveira Dantas^{1,2}, Luís Claudio de Oliveira Silva^{1,2}, Sidarta Ribeiro³ & Allan Kardec Barros¹

Fish show rapid movements in various behavioral activities or associated with the presence of food. However, in periods of rapid movement, the rate at which occlusion occurs among the fish is quite high, causing inconsistency in the detection and tracking of fish, hindering the fish's identity and behavioral trajectory over a long period of time. Although some algorithms have been proposed to solve these problems, most of their applications were made in groups of fish that swim in shallow water and calm behavior, with few sudden movements. To solve these problems, a convolutional network of object recognition, YOLOv2, was used to delimit the region of the fish heads to optimize individual fish detection. In the tracking phase, the Kalman filter was used to estimate the best state of the fish's head position in each frame and, subsequently, the trajectories of each fish were connected among the frames. The results of the algorithm show adequate performances in the trajectories of groups of zebrafish that exhibited rapid movements.

Social and collective influence is a major challenge for contemporary science, being important for advances in several fields, such as in the organization and in the exchange of information¹. In groups of animals, behavior has been extensively studied to assess communication among members of the group and obtain a good performance of tasks together. In this sense, there is a growing interest among researchers to assess the collective behavior of animals in order to explain their cognitive evolution². Given this perspective, many researches were based on animal behavior, as well as the creation of bioinspired algorithms for solving optimization problems^{3,4} and behavioral assessment systems^{5–8}, employed in several areas of knowledge. Among the computer vision algorithms for assessing behavior, the methods for tracking objects are the most commonly used, as they allow a thorough assessment of the unexpected movements of different groups of animals, essential for the analysis of collective behavior^{9–17}.

Zebrafish (*Danio rerio*) are widely adopted as a study model in biology^{9–11,17–20}, their school of fish can represent different systems of communication and behavior. In addition, to study the individual behavior of fish in detail, tracking various objects is the most appropriate way. Most tracking systems are based on deep learning¹⁹, particle filters²¹, adaptive filters^{9,10} and others^{11–13,18,19,22}. However, to be able to track the behavior of fish for a long time, with minimal loss of identity throughout the frames, it is necessary to implement more complex systems that demand higher computational cost. Recently, a tracking system, idtracker.ai, was implemented with two convolutional networks simultaneously to improve the efficiency of animal tracking: one network used to detect when animals touch or cross each other, making the necessary correction, and another one to identify each animal. Thus, groups of zebrafish of up to 100 fish were tracked with an accuracy greater than 99.95%, in an environment with little noise².

Usually, the analysis is based on capturing frames in videos, processing the frame images for detection and tracking of the fish school. However, some technical problems are recurrent when the evaluation of the school of fish is done automatically, with a minimum of human interference. In this regard, many difficulties can be pointed out in data processing in the following steps: detection and tracking. In detection, it is common to have problems in the automatic identification of fish, and when the barycenter is used for detection, there may be limitations in detecting individuals completely; in addition, the failure to detect can exist in times of occlusion or when the visual structure of the fish changes with sudden movements in the tank. On the other hand, tracking, which is a detection-dependent step, can present difficulties over time, where tracking can be lost due to complex fish swimming, detection errors, trajectory fragmentation and, consequently, the loss of fish identity^{9,10}.

¹Department of Electrical Engineering, Laboratory for Biological Information Processing (PIB), Federal University of Maranhão (UFMA), Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga, São Luís, MA 65080-805, Brazil. ²Department of Computational Engineering, Federal University of Maranhão (UFMA), Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga, São Luís, MA, Brazil. ³Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Av. Sen. Salgado Filho, 3000 Candelária, Natal, RN, Brazil. ✉email: marta-barreiros@hotmail.com

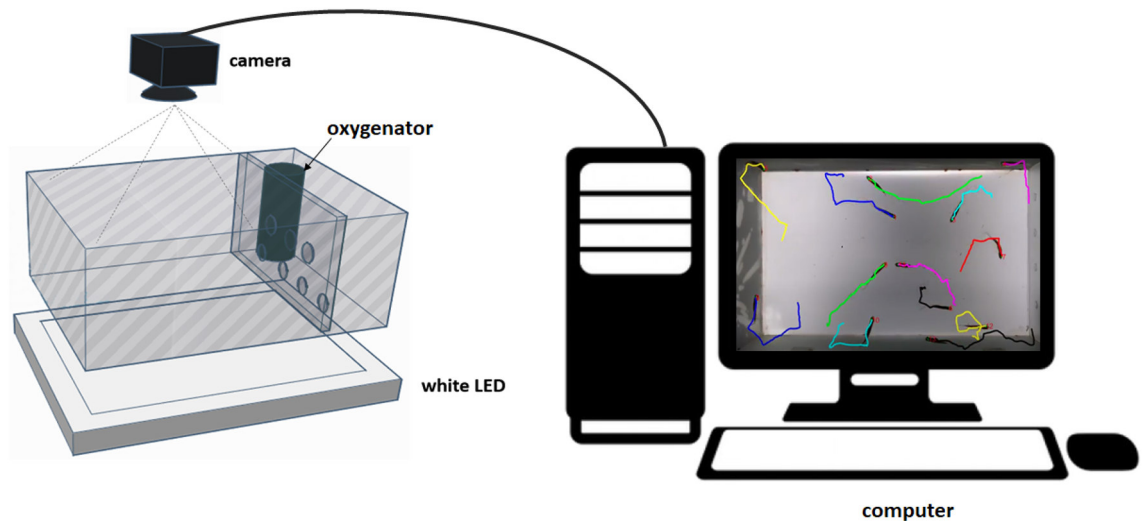


Figure 1. Experiment setup. The groups of zebrafish swam in a sandblasted glass tank (left), placed horizontally above a white LED panel. A camera was mounted above the tank. The images were captured and processed by the computer (right).

Several authors have proposed systems to solve these challenges, where they have created complex models of object identification, color tag detection systems¹⁴, object identification tags²³, set of variables for unique identification, time complexity algorithms in contour identification²⁴ and, detection by separating the head and body of the fish^{9,12,20}. However, these algorithms have a high complexity of analysis and processing, which requires greater amounts of frames per second when recording videos (about 60 to 100 frames per second)⁹, and sometimes they are semi-automatic²⁵, requiring manual intervention to reconnect lost tracking.

Therefore, it is important that new algorithms minimize several of the problems mentioned above. In this sense, here is proposed a method using YOLOv2 convolutional nets^{26,27}, for delimiting the region of the fish head for optimized individual fish detection and Kalman filter for tracking multiple fish in adverse situations, solving problems such as: detection and continuous identification of fish during periods of fast swimming, analysis in low image resolutions, occlusions and minimum number of frames per second, thus showing precision in the trajectory of different quantities of fish.

Materials and methods

Ethics statement. All experimental procedures with animals were in compliance and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Maranhão (UFMA), campus of São Luís—MA, Brazil (Protocol no. 23115.006194/2018-01). And the procedures were carried out in a way to minimize the animals' suffering.

Animals. Zebrafish (*Danio rerio*), adults, of both sexes ($n = 13$), were obtained from a local pet store (São Luiz—MA, Brazil) and housed in a 22.5 L, 55 cm × 25 cm × 20 cm (length × width × depth). The fish were kept in a closed system with filtered water for two weeks before filming. The water quality was monitored weekly, maintaining the temperature at 26 ± 1 °C and a pH control of approximately 7.2, with mechanical, biological and chemical filtration. The fish were fed four times a day with commercial foods (38% protein, 4% lipids, Nutricom Pet). The lighting was adjusted in a 12/12 h light/dark cycle.

Experimental apparatus. To assess the performance of the proposed tracking algorithm, several videos of varying lengths of different groups of fish were captured. The fish normally swam in the 45 cm × 25 cm × 20 cm (length × width × depth), another 10 cm was reserved for oxygenation, with water 10 cm deep, in a sandblasted glass tank on the external walls of the aquarium, avoiding the fish mirroring effect in the detection process in the tracking algorithm. The tank was placed horizontally above a flat light source of white LEDs (60 × 30 cm). The light source was placed at the bottom of the water tank because, this way, the camera is able to capture backlit images and, the object's body (fish) being darker, without many texture resources, facilitates tracking. A full HD camera (C920 Logitech camera), up to 1920 × 1080 pixels, at 30 frames per second was mounted about 50 cm above the tank, the image plane being almost parallel to the water surface. The experiment setup is shown in Fig. 1.

Proposed system. Figure 2 describes the proposed system for tracking each fish in a group, consisting of three stages: delimiting of the fish head region; detection; and tracking of the individual fish to trace trajectories.

In the first step, a set of images with delimitations of the region of each fish head in each frame is used for the initial training of the YOLOv2 network, then the process of marking the other regions of the fish head is automated in the next frames. If the fish head region is correctly delimited, the database can be extended and used as a training base for the convolutional network, otherwise the correction of the delimitation is done in the

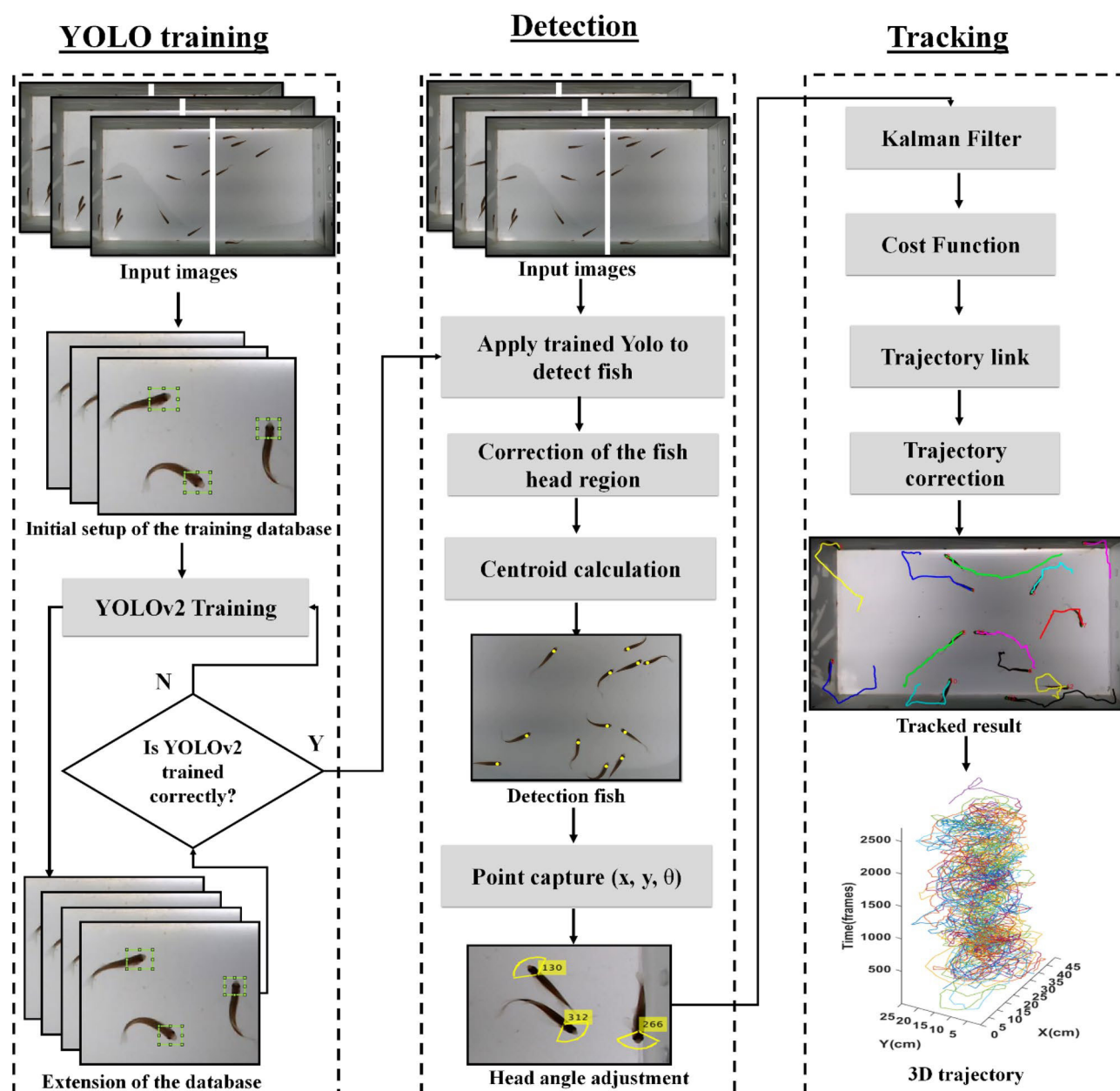


Figure 2. Flowchart of the system proposed for zebrafish tracking. The proposed system is divided into three main stages: delimitation of the fish head, detection and tracking of the fish. The first stage delimits the region of the fish head, used in training the YOLOv2 network to find the next regions in all frames, creating an extended database with all the delimitations of each fish head in the frame. In the second stage, the user's input images or test data are applied to the trained network for automatic delimitation of the fish head region, then a correction is made to the regions found, if duplicated, and then the centroid is calculated to find the position of the fish in the frame. The head angle is also found at this stage to adjust the Kalman filter; and in the last step, the Kalman Filter is used to predict the fish's next state, adjusting the cost function. Trajectories are linked and corrected to generate a complete trajectory for each fish.

frames. In the second stage, new frames are given as an entrance to the convolutional network already trained in the previous stage. At this stage, the user enters the video into the system so that the fish detection and tracking process is fully automated, without the need for new markings on the fish head region, because with the trained network there is no need for new markings on the next entry videos. Thus, the boundaries of the fish head region in the new frames of the input video are defined by the YOLOv2 network trained in the first stage of the system, after which the output images are restored to the size of the input image. In this montage, parts of the images overlap, which results in duplications in the detection of fish, these duplications are eliminated, using grid intersection. From the boundaries of the fish head, the centroid of that region is calculated, being the position of the center of the fish head. In addition to the centroid, an ellipse is calculated by Moments, defined to determine the angle of the fish's head, used in the next step.

In the third stage, a Kalman filter is used to estimate the fish's next state, using the head angle for direction. From the estimated values, a cost function is minimized, allowing the creation of trajectories for each fish. It is possible that in the estimation of the state of the fish, there are flaws and, consequently, the trajectory is lost, thus, the links of the trajectories are modeled to connect the fragmented paths, achieving a correct trajectory of the fish, that is, the reconnection of the lost path with the next started path, measured by the shortest distance. From these steps, it is possible to measure the behavioral levels of the fish individually, such as speed, distance covered and agitation of the school.

YOLOv2 network. The YOLOv2 convolutional network is the second version of YOLO²⁷. This network is capable of detecting objects with higher performance than conventional detection methods. The YOLOv2 network can be executed in different sizes, employing a combination of various techniques and training at various scales^{26,27}. In addition, it provides good accuracy and speed of execution in relation to other convolutional networks²⁷. For the operation of the YOLOv2 algorithm, the image is divided into multiples grids that detect an object inside the grid, making the candidate's bounding boxes have the same density as the axes of the detected objects. Each grid contains initial bounding boxes with different parameters and a confidence index from a convolution. This index is the probability of the object falling into the bounded box. Then, YOLOv2 tries to eliminate, as much as possible, the bounding boxes that do not correspond to the class of the object, facilitating the learning of the network^{26,28}.

After the delineations of the fish head regions are marked by the YOLOv2 network, a grid assembly process is established to form the complete image, using overlapping edges of the images. In this process, there may be objects located at the edges of the image and, consequently, the delimitations of the region of the fish head can be duplicated. To resolve this duplication, the minimum intersection method is used, calculated by,

$$Min = \frac{area(AB)}{\min(area(A), area(B))}, \quad (1)$$

where A and B represent the bounding boxes for object detection. The result is a defined score value that will pass a decision threshold, the choice, which will limit the detection of an object.

The YOLOv2 network is composed of layers of convolution: Max Pooling, Relu, Batch Normalization and Anchor boxes. In the convolution layer, the backpropagation algorithm trains convolution core weights, shared by the entire image with the same parameters. Relu is a layer that uses an activation function to restrict the network output in a non-linear way from the decision function and the general network, in addition to increasing the speed of the network training. Max Pooling serves to discretize the image, performing non-linear sampling on the interlayer image, dividing it into sets of non-overlapping regions. Batch normalization serves to increase improvements in convergence, without the need for other improvement methods. Finally, in anchor boxes is used to predict the coordinates of the bounding boxes of the fish head region.

Centroid detection. The fish head region delimitation method is used to obtain information from the center of the fish head; right after the YOLOv2 network finds the correct regions, removing duplicates. Thus, the central position of a given region, corresponding to the centroid of the moving fish, found according to,

$$\begin{cases} M_{00} = \sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h R(i, j) \\ M_{10} = \sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h ixR(i, j) \\ M_{01} = \sum_{i=0}^w \sum_{j=0}^h jxR(i, j), \end{cases} \quad (2)$$

where, M_{00} represents the zero order moment of the fish head region; M_{10} and M_{01} represent the moment of the first order; and R is a grayscale image of size $w \times h$ and location bounded by the YOLOv2 detection of an image used as an input, where w is the length and h is the pixel width of the bounding box found in the detection of YOLOv2.

The coordinates of the centroid position (c_{x_k}, c_{y_k}) of the k-th detected fish head are shown in,

$$\begin{cases} c_{x_k} = \frac{M_{10}}{M_{00}} \\ c_{y_k} = \frac{M_{01}}{M_{00}}. \end{cases} \quad (3)$$

Motion direction detection. The direction of the fish's movement is related to the ellipse adjusted on the fish's head. The direction of movement is c_{θ_k} , with a range of $[0, 2\pi]$. Equation (4) is used to find the fish movement orientation angle.

$$c_{\theta_k} = \begin{cases} \arctan \frac{p_{y_k} - c_{y_k}}{p_{x_k} - c_{x_k}}, & p_{x_k} > c_{x_k} \\ \arctan \frac{p_{y_k} - c_{y_k}}{p_{x_k} - c_{x_k}} + \pi, & p_{x_k} < c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} \geq c_{y_k} \\ \arctan \frac{p_{y_k} - c_{y_k}}{p_{x_k} - c_{x_k}} - \pi, & p_{x_k} < c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} < c_{y_k} \\ \frac{\pi}{2}, & p_{x_k} = c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} > c_{y_k} \\ -\frac{\pi}{2}, & p_{x_k} = c_{x_k} \text{ and } p_{y_k} < c_{y_k} \end{cases} \quad (4)$$

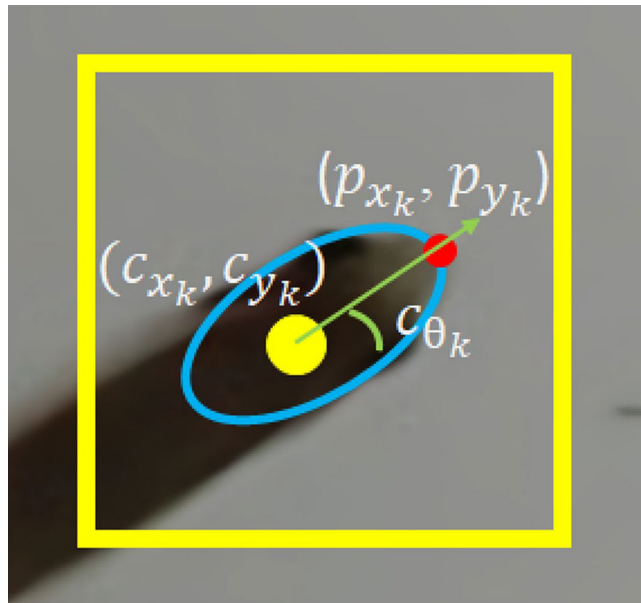


Figure 3. The bounding box is represented by the yellow frame. The centroid position (c_{x_k}, c_{y_k}) is represented by the yellow dot. The end of the head position (p_{x_k}, p_{y_k}) is represented by the red dot. The direction of movement of the fish is represented by the green arrow that has an angle equal to c_{θ_k} .

where, p_{x_k} and p_{y_k} , respectively, represent the x and y position of the extremity of the k -th fish head detected (Fig. 3).

Tracking method. To accurately estimate the movement of the fish, the Kalman filter was used to perform the tracking task. Because the movement of the fish is considered to be a uniform linear motion from one frame to the other, the system can be approximated as a linear dynamic model^{9,10,17}. The algorithm settings start with the status vector of the fish's location and orientation. The coordinates of the k -th fish head detected in the frame t are indicated as $(c_{x_k,t}, c_{y_k,t}, c_{\theta_k,t})$, therefore, the state vector x_t is defined as $[c_{x_k,t}, c_{y_k,t}, c_{\theta_k,t}, \dot{c}_{x_k,t}, \dot{c}_{y_k,t}, \dot{c}_{\theta_k,t}]^T$. The state and observation equation in the Kalman filter can be described as:

$$\begin{cases} x_t = Fx_{t-1} + w_t \\ z_t = Hx_t + v_t \end{cases}, \quad (5)$$

where the F and H are the state transition and observation matrix of the target at t , respectively, w_t and v_t are noise. The first step of the Kalman filter is to predict the state vector at instant t . The estimate of the state vector $\hat{x}_t$ and its error covariance $\hat{P}_t$ at instant t can be predicted by:

$$\hat{x}_t = Fx_{t-1}, \quad (6)$$

$$\hat{P}_t = F\hat{P}_{t-1}F^T + Q_t, \quad (7)$$

$$F = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & dt & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & dt & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & dt \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad (8)$$

where Q_t is the noise state covariance matrix v_t , P_{t-1} is the error covariance matrix in $t - 1$ and dt is the time interval between two frames.

The second stage is the association of the predicted positions of each fish by the Kalman filter with the centroid of the fish, in order to form the trajectory of each fish in the pictures. Thus, the association centroid of the fish (c_{x_k}, c_{y_k}) must follow the one-to-one criterion, and a tracker must be linked to a maximum of one value, which will be associated with a maximum of one tracker.

When the data association ends, the state vector and the error covariance matrix are updated by,

$$x_t = \hat{x}_t + K_t(\hat{z}_t - HK_t), \quad (9)$$

$$P_t = (I - K_t H) + \hat{P}_t, \quad (10)$$

where I is the identity matrix and K_t is the Kalman gain at instant t , calculated as,

$$K_t = \hat{P}_t H^t (H \hat{P}_t H^t + R)^{-1}, \quad (11)$$

$$R = \begin{bmatrix} 24.1 & 0 & 0 \\ 0 & 24.8 & 0 \\ 0 & 0 & 22.7 \end{bmatrix}, \quad (12)$$

$$H = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad (13)$$

where R is the covariance matrix of the observation noise v_t .

Cost function. The construction of the paths followed by the fish are developed through Muncres' implementation of the Hungarian algorithm²⁹. This algorithm makes a direct assignment of m sources to k targets through an $m \times k$ matrix called a cost matrix. A matrix $P_{m \times k}$, shown in Eq. (14), is created to save the cost of associating source objects $S = \{s_1, s_2, \dots, s_m\}$ to the target objects $R = \{r_1, r_2, \dots, r_k\}$ in the frame t , where s_m is a coordinate of the state variable of the observation variable in frame $t-1$, m is the number of predicted coordinates, r_n is the coordinate variable of the observation, k is the number of detected coordinates.

$$P(s_i, r_j) = \begin{bmatrix} f_{s_1, r_1} & f_{s_1, r_2} & \dots & f_{s_1, r_n} \\ f_{s_2, r_1} & f_{s_2, r_2} & \dots & f_{s_2, r_n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ f_{s_m, r_1} & f_{s_m, r_2} & \dots & f_{s_m, r_n} \end{bmatrix}, \quad (14)$$

The element f_{s_i, r_j} in the matrix indicates the cost to connect the i -th predicted coordinate track s to the j -th detect coordinate r . The value of $P(s_i, r_j)$ is calculated according to Eq. (15)

$$f_{s_i, r_j} = w_1 \left(\sqrt{(s_x - r_x)^2 + (s_y - r_y)^2} \right) + w_2 \left(\sqrt{(s_x - r_x)^2 + (s_y - r_y)^2} \right) \bullet \frac{|s_\theta - r_\theta|}{2\pi}, \quad (15)$$

where w_1 and w_2 are scalars used to weight each part of the function, s_x, s_y and s_θ are, respectively, the coordinate values of the x, y axis and orientation θ of the fish head detection, r_x, r_y and r_θ are respectively the coordinate values of the x, y axis and orientation θ of the estimated coordinate.

The path assigned for each fish, frame by frame, is performed using the Muncres implementation of the hungarian algorithm, which looks for unique assignments, that is, it assigns the object of the previous frame i to only one target object j in the current frame.

Reconnection of the trajectory. Some trajectories may be lost over time, due to occlusion of the fish and the corresponding interval between images, causing fragmentation of the trajectory. If the trajectory was incomplete compared to the initial trajectory, before a loss of identification occurred, a second calculation of the trajectory was proposed based on Qian et al., and Wu et al.^{10,30}. If no coordinate was associated in β consecutive frames, then the trajectory is interrupted. Position and time $(x_{end}, y_{end}, t_{end})$ trajectory Γ_i are stored in τ_i , where i is the trajectory number. If a new coordinate appears without any assignment, its position and time $(x_{start}, y_{start}, t_{start})$ trajectory Γ_j are stored in ρ_j , where j is the trajectory number. Assuming Γ_i an interrupted trajectory and Γ_j a trajectory with an unassigned coordinate, the connection of one trajectory with the other can be performed using the condition of Eq. (16)

$$constraindistance : \begin{cases} 1 & \text{Dist}(\tau_i, \rho_j) < d \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}, \quad (16)$$

$$Dist(\tau_i, \rho_j) = \sqrt{(x_{end} - x_{start})^2 + (y_{end} - y_{start})^2}, \quad (17)$$

The condition in Eq. (16) indicates whether the distance between the start position of ρ_j and end τ_i is less than d , where d is a user-defined distance threshold value, if true trajectories are connected. If there is more than one interrupted trajectory, the condition of Eq. (16) is calculated following the order of the trajectory with the lowest value of t_{end} up to the highest t_{end} . In cases where there is more than one path without attribution, the connection is made with the coordinate ρ_j that presents a smaller distance between the trajectory τ_i , given by Eq. (17). Figure 4 illustrates the process of connecting an interrupted trajectory with a new trajectory.

Data ground truth. To quantitatively evaluate the proposed algorithm, the tracking performance was compared with ground truth. The basic truth data was manually labeled according to the position of the zebrafish movements in each frame. Detection was done using the region of the fish head. For each video recorded, a unique ID was assigned to a fish. If the fish was not marked or there was an occlusion, the fish would be found

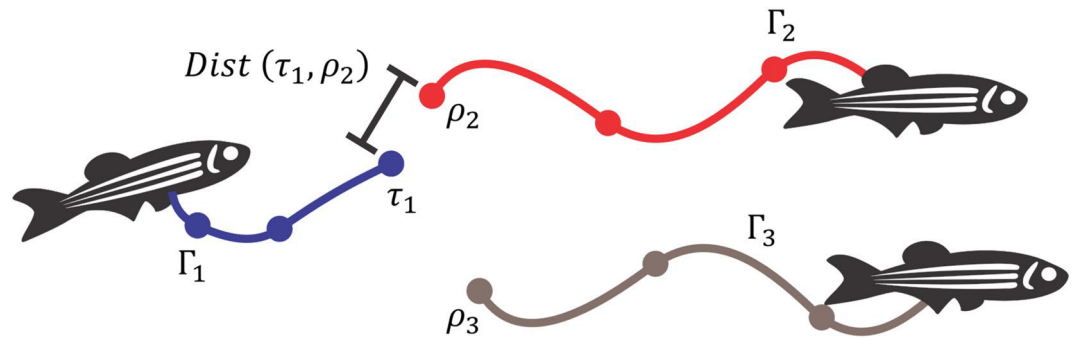


Figure 4. Reconnection of the trajectory of the fish. In this situation there is an interrupted trajectory Γ_1 and two new trajectories Γ_2 e Γ_3 . For trajectory connection Γ_1 the condition of Eq. (16) is verified with respect to the trajectories Γ_2 e Γ_3 . If the result is true for both trajectories, the trajectory chosen for the connection is the one with the shortest distance defined by Eq. (17). In the figure, the lowest value is $Dist(\rho_2, \tau_1)$, then their trajectories can be connected.

manually in the evaluation of each frame. A total of 15,106 frames were analyzed individually, in order to guarantee the consistency of the database and a good evaluation for the algorithm.

Detection evaluation metrics. The detection performance evaluation was measured for all video sequences. A total of 15,106 frames were recorded manually to confirm the performance of the algorithm in the correct identification of the fish, mainly in cases of occlusion. Thus, precision and recovery rate methods were used to assess object detections. Defined in the Eqs. (18) and (19):

$$Precision = \frac{TruePositive}{TruePositive + FalsePositive} \quad (18)$$

$$Recall = \frac{TruePositive}{TruePositive + FalseNegative} \quad (19)$$

where the value of true positive is the total number of correct detections in all frames; false negative is the total number of detections lost and false positive is the total of regions detected incorrectly. That way, the metric $F_{measure}$ is the weighted calculation of precision and recall (Eq. 20).

$$F_{measure} = \frac{2x(Recall \times Precision)}{Recall + Precision} \quad (20)$$

In addition, the Similarity Index (SI) was used, which measures the number of correctly detected objects, penalizing undetected objects, whether due to occlusion or detection error. That way, Num_{missed} is the number of undetected objects and $Num_{GroundTruth}$ is the number of objects detected from the ground truth (Eq. 21).

$$SimilarityIndex = F_{measure} - \frac{Num_{missed}}{2xNum_{GroundTruth}} \quad (21)$$

To evaluate the proposed method in case of occlusions, the metrics OR (occlusion ratio) and ODR (occlusion detection ratio) were used, presented in the Eqs. (22) and (23):

$$OR = \frac{TotalNumberOfOcclusions}{TotalNumberOfTargets} \quad (22)$$

$$ODR = \frac{SuccessfulNumberOfOcclusionsDetection}{TotalNumberOfOcclusions} \quad (23)$$

The evaluation of detection's performance was based on the error rate of undetected fish (miss ratio) and the error rate of erroneous detection (error ratio), in which they are applied to evaluate the performance of the detection stage, calculated as the Eqs. (24) and (25),

$$MissRatio = \frac{TotalNumberOfUndetectedFishInAllFrames}{NumberOfFish \times NumberOfFrames} \quad (24)$$

$$ErrorRatio = \frac{TotalNumberOfWronglyDetectedFishInAllFrames}{NumberOfFish \times NumberOfFrames} \quad (25)$$

Dataset	Fish	Frames	FPS	Resolution	Average speed per fish (cm/s)
D1	3	904	30	1920 × 1080	9.42
D2	6	1,269	30	1920 × 1080	7.81
D3	8	789	30	1920 × 1080	6.37
D4	10	1,366	30	1920 × 1080	6.44
D5	13	2,422	30	1920 × 1080	7.44
D6_food	13	1,519	30	1920 × 1080	10.22
D7 (idtracker.ai ²)	10	5,410	30	3712 × 3712	8.14
D8 (idtracker.ai ²)	100	1,410	30	3712 × 3712	7.49

Table 1. List of videos used for zebrafish tracking. *FPS* frames per second.

Tracking evaluation metrics. The tracking performance of the proposed system was assessed using the Correct Tracking Rate Index (CTR), which describes the percentage of frames correctly tracked for a single fish, such as Eq. 26:

$$CTR = \frac{\sum (NumberOfCorrectFramesOfSingleFish)}{NumberOfFish \times NumberOfFrames} \quad (26)$$

And the correct identification reason (CIR) that represents the probability of correct identification of all fish after an occlusion, such as Eq. (27):

$$CIR = \frac{TimesThatAllFishGetCorrectIdentityAfterOcclusion}{NumberOfOcclusionsEvents} \quad (27)$$

Results

Video data set for analysis. To test the proposed system, we used benchmarks containing eight video sequences, six of which are video sequences related to our own experiment (D1–D6, see videos S1–S6), having a total of 8427 frames with 1920 × 1080 resolution; and two sequences of videos available from previous publications, being D7 and D8 (Romero-Ferrero et al.²; see videos S7 and S8) with a total of 6820 frames (3712 × 3712 resolution). All data sets were recorded at 30 frames. Tracking performance was compared to ground truth data. The videos had different durations and number of fish, ranging from 3 to 100 fish, and are described on Table 1. The experimental apparatus is shown in Fig. 1. The behavior of the fish was measured by the average speed, showing two conditions of movement: slow and fast (feeding period). The proposed tracking algorithm was developed using a personal computer (Intel Core i7 7700HQ CPU at 2800 8 GB RAM, Geforce gtx 1050 4 GB off-board graphics card) using Matlab R2019b software.

YOLOv2 network architecture. The architecture of the YOLOv2 network used in this article is shown in Fig. 5. In this architecture, there are 24 layers, seven layers of convolution, six layers of Relu, three layers of Max Pooling, six layers of Batch normalization and two layers of anchoring. The input layer corresponds to the network input, with the image size of 480 × 480 × 3. YOLO's convolutional layers decrease the sample by a factor of 32, obtaining the delimitations of the region of the fish head, with the convolution filter size being a 3 × 3 block and the convolution step is 1. The Max Pooling layer has the size 2 × 2, with step 2 and filling 0. All main blocks have a Relu operation layer. At the end of the block, it has two layers of anchor boxes: one for transformation and one for output. The first anchor layer transforms the output of the raw convolutional network into a format necessary to produce object detections; and the second defines the parameters of the anchor box, implementing the loss function used to train the detector³¹. In this way, YOLOv2 will be able to make use of the lower and upper level information, increasing the precision of the detection and location of the region of the fish head in the image.

YOLOv2 network training. During the training, a set of 3200 image grids, 1100 image grids of videos from our experiment and 500 image grids from the database of Romero-Ferrero et al.² (approximately 1600 original size images) were initially manually labeled with the region of the fish head, being fed into the YOLOv2 network.

After the initial training, the YOLOv2 network was used to label and create the boundaries on the fish heads in new images, forming an automatic labeling process. To validate the training, a test base was established to know the assertiveness of the labeling of fish from the initial base, in case of wrong or missing labels. To improve the result of the initial training, the training base was extended with new images labeled and marked from the automatic process, but with manual corrections in the event of any error. This process reduced the time to create a training base. When the training was able to create all the delimitations of the region of the fish head correctly, the training base used was sent to the YOLOv2 network for official training.

Because the YOLOv2 networks are trained and evaluated in small resolutions (228 × 228 in the case of resnet50) and the frame size of the proposed system is 1920 × 1080 pixels, the image when resized could lose

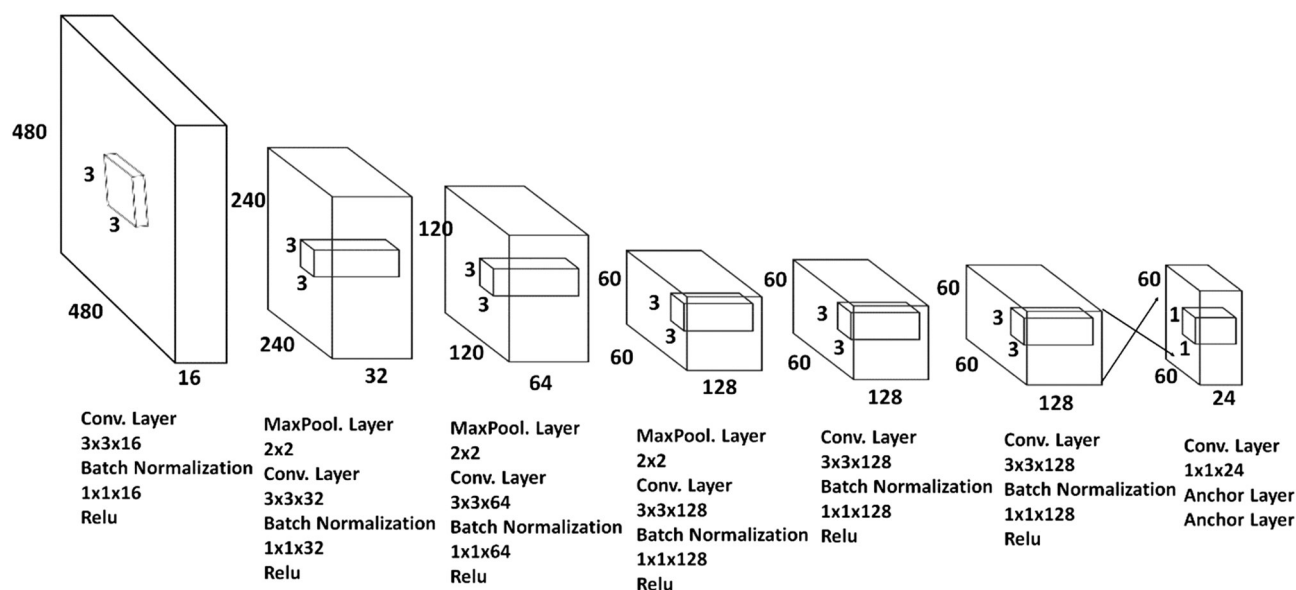


Figure 5. Architecture of the proposed YOLOv2 network framework. The input image has a size of 480×480 , and each layer is reduced by filters of up to 60×60 . All combinations of the network architecture blocks have a convolution layer, Batch normalization and ReLU, with the exception of the last layer that presents the exit through convolution and the anchor boxes. Only the three initial layers have Max pooling.

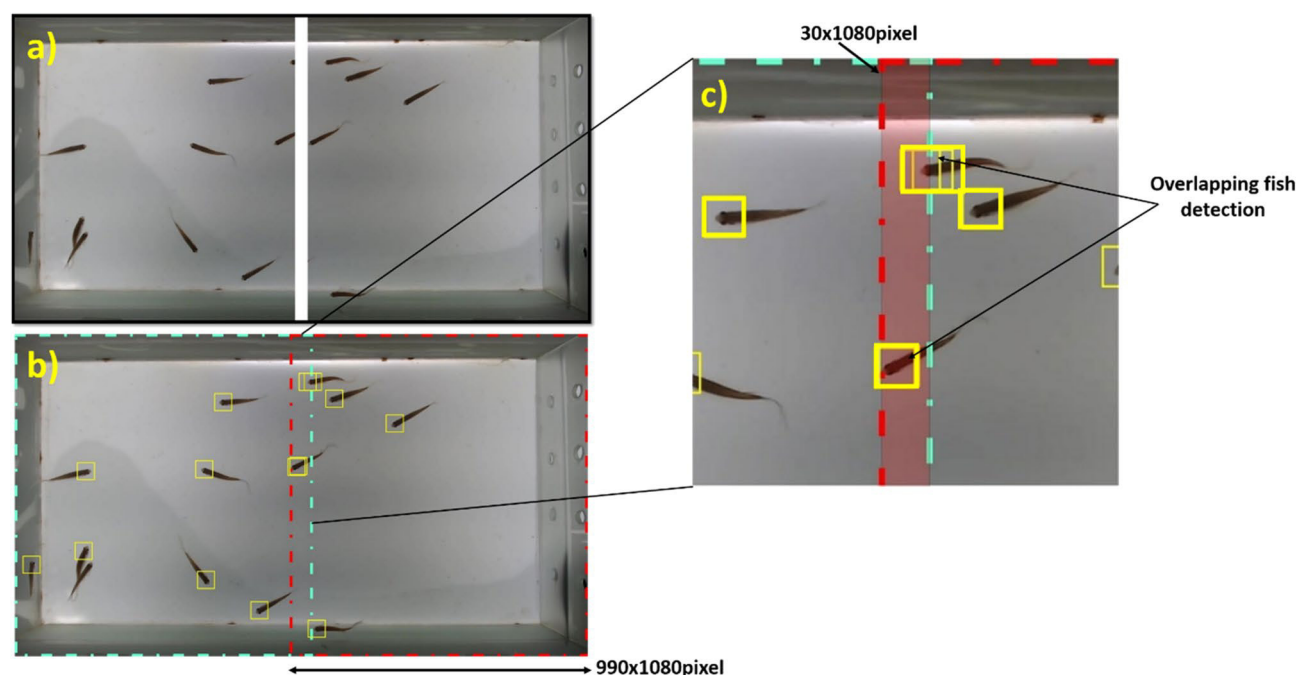


Figure 6. Example of a grid image with overlapping edges and duplication of the delimitation the region of the fish head. (a) Input image for YOLOv2 network divided into grids for the process of fish detection. (b) Assembly of grids with overlapping edges. (c) The red stripes represent the overlapping of the edges of the images during the assembly process (equivalent to 30 pixels wide). Fish were detected in the edge of grids and the correction was made using the grid intersection method presented in Eq. (1).

important features of the region of the fish head. The input images from the YOLOv2 network were cut by dividing the image in half. The reduction is made by creating two grids of 960×1080 pixels with an overlap of 30 pixels, totaling an image of 990×1080 pixels (Fig. 6). Then each grid is reduced to a dimension of 480×480 pixels which is used as input to the YOLOv2 network. After the creation of the delimitations of the region of the fish head in the images meshed by the net, the process of assembling the complete image is established, using the image overlay algorithm, and the correction of duplication of the region of the fish head located on the edges of the grids (Fig. 6c). If this result is greater than the 0.4 threshold, then the same detection will be considered

Dataset	Occlusions	Precision	Recall	OR	ODR	Miss ratio	Error ratio	F measure	SI
D1	10	1.0000	0.9963	0.0037	0.8000	0.0037	0.0000	0.9982	0.9963
D2	49	1.0000	0.9883	0.0064	1.0000	0.0117	0.0000	0.9941	0.9883
D3	59	1.0000	0.9884	0.0093	1.0000	0.0116	0.0000	0.9942	0.9884
D4	135	0.9999	0.9786	0.0099	0.6519	0.0214	0.0001	0.9891	0.9784
D5	1065	0.9998	0.9677	0.0338	0.5925	0.0323	0.0002	0.9835	0.9673
D6_food	715	0.9987	0.9663	0.0362	0.6252	0.0337	0.0013	0.9822	0.9653
D7 (idtracker.ai ²)	343	0.9998	0.9989	0.0063	0.7347	0.0011	0.0002	0.9994	0.9988
D8 (idtracker.ai ²)	399	0.9999	0.9340	0.0028	0.7268	0.0660	0.0001	0.9658	0.9328

Table 2. Performance of the detection evaluation.

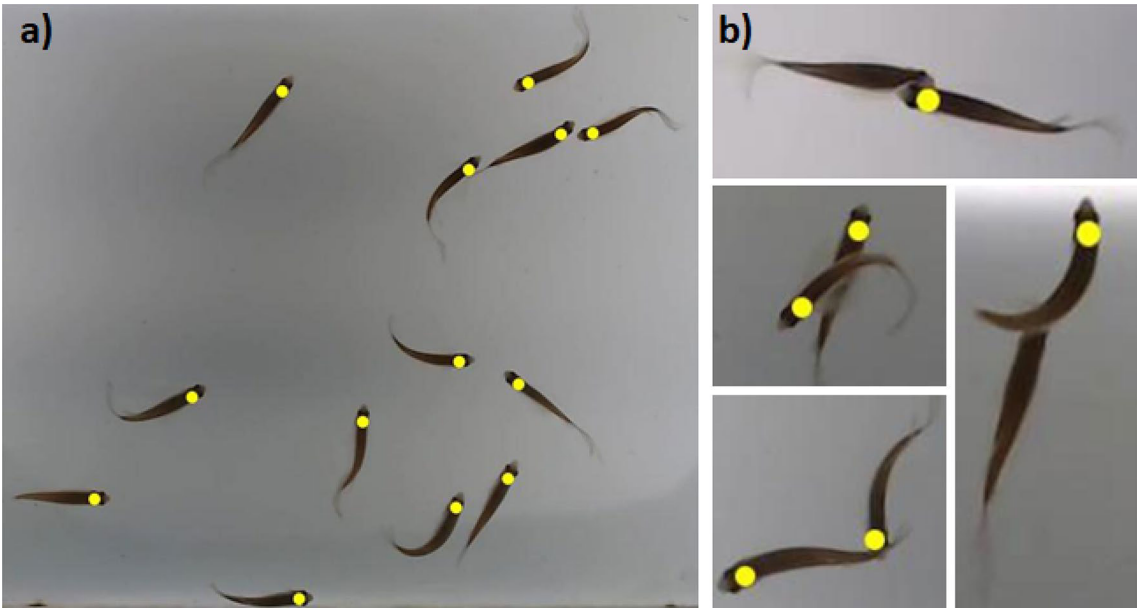


Figure 7. Fish detection. (a) Image of the complete detection of the fish head region for a group of 13 fish; (b) Examples of fish occlusion events, in some cases, there was a failure in detection.

and, thus, a single delimitation of the region of the fish head will be assigned to the fish located on the edge of the image. This way, the detection of the delimitation of the region of the fish head can appear at the edge of the grids without loss of data, but with duplication corrected.

The YOLOv2 training protocol was based on MATLAB tools for convolutional networks, following the parameters of the convolution layers. The training process was carried out for 300 periods, using a learning rate of 0.001.

Detection evaluation. The results of the detection evaluation are presented in Table 2. The proposed method presented a superior performance of up to 0.99 of precision for all data sets in our experiment (D1–D6), thus showing that the proposed detection method based on YOLOv2 to create delimitations of the region of the fish head and assist in the calculation of the centroid, helps in the detection with different quantities of fish in the groups. Evaluating the detection in the videos, in which the fish presented slower movements (D1, D2 and D3, with an average speed of 9.42 cm/s, 7.81 cm/s and 6.44 cm/s, SI: 0.9963, 0.9883 and 0.9884, respectively), with groups of 3, 6, and 8 fish, the precision reached 1.00 and F-measure reached 0.99.

In faster movements (D6_food), during the feeding period, some losses in the detection were observed, but the algorithm was able to detect fish with good precision (0.9987), even with high occlusion frequency, a total of 715 occlusions (Table 2), and with high average speed per fish about 10.22 cm/s (Table 1). It was noticed that the occlusion is related to the fast and agglomerated swimming of the school, mainly in the feeding period (D6_food, OR: 0.0362, ODR: 0.6252, Miss ratio: 0.0337, Error ratio: 0.0013, F-measure: 0.9822, SI: 0.9653). Figure 7 shows some examples of detection and occlusions.

This method uses the fish head region to calculate the centroid and detect the fish in the images. On the other hand, in other previously published works, the authors used the fish's body as a complement to the detection and identification^{9,10,17,32}. Thus, the proposed method was able to detect fish in several situations considered difficult for the detection to remain correct, being incapable only in times of occlusion, where the fish's head was totally occluded by another fish. In addition, there was little loss of detection when the environment was noisy and

Dataset	CIR	CTR
D1	1.0000	1.0000
D2	1.0000	0.9970
D3	0.9500	0.9978
D4	0.9629	0.9987
D5	0.9115	0.9887
D6_food	0.8394	0.9795
D7 (idtracker.ai ²)	0.9375	0.9969
D8 (idtracker.ai ²)	0.9285	0.9983

Table 3. Performance of the evaluation tracking.

challenging. Thus, it was possible to evaluate videos in different conditions, so that the method does not limit only one tested video input; it can be used in other shooting conditions.

We tested the proposed algorithm in another dataset with videos containing groups of 10 fish (video D7) and a group of 100 fish (video D8), available for free by Romero-Ferrero et al.², referring to the idtracker.ai system, the videos had high resolution (3712×3712 pixels) and different environmental configuration from our experiment. The results of videos D7 and D8 were greater than 0.999 precision for both analyzed videos (Table 2). The fish were at an average speed of 8.14 cm/s and 7.49 cm/s, videos D7 and D8, respectively. The number of occlusions was relatively low, compared to the other videos analyzed in this article, thus obtaining the D7: 343 occlusions, OR: 0.0063, ODR: 0.7347, F-measure: 0.9994 and SI: 0.9988, and D8: 399 occlusions, OR: 0.0027, ODR: 0.7268, F-measure: 0.9658 and SI: 0.9328. It is observed that the increase in the quantity of fish (100 fish) did not interfere with the detection precision of the proposed algorithm.

Tracking evaluation. Table 3 shows the tracking result, using the CTR and CIR metrics. The tracking is calculated similarly to the detection of a fish, calculating the percentage of the frames correctly tracked for each fish and the correct probability of all fish. The CTR describes the percentage of frames correctly tracked for each fish and, in this method, the exchange of identifications is not evaluated, but only if the tracker can follow the fish head correctly. In this study, the correct tracking of the fish in the frame was defined by the distance from the actual position of the center of the fish head in relation to the center of the tracking at a distance of up to 15 pixels, a greater distance or the absence of a tracking in the frame is considered to be an incorrect tracking. The results show a good percentage of frames correctly tracked of a single fish during a video, reaching up to 100% in the tracking when the quantity of fish is reduced (D1, CIR: 1.00, CTR: 1.00; and D2, CIR: 1.00, CTR: 0.99). It was observed that the fish loses its identification for a short period of time (D3, CIR: 0.95, CTR: 0.99 and D4, CIR: 0.96, CTR: 0.99). It is noticed that larger quantities of fish increase the amount of exchanges or losses of identification. In addition, the probability of correct identification of all fish after an occlusion is compromised with larger quantities of fish in the dataset or even with faster swimming motions (D5, CIR: 0.91, CTR: 0.98 and D6_food : CIR: 0.83, CTR: 0.97).

In this sense, it was already expected that in the feeding period, the tracking of fish would be lost, as there were many occlusions and totally unexpected movement. The biggest tracking losses were in videos D5 and D6_food. The tracking of videos D7 and D8 performed well, obtaining a CTR value of up to 0.99 in tracking fish (D7, CIR: 0.9375, CTR: 0.9970 and D8, CIR: 0.9285 and CTR: 0.9983). It is observed that the algorithm was able to track fish from another dataset, where the videos were recorded with a higher resolution than our images (Table 1) and experimental environment different from that proposed here. In addition, it is notable that the spread of errors decreases as occlusions happen less frequently when the fish swim in the tank.

Figure 8 shows a visual example of tracking in three video sequences (D1, D2 and D6_food).

Discussion

The method proposed in this work combined two techniques to detect and track fish schools: the YOLOv2 network and the Kalman filter. Previous tracking methods showed applications of fish swimming in shallow waters and slow motions^{9,10,17,19,32}. Here, we test the proposed method in adverse situations such as the feeding period, which is widely used for training and conditioning fish. It was noticed that the quantity and agitation of the school of fish are important factors for the increase in occlusion, which makes detection difficult most of the time.

However, through this method, we showed that detection and tracking were obtained around 99% in low and high resolution images, with variation in the quantity of fish (up to 100 fish). High resolution images, such as the images available from idtracker.ai², proved to be favorable for successful screening. In addition, it was observed that the spread of errors decreases when the fish have little occlusion.

In some methods, the fish's entire body segmentation is used to detect and identify the fish^{9,10,17,32}, however we created a delimitation of the region of the fish head to facilitate detection, this approach has been presented in other works, but using different techniques^{9,19}. The performance of the YOLOv2 network improves as training is increased, improving the result of the delimitation of the region of the fish head.

The fish was detected by calculating the centroid, based on the identification of the region of the fish head by YOLOv2. The Kalman filter was used to adjust the centroid, estimating the fish's position between frames, when there was loss of detection. A fish changes from one position to another quickly, and a method for estimating

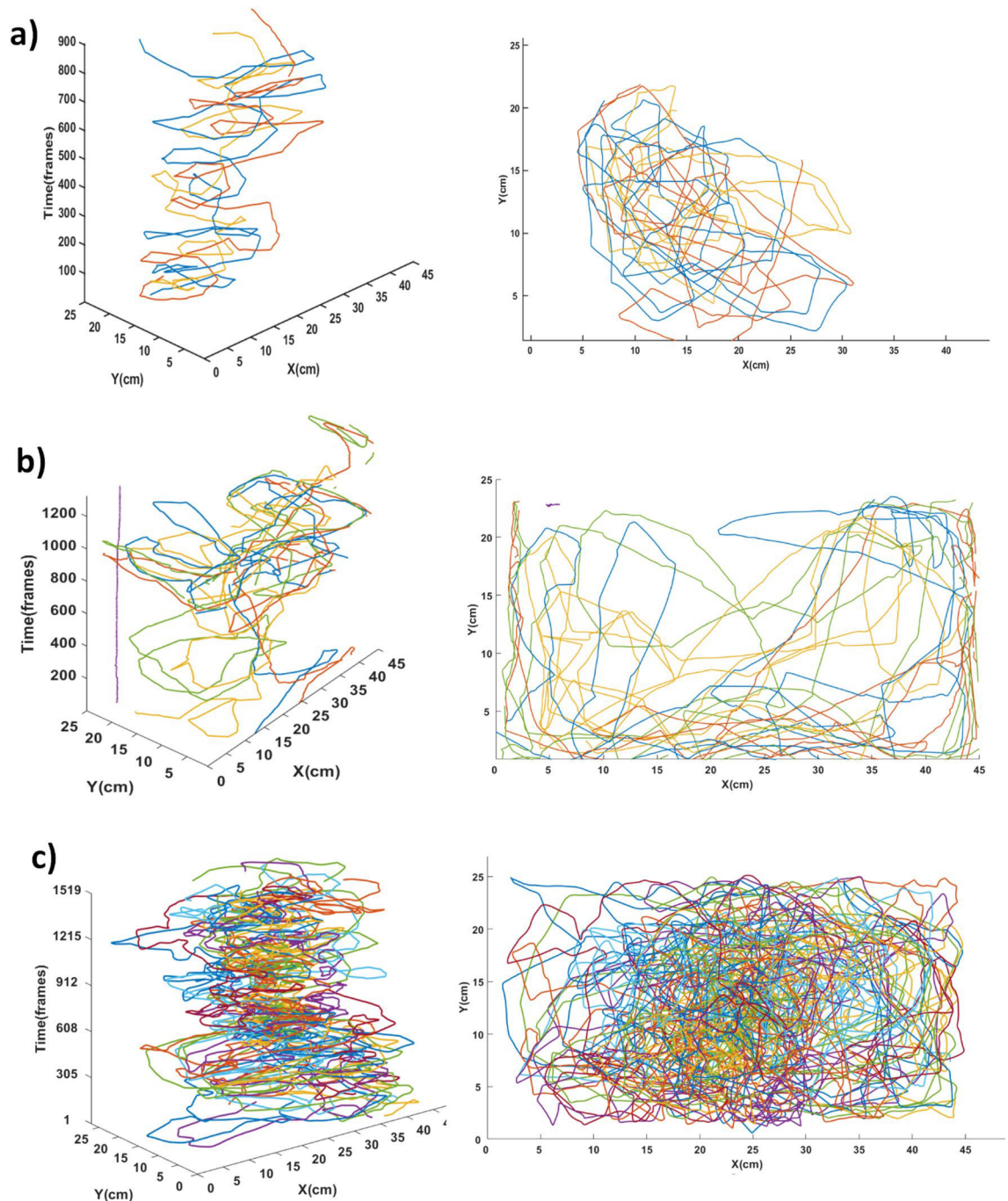


Figure 8. Result of tracking different groups of fish. **(a)** Tracking of group D1 with 3 fish and **(b)** group D2 with 6 fish, both in a state of slow motions, **(c)** group D6_food with 13 fish are in the feeding period (fast motions). The fish swim with greater agitation and agglomeration in the center of the aquarium, a space where the food was concentrated.

the position in the tank may fail to identify the fish's current position. An adjustment of the cost function has considerably improved the prediction of the state of the fish, making it possible to create trajectories. In order to establish the lost trajectories, the route was reconnected using the shortest distance. In this study, a much higher frame rate is not necessary, we used a frame rate considered low at 30 frames per second, and we were able to track the fish efficiently. Higher rates can compromise the algorithm's run time.

Although we were able to correctly identify fish at around 0.83 (CIR) in the feeding period, where fish can have rapid movements and many variations in the direction of movement, it is still a limitation when the number of occlusions between fish is high, as there may be an exchange of fish identification. In addition, long occlusions, which are greater than 15 frames, may have a greater chance of exchanging fish identification, due to the lack of an identification step.

Thus, the inclusion of an identification step, could improve the tracking of the fish in the entire route in the tank, especially after long occlusions, reducing the chances of propagating errors, compromising the performance of the method. The YOLOv2 network when trained with different classes can detect multiple objects from the same or different classes in the same image. When used as a unique identification method for several individuals of the same species in the same scene, a better performance is achieved in terms of speed and accuracy in carrying out the task. In *idtracker.ai*², a fish identification step is used, without the need for an additional method to associate the detection of objects between frames, generating greater accuracy in tracking, especially during fish occlusions. A new approach could be attributed to our work, which includes a fish identification step to further improve tracking.

Conclusion

In this paper, an effective method for detecting and tracking schools of fish swimming in calm and agitated behavior has been proposed. This method was satisfactory for detecting and tracking agglomerated and agitated fish during the feeding period. The method was based on the YOLOv2 network which delimits the region of the fish head so that the centroid can be calculated and, subsequently, the fish can be detected. The tracking was proposed by using the Kalman filter and adjusted by a cost function; in addition, the fragmentation of the trajectory has been reconnected to allow greater stability in the path of the fish. The method was evaluated in different schools and adverse situations, obtaining satisfactory results in all the metrics used for evaluation. However, including a fish identification step can further improve tracking in periods of many occlusions, preventing the spread of errors.

Received: 17 June 2020; Accepted: 13 January 2021

Published online: 05 February 2021

References

1. Miller, N., Garnier, S., Hartnett, A. T. & Couzin, I. D. Both information and social cohesion determine collective decisions in animal groups. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5263–5268 (2013).
2. Romero-Ferrero, F., Bergomi, M. G., Hinz, R. C., Heras, F. J. H. & de Polavieja, G. G. *Idtracker.Ai*: Tracking all individuals in small or large collectives of unmarked animals. *Nat. Methods* **16**, 179–182 (2019).
3. Dorigo, M. & Socha, K. *Handbook of Approximation Algorithms and Metaheuristics*. <https://doi.org/10.1201/9781420010749> (Chapman and Hall/CRC, 2007).
4. Karaboga, D. & Akay, B. A comparative study of artificial bee colony algorithm. *Appl. Math. Comput.* **214**, 108–132 (2009).
5. Sison, M. & Gerlai, R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behav. Brain Res.* **207**, 99–104 (2010).
6. Cervi, A. L., Poling, K. R. & Higgs, D. M. Behavioral measure of frequency detection and discrimination in the zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* **9**, 1–7 (2012).
7. Avdesh, A. *et al.* Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *J. Alzheimer's Dis.* **28**, 459–469 (2012).
8. Manabe, K., Dooling, R. J. & Takaku, S. Differential reinforcement of an approach response in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Process.* **98**, 106–111 (2013).
9. Wang, S. H., Cheng, X. E., Qian, Z.-M., Liu, Y. & Chen, Y. Q. Automated planar tracking the waving bodies of multiple zebrafish swimming in shallow water. *PLoS ONE* **11**, e0154714 (2016).
10. Qian, Z.-M., Cheng, X. E. & Chen, Y. Q. Automatically detect and track multiple fish swimming in shallow water with frequent occlusion. *PLoS ONE* **9**, e106506 (2014).
11. Bai, Y.-X. *et al.* Automatic multiple zebrafish tracking based on improved HOG features. *Sci. Rep.* **8**, 10884 (2018).
12. Mirat, O., Sternberg, J. R., Severi, K. E. & Wyart, C. ZebraZoom: An automated program for high-throughput behavioral analysis and categorization. *Front. Neural Circuits* **7** (2013).
13. Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R. C., Arganda, S. & de Polavieja, G. G. *idTracker*: Tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nat. Methods* **11**, 743–748 (2014).
14. Delcourt, J., Denoël, M., Yliff, M. & Poncin, P. Video multitasking of fish behaviour: A synthesis and future perspectives. *Fish Fish.* **14**, 186–204 (2013).
15. Noldus, L. P. J. J., Spink, A. J. & Tegelenbosch, R. A. J. *EthoVision*: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* **33**, 398–414 (2001).
16. Spink, A., Tegelenbosch, R. A., Buma, M. O. & Noldus, L. P. J. The *EthoVision* video tracking system—A tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. *Physiol. Behav.* **73**, 731–744 (2001).
17. Zhao, X., Yan, S. & Gao, Q. An algorithm for tracking multiple fish based on biological water quality monitoring. *IEEE Access* **7**, 15018–15026 (2019).
18. Wang, X., Cheng, E., Burnett, I. S., Wilkinson, R. & Lech, M. Automatic tracking of multiple zebrafish larvae with resilience against segmentation errors. in *2018 IEEE 15th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2018)* 1157–1160 <https://doi.org/10.1109/ISBI.2018.8363776> (IEEE, 2018).
19. Xu, Z. & Cheng, X. E. Zebrafish tracking using convolutional neural networks. *Sci. Rep.* **7**, 42815 (2017).
20. Fontaine, E. *et al.* Automated visual tracking for studying the ontogeny of zebrafish swimming. *J. Exp. Biol.* **211**, 1305–1316 (2008).
21. Zhang, T., Xu, C. & Yang, M.-H. Multi-task correlation particle filter for robust object tracking. in *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) 2017-Janua*, 4819–4827 (IEEE, 2017).
22. Zhou, Y., Cattley, R. T., Cario, C. L., Bai, Q. & Burton, E. A. Quantification of larval zebrafish motor function in multiwell plates using open-source MATLAB applications. *Nat. Protoc.* **9**, 1533–1548 (2014).
23. Delcourt, J., Yliff, M., Bolliet, V., Poncin, P. & Bardonnet, A. Video tracking in the extreme: A new possibility for tracking nocturnal underwater transparent animals with fluorescent elastomer tags. *Behav. Res. Methods* **43**, 590–600 (2011).
24. Branson, K. & Belongie, S. Tracking multiple mouse contours (without too many samples). in *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)* Vol. 1, 1039–1046 (IEEE, 2005).
25. Miller, N. & Gerlai, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **184**, 157–166 (2007).
26. Redmon, J. & Farhadi, A. YOLO9000: Better, faster, stronger. in *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) 2017-Janua*, 6517–6525 (IEEE, 2017).
27. Liu, Z., Chen, Z., Li, Z. & Hu, W. An efficient pedestrian detection method based on YOLOv2. *Math. Probl. Eng.* **2018**, 1–10 (2018).
28. Ding, C. *et al.* REQ-YOLO. in *Proceedings of the 2019 ACM/SIGDA International Symposium on Field-Programmable Gate Arrays* 33–42 <https://doi.org/10.1145/3289602.3293904> (ACM, 2019).
29. Date, K. & Nagi, R. GPU-accelerated Hungarian algorithms for the linear assignment problem. *Parallel Comput.* **57**, 52–72 (2016).

30. Wu, H. S., Zhao, Q., Zou, D. & Chen, Y. Q. Automated 3D trajectory measuring of large numbers of moving particles. *Opt. Express* **19**, 7646 (2011).
31. MathWorks. Getting started with YOLO v2. *MathWorks* 1 (2020). <https://ww2.mathworks.cn/help/vision/ug/getting-started-with-yolo-v2.html>.
32. Feijó, G. de O., Sangalli, V. A., da Silva, I. N. L. & Pinho, M. S. An algorithm to track laboratory zebrafish shoals. *Comput. Biol. Med.* **96**, 79–90 (2018).

Acknowledgements

We thank Professor PhD. Ridvan Nunes Fernandes (Centro de Ciências Exatas e Tecnologias - CCET of the Universidade Federal do Maranhão-UFMA) for supporting this work, which offered the space for the construction of the experimental room; and Felipe Gomes Barbosa for the support and planning of the experimental room. This work was supported by the Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão—FAPEMA.

Author contributions

M.O.B. and S.R. designed the experiments. M.O.B. and L.C.O.S. conducted laboratory work. M.O.B., D.O.D. and L.C.O.S. contributed tracking algorithm. M.O.B. and D.O.D. contributed to data extraction. M.O.B., A.K.B. and S.R. interpreted data. M.O.B. and D.O.D. conducted statistical analyses. M.O.B. wrote the article, with editing contributed from all authors.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81997-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.d.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



OPEN

Zebrafish automatic monitoring system for conditioning and behavioral analysis

Marta de Oliveira Barreiros^{1✉}, Felipe Gomes Barbosa¹, Diego de Oliveira Dantas¹, Daniel de Matos Luna dos Santos¹, Sidarta Ribeiro², Giselle Cutrim de Oliveira Santos³ & Allan Kardec Barros¹

Studies using zebrafish (*Danio rerio*) in neuro-behavioural research are growing. Measuring fish behavior by computational methods is one of the most efficient ways to avoid human bias in experimental analyses, extending them to various approaches. Sometimes, thorough analyses are difficult to do, as fish can behave unpredictably during an experimental strategy. However, the analyses can be implemented in an automated way, using an online strategy and video processing for a complete assessment of the zebrafish behavior, based on the detection and tracking of fish during an activity. Here, a fully automatic conditioning and detailed analysis of zebrafish behavior is presented. Microcontrolled components were used to control the delivery of visual and sound stimuli, in addition to the concise amounts of food after conditioned stimuli for adult zebrafish groups in a conventional tank. The images were captured and processed for automatic detection of the fish, and the training of the fish was done in two evaluation strategies: simple and complex. In simple conditioning, the zebrafish showed significant responses from the second attempt, learning that the conditioned stimulus was a predictor of food presentation in a specific space of the tank, where the food was dumped. When the fish were subjected to two stimuli for decision-making in the food reward, the zebrafish obtained better responses to red light stimuli in relation to vibration. The behavior change was clear in stimulated fish in relation to the control group, thus, the distances traveled and the speed were greater, while the polarization was lower in stimulated fish. This automated system allows for the conditioning and assessment of zebrafish behavior online, with greater stability in experiments, and in the analysis of the behavior of individual fish or fish schools, including learning and memory studies.

Learning and memory are complex brain processes that allow animals to adjust their behavior throughout the experience and in different environments^{1,2}. In addition, learning and memory can help the fish improve anti-predator behavior when being attacked by predators by observing their companions' behavior^{1,3}. Thus, learning plays an important role in the development of this behavior and has been studied in many animal models in the field of neuroscience and psychobiology^{4–9}.

The zebrafish (*Danio rerio*) is a small freshwater teleost fish from South Asia¹⁰, and has become a model for behavioral research in neuroscience^{5,11}, potentially suitable for studies on vertebrate learning⁹, because of the simplicity in the practice of maintenance, their proliferating nature and for having increased development of genetic markers, in addition to the practicality in handling, due to its small size (4 cm) and due to being fertile after three months. In addition to robust behavioral phenotypes, zebrafish has a homology with nucleotide and functional sequences among mammalian genes, which makes it suitable for research^{12,13}.

Behavioral tests of learning and memory can be used even in the larval stage of zebrafish^{14–16}. In this way, many experiences involving zebrafish behavior have already been tested and continue to be a field of study in research. In behavioral terms, several studies have shown zebrafish learning from different visual and sound approaches, such as identifying color preferences^{13,17–19}, through the usage of lights (for association with danger, well-being, evacuation, memory^{4,7}, in physical exercise²⁰, in the usage of sounds to identify the fish's sound

¹Department of Electrical Engineering, Laboratory for Biological Information Processing (PIB), Federal University of Maranhão (UFMA), Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga, São Luís, MA CEP 65080-805, Brazil. ²Brain Institute, Federal University of Rio Grande Do Norte, Av. Sen. Salgado Filho, 3000, Candelária, Natal, RN, Brazil. ³Department of Biology Sciences, State University of Maranhão, Cidade Universitária Paulo VI S/N, São Luís, MA 65055-310, Brazil. ✉email: marta-barreiros@hotmail.com

perception^{21–24}, in the operant behavioral test to examine aspects of controlling a series of stimuli in zebrafish⁶, and several other approaches.

In addition, many behavioral studies have proposed measuring the level of fish learning by computational methods, based on fish detection and tracking, however, the biggest challenge of tracking algorithms is the complexity of fish movements during fast swimming captured in video images^{1,4,12,25–31}. However, experiments that involve tracking fish positions in the video during the presentation of stimuli may allow a better analysis of the fully automated training of several adult zebrafish for arbitrary visual stimuli in parallel¹⁸. This way, automatic analysis of laboratory procedures maximizes data reliability, improving research performance and helping to standardize and validate experimental tests⁵.

Some test equipment has already been designed for fish conditioning, for example, a fully automated test system was designed to test aspects of impulse control in adult zebrafish, including hardware and software development^{5,32,33}. In addition, an automated device enabled fast conditioning paradigms for zebrafish in five trials⁷. In another study, a robust self-administration trial of automated opioids for zebrafish, it was possible to measure the search for drugs, showing a characteristic of drug dependence and information on the underlying biological pathways³⁴.

The quantification of behavioral responses can assess different situations in conjunction with stimuli or stressors. Thus, it can be considered a good indicator of the body's responses^{35,36}. Therefore, it is important that the fish conditioning equipment is fully automatic and has a design adjusted to the procedure. A fully automatic procedure can reduce the human bias during the analysis of the research, as many procedures require maintenance of the environment at certain times, such as the control of food, oxygenation or stimuli activated in the tank (lights or sounds). In this, the automation of procedures and analysis of videos to explore the experimental extension is very favorable for research in the behavioral area⁵. By obtaining a standardized training protocol, comparison of results in different experiments and laboratories is facilitated, giving better usability of zebrafish in behavioral research¹⁸.

Although there are several conditioning/training methods and some computational algorithms available for zebrafish behavioral assessment, there are still few complete systems for conditioning and automatic assessment of fish behavior. Typically, these behavioral assessment software are developed separately from the automatic conditioning hardware, limiting themselves to capturing videos at the time of training, for later analysis. Here, we describe the technical development of fully controlled hardware and an automated algorithm that allows for the control of protocols for conditioning and assessing the behavior of the fish, which involves the delivery of food and stimuli, being a tool developed for the analysis of video processing of adult fish in real time. In addition, this tool allows for changing the settings for new tests and can be used for other applications involving the behavior of fish, as well as assessing the behavior for toxicity, sleep, aversion and several others.

Materials and methods

Animals. Forty-three adult zebra fish (mixed sex, size 3 cm ± 0.5 cm) were obtained from a local pet store (São Luís, State of Maranhão, Brazil), being housed in three groups, a group with 11 fish for simple learning (single stimulus), a group with 16 fish for complex learning (two stimuli: vibracall and light) and a control group with 16 fish in total, used for both experiments. The groups of fish were housed in a 22.5L (250 × 200 × 550 mm) opaque glass tank with aerated and filtered water. The fish were housed in a closed system with filtered water (sponge and activated carbon), being given two weeks to acclimatize in the environment before the established training. The water quality was monitored weekly, keeping the temperature at 26 ± 1 °C, pH 7.2 ± 0.3, ammonia 0.00 ± 0.01 ppm, nitrite 0.00 ± 0.01, nitrate ~ 40 ppm and conductivity ~ 1250 µS, with mechanical, biological and chemical filtration. The water was changed (40%) every 10 days to guarantee the quality. The lighting was adjusted in a 12/12 h light/dark cycle^{23,37,38}. The fish were fed four times a day with commercial foods and crushed flakes (38% protein, 4% lipids, Nutricom Pet). In the period of maintenance or acclimation of the fish in the tank, the fish were fed twice a day, ad libitum, but during conditioned training feeding was restricted (~ 2 g each training).

Ethics statement. All experimental procedures with animals followed the ARRIVE³⁹ guidelines and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Maranhão (UFMA), campus of São Luís—MA, Brazil (Protocol nº 23115.006194/2018-01 and Protocol nº 23115.024712/2020-96). All experiments were performed in accordance with relevant named guidelines and regulations. All training was carried out in the same environment where the fish were kept. After the entire experiment, the euthanasia method was used, utilizing an anesthetic solution of benzocaine type 60–70 mg/L of water with subsequent cooling and freezing of the carcass at – 20 °C, discarded according to the protocol of the Bioterium of the University.

Experimental setup. The behavioral system consisted of hardware and software to manage the experimental workflow and video processing. The experimental strategy consisted of carrying out associative learning tasks, with visual and sound stimuli associated with food, in addition to assessing the response of the zebrafish in decision making during conditioning activities. The behavioral modeling of zebrafish groups and the dynamics of fish behavior in different groups were analyzed in this configuration.

Hardware. An experimental rack was designed in a room, having three opaque glass tanks 22.5L of 550 mm × 200 mm × 250 mm (width × height × depth), containing three groups of fish, connected by a computer for automatic control of the training, acclimation, oxygenation and feeding of the fish. The tank was divided into two arenas: oxygenation space (100 mm × 250 mm × 200 mm) and training space (450 mm × 200 mm × 250 mm).

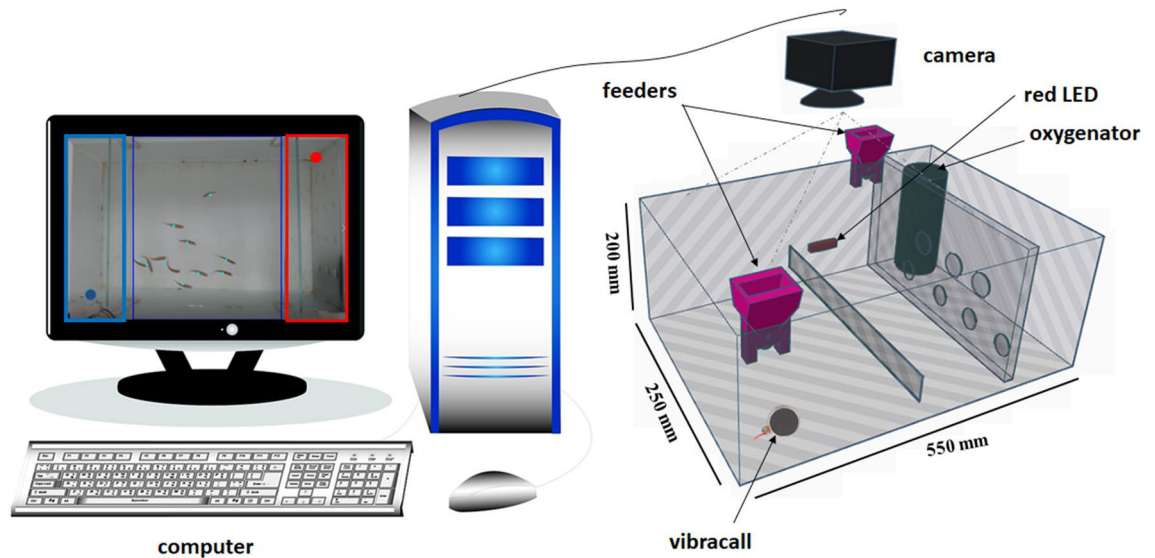


Figure 1. Experimental configuration to measure zebrafish learning. The group of zebrafish swims in a sandblasted glass tank, divided into two feeding arenas. A red LED strip is attached to the external area on the right side of the tank as a light stimulus. And a vibracall was attached to the external area on the left side of the tank. A camera is mounted above the tank, approximately 40 cm.

8 mm holes were created in the internal wall of the tank that separated the two environments, so that the oxygenated water circulated in the fish training environment without bubbles or interference in the video analysis.

The automatic control of the tank was done by microcontrolled components (using Arduino MEGA), controlling the oxygenation of the fish, the ambient light, the light stimulus and the feeder, obeying the schedule of training activities (four times a day). Automatic feeders were produced on the 3D printer, using Acrylonitrile Butadiene Styrene (ABS) filaments, being coupled to the outside and top of the tank. The food was placed in the feeder reservoir and could be dispensed using a servomotor, which turned a gear at the feeder outlet to have a uniform control of the amount of ground feed (about ~2 g).

The internal division in the tank was adjusted according to the activity established at that moment and with the proposed experiments. Thus, the glass partitions (250 mm × 80 mm × 4 mm) were added inside the tank, in order to separate the space from the food, during food conditioning. In addition, a red LED strip was connected during the associative activity for the simple experiment. Two stimuli were adjusted for the complex experiment, red color (spectrum ~663 nm) and vibracall, placed in the external area in the aquarium. Red lighting was chosen based on the sensitivity of the zebrafish, where zebrafish favor red over other colors. However between the green and blue colors, green was the most preferred, with the fish having a strong aversion to the blue color^{13,17,19,40}. For simple conditioning, only one divider was used to separate the food from the remaining space in the tank. And a visual stimulus in red color was offered to the fish during the conditioning phase in the feeding period. Oxygenation was kept on in the tank, but turned off 10 min before the beginning of the tests so that there was no flow of bubbles in the water, being turned on again 10 min after the tests, following a schedule of activities for training, implemented automatically. In experiments that did not consist of food conditioning, the tank had no division and the fish could swim normally in the entire tank. And a single camera was mounted on each tank approximately 40 cm above each tank to capture the videos of the proposed training. The videos were recorded at 30 frames per second with a resolution of 1920X1080 pixels (C920 Logitech camera). The focus of the camera was set manually, adjusting the dimensions of the tank (Fig. 1).

For the control of the hardware, scripts were produced in Matlab and Python for the total control of the automatic conditioning system. This mechanism served to deliver food, turn on and off ambient light, control the oxygen pump and activate stimuli at the set time of the experiments.

Software. The behavioral evaluation algorithm consisted of the following stages: image processing for fish detection and tracking, behavioral modeling and automatic analysis of fish conditioning in the interest of the stimulus (see supplementary file S1).

Detection and tracking. In the fish processing and detection phase, the videos were processed by an algorithm based on YOLOv2 convolutional network^{41–43}. The architecture of the YOLOv2 network consisted of seven convolution layers with a 3 × 3 filter, six layers of Relu, three layers of Max Pooling with size 2 × 2, six layers of batch normalization with size 1 × 1 and two layers of anchor boxes. Table 1 shows the architecture of the YOLOv2 network used to detect fish in the tank. For the training of the YOLOv2 network, a set of images was used containing 365 images referring to previous videos of the fish, where the fish head region was manually marked on all images, being used for learning of the YOLOv2 network for the detection of fish in the tank. Then, the trained net was used to detect the fish during the behavioral experiment. For more details, see the reference by Barreiros et al.⁴³.

Layer	Operation	Filters	Kernel size	Stride	Activations
1	Convolution—ReLU	16	3 × 3	1	480 × 480 × 16
	Batch normalization	16	1 × 1	—	480 × 480 × 16
2	Max pooling	—	—	2 × 2	240 × 240 × 32
	Convolution—ReLU	32	3 × 3	1	240 × 240 × 32
	Batch normalization	32	1 × 1	—	240 × 240 × 32
3	Max pooling	—	—	2 × 2	120 × 120 × 64
	Convolution—ReLU	64	3 × 3	1	120 × 120 × 64
	Batch normalization	64	1 × 1	—	120 × 120 × 64
4	Max pooling	—	—	2 × 2	60 × 60 × 128
	Convolution—ReLU	128	3 × 3	1	60 × 60 × 128
	Batch normalization	128	1 × 1	—	60 × 60 × 128
5	Convolution—ReLU	128	3 × 3	1	60 × 60 × 128
	Batch normalization	128	1 × 1	—	60 × 60 × 128
6	Convolution—ReLU	128	3 × 3	1	60 × 60 × 128
	Batch normalization	128	1 × 1	—	60 × 60 × 128
7	Convolution—ReLU	24	1 × 1	1	60 × 60 × 24
	Anchor	24	—	—	60 × 60 × 24

Table 1. YOLOv2 network architecture parameters for zebrafish detection.

To adjust the detection accuracy of the YOLOv2 network and establish the tracking of fish during activities in the tank, a simple Kalman filter was previously implemented⁴³, and configured to estimate the coordinates of the fish in the detection failure, during the times of occlusions by other fish during swimming, thus, the loss of detection could be recovered. Then, after estimating the position of the fish, a cost function was adjusted and minimized, associating the estimated detection with the actual detection of the YOLOv2 network. In case of loss by the detector or occlusion, the Kalman filter adjusts the new estimated position, detecting each fish in the consecutive frames to be linked when finding the shortest distance and the angle of the fish's head direction in the detection of the YOLOv2 and in the estimation of the Kalman filter, thus associating it with the corresponding fish and allowing the creation of paths for each fish in the frame over time. The identification of the fish is initially chosen automatically, but does not guarantee that the following videos will detect the same fish. Thus, from these steps, it was possible to measure the behavioral levels of the fish individually and separated into groups during the behavioral testing activities, such as polarization, group dynamics, distance covered, speed and tracking of the route of the shoal.

Behavioral modeling of zebrafish. To assess the complex behavior of the fish in group and individually, we have implemented some evaluation metrics, as described below.

Polarization. To measure the degree of coordination of the group of fish in each frame, the polarization pol was used, which quantifies the intensity of the parallel orientation in a school of fish, defined by Eqs. (1), (2) and (3):

$$pol(t) = |M(t)| \quad (1)$$

$$M(t) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \hat{v}_k(t) \quad (2)$$

$$\hat{v}_k(t) = \frac{v_k(t)}{|v_k(t)|} \quad (3)$$

where $pol(t)$, is the arithmetic mean of the unit direction of all fish in frame t ; $\hat{v}_k(t)$ is the unit direction of fish k in frame t ; $v_k(t)$ is the velocity of the fish k in frame t ; N the total number of fish in the group.

Speed. To evaluate the locomotion of the fish in the tank and the processing speed of the acquired information, the scalar speed was used, calculated from the relation of its displacement in relation to time, given by Eq. (4).

$$vel_k(t) = \frac{\sqrt{(x_{k,t} - x_{k,t-1})^2 + (y_{k,t} - y_{k,t-1})^2}}{\Delta t} \quad (4)$$

where $vel_k(t)$ is speed of the k-th head of the fish in frame t , $x_{k,t}$ and $y_{k,t}$ the x and y position k-th fish head in frame t , $x_{k,t-1}$ and $y_{k,t-1}$ the x and y position k-th fish head in frame $t - 1$ and Δt is the time in seconds between frame capture.

Fish interaction network. Collective behavior is the result of different dynamics and is sometimes compared to living systems. When a group of fish move, these animals usually process information to coordinate their movements. Individuals respond dynamically and can make good decisions as a collective to changing environments⁴⁴. Recent studies in information theory have started to apply methods to quantify this distributed processing^{45–47}. Here, we represent the school's interaction network as a directed graph, using mutual information data to quantify this distributed processing. In order to calculate the influence of a fish's movement in relation to the other fish in the tank, the variation of the direction of the fish head for the duration of the established time is utilized. It is expected that the fish with the highest rate of interaction with the other fish in the tank can influence the dynamics of the school. To measure the information between a fish and its neighbor, Mutual Information is used, as described in Niizato et al.⁴⁶. The values of mutual information $MI(.,.)$ were calculated in pairs with all combinations of fish, and the origin and destination fish ratios are stored in a matrix by Eq. (5).

$$MutualInfo = \begin{bmatrix} 0 & MI(\Phi_1, \Phi_2) & \dots & MI(\Phi_1, \Phi_N) \\ MI(\Phi_2, \Phi_1) & 0 & \dots & MI(\Phi_2, \Phi_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ MI(\Phi_N, \Phi_1) & MI(\Phi_N, \Phi_2) & \dots & 0 \end{bmatrix} \quad (5)$$

where *MutualInfo* is the matrix that stores the relationship of mutual information in relation to all pairs of fish, the value of all diagonal elements is equal to zero and $MI(.,.)$ is the mutual information function. Where Φ_k is the time series of the variation in the direction of the head of the k-th fish and N is the total number of fish. Mutual information is symmetrical, that is, the value of $MI(\Phi_1, \Phi_2)$ is equal to $MI(\Phi_2, \Phi_1)$.

Automatic conditioning analysis. To analyze the conditioning of the fish in the videos, the image of the tank was divided into arenas for simple conditioning (feeder and swimming area) and four arenas of equal size for complex training in the shape of a cross, where each arena corresponded to a 22.5 cm × 12.5 cm rectangle (Fig. 3F), one area corresponds to the red light stimulus and another to the vibracall stimulus. Then, fish detection was automatically established during conditioning in the tank's region of interest. Two types of videos were automatically saved in a folder, one video with the detection mark and the other without any type of detection, for later analysis. In addition, a heat map was created containing the locations of the fish on the frames over time. The heat map is a matrix, where each cell represents a pixel batch of the area to be analyzed. The colors of the heat map indicate the intensity that a given event occurred in the batch. In this case, the aquarium (45 cm × 25 cm, width × depth) was used as a 10 × 10 matrix, dividing its surface into pixel lots, equivalent to 4.5 cm and 2.5 cm each lot. Each portion is represented by a cell in the heat map matrix and the intensity of the cell is defined by the number of fish head detections in a batch, from a set of frames in the video. After counting occurrences of fish detection in the flocks, the heat map is subjected to a low-pass filter (Gaussian filter) to soften the map image.

Experiment 1: evaluation of simple conditioning with a single stimulus. For simple conditioning, fish ($n = 11$) had to associate a single light stimulus to the feeding period. The tank was adjusted to contain a divider that separated the food from the remaining space of the tank. Then, a red LED strip (spectrum ~ 663 nm) was turned on 30 s before the food was poured from the feeder, the red LED was located on the same side of the feeder in the tank. The conditioning of the zebrafish consisted of four daily sessions with an interval of 3 h during the biological experiment (the time was defined in order to obtain the same interval between all attempts). All experiments were established at the same time (8:00 am, 11:00 am, 2:00 pm and 5:00 pm) every day, to avoid any daytime effects, configured to the automatic conditioning system. The training took place at the time of feeding to reinforce the association with the stimulus. The result of laboratory procedures on the behavior of zebrafish was tested against the control group (undisturbed fish). The behavioral assessment of the fish consisted of intervals with two minutes of video recording at each stimulus, divided into four consecutive periods: 30 s before the light stimulus, 30 s during the light stimulus, 30 s during feeding and 30 s after the light stimulus was turned off. Simple training was established in just one day, containing four attempts at appetite conditioning.

Experiment 2: evaluation of complex conditioning with two stimuli. For complex conditioning, a new group of fish ($n = 16$) was subjected to conditioning containing two stimuli in the feeding period: light and vibracall. The tank was adjusted to contain a glass partition placed at the bottom of the aquarium to separate the two sides of the zebrafish food conditioning and to make access to the feeder more difficult. In this experiment, a vibracall and a red LED light were used. The red LED was located on the bottom of the aquarium, located on the right side, whereas the vibracall was located on the left side of the aquarium, positioned on the outside and at the bottom of the aquarium (see Fig. 1). Each stimulus corresponded to one side of the dump of food in the feeder, and the fish would need to know which color corresponded to the correct side of the feed at that time. Thus, two automatic feeders were adjusted to synchronize the feed with the light stimulus. The behavioral assessment of the fish in this training was analyzed for one minute of video recording at each stimulus, divided into four observatory periods: 20 s before the light stimulus, 15 s during the light stimulus, 15 s during feeding and 20 s after the stimulus was turned off. The complex training was established by 10 attempts for each stimulus, in alternate periods so that the fish did not learn the sequence of the stimuli. Fish that managed to stay close to the

enclosure in a timely manner, were responding to stimuli at that time. Thus, the zebrafish was considered to be successfully conditioned when it was directed to the food arena during the light phase that preceded the feeding. And, all experiments were established at the same time (8 am, 11 am, 2 pm and 5 pm) automatically by the conditioning system, in order to avoid any daytime effects. The fish considered conditioned were only the fish that were in an area with a dimension of 12.5 cm × 22.5 in the corner corresponding to the stimulus (see Fig. 3F).

Experiment 3: behavioral modeling in conditioned fish. During complex conditioning (containing two stimuli), the polarization of the fish group during the established attempts was calculated to observe the change in the behavior of the group when they were stimulated in relation to the control group (not stimulated). In addition to the measurement of polarization, the fish were tracked, measuring the speed and the average distance of the fish traveled in the tank, thus, it was observed the level of change in the behavior of the fish and their interest in relation to the stimulus. The analyses were made only when the stimulus was lit, prior to feeding. In addition, for comparative purposes, we group the fish in different sizes 3, 6, 8, 11 and 16 to verify the behavior by different groups, at the moment the light was turned off.

Experiment 4: behavioral dynamics of zebrafish groups. To measure the influence of a fish's movement in relation to the other fish in the tank, a video set was used in which the fish were grouped in different sizes (3, 5, 8, 11 and 16 (see supplementary information S2)), freestyle, referring to experiment 2. In addition, videos referring to the conditioning of fish with two stimuli were used in all attempts. Thus, it was verified how the fish could influence the dynamics of the group or if only one fish could coordinate the same group during free swimming.

Control. For the control group, a third new group was formed by 16 zebrafish, the light and vibracall stimuli were offered to the tank in random periods, different from the feeding period, observing the behavior of the fish during the lit light stimulus. All procedures were performed in the same setting tank as the fish groups.

Statistical analysis. The conditioned response of the fish to the consecutive stimuli on the experimental day was compared. Statistical analyzes of the data were performed using SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA) version 25.0. Graphs were performed using PRISM8 (Graph-Pad) software. The Kolmogorov–Smirnov test was used to verify the normality of the data. The ones used for non-parametric statistics were: Mann–Whitney U-tests (MW), to compare groups of fish conditioned with a single stimulus; Friedman (H) tests were used to assess the progression of each group. The parametric statistics were used to compare the groups of fish stimulated with two stimuli (red light and vibracall), using the Student t test (Test t) to compare the number of fish located in the area defined for conditioning in the tank, in addition to speed, distance and polarization of groups of fish conditioned with two stimuli. One-Way ANOVA (F) was used to assess the progression of each group in all periods. For all tests, the alpha level was adjusted to 0.05. The response capacity of the zebrafish was measured as the average increase in the number of zebrafish in the food arena after the initiation of the light stimulus.

Results

Simple conditioning. In the first experiment, 11 adult zebrafish were used, conditioned with a single red stimulus during the feeding period. The experimental results of this study are shown in Fig. 2. In the first attempt, during the period of the LED light off (Fig. 2A), there was no association between the group of trained fish and the control group (MW: $U = 418.5$; $p = 0.504$). However, the position of the fish before the light stimulus differed in the other attempts in the control group (Friedman: $H = 50.61$; $p < 0.001$) and in the stimulated group (Friedman: $H = 60.18$; $p < 0.001$). The fish progressed a lot in other attempts of associative learning with a single stimulus (red LED) (Fig. 2B), managing to quickly associate the conditioned stimulus from the second attempt (30 s during the connected stimulus), between the stimulated group and the control group (trial 1: MW: $U = 307.50$; $p = 0.025$; trial 2: MW: $U = 258.0$; $p = 0.003$; trial 3: MW: $U = 437.0$; $p = 0.843$; trial 4: MW: $U = 270.0$; $p = 0.007$). The number of fish increased after the light signal during the trials; both in the stimulated group and in the control group (Friedman in the stimulated group: $H = 71.76$; $p < 0.001$; Friedman in the control group: $H = 18.78$; $p < 0.001$).

In addition, initially, during the feeding period (Fig. 2C), most fish were unable to access the food compartment in a timely manner, however, as each attempt was made, the fish learned the route to access the food arena, passing under the divider demarcated at the precise time. There was a significant difference in the progression of conditioning attempts between the stimulated group and the control group (trial 1: MW: $U = 69.00$; $p < 0.001$; trial 2: MW: $U = 117.5$; $p < 0.001$; trial 3: MW: $U = 298.50$; $p < 0.024$; trial 4: MW: $U = 65.0$; $p < 0.001$). And there was a change in the behavior of the fish during the attempts, both in the stimulated group and in the control group (Friedman of the stimulated group: $H = 88.72$; $p < 0.001$; Friedman of the control group: $H = 10.728$; $p < 0.013$).

After the training ended, at each attempt, the fish remained in the reserved space waiting for more food, suggesting that the fish understood that there was a space reserved for food, and expected more food to be released after the light was turned off (Fig. 2D). Therefore, there was a significant difference between the stimulated group and the control group (trial 1: MW: $U = 204.00$; $p < 0.001$; trial 2: MW: $U = 8.0$; $p < 0.001$; trial 3: MW: $U = 0.00$; $p < 0.001$; trial 4: MW: $U = 0.00$; $p < 0.001$). In addition, there was a change in fish behavior during attempts for the stimulated group and the control group (Friedman in the stimulated group: $H = 88.19$; $p < 0.001$; Friedman in the control group: $H = 20.96$; $p < 0.001$).

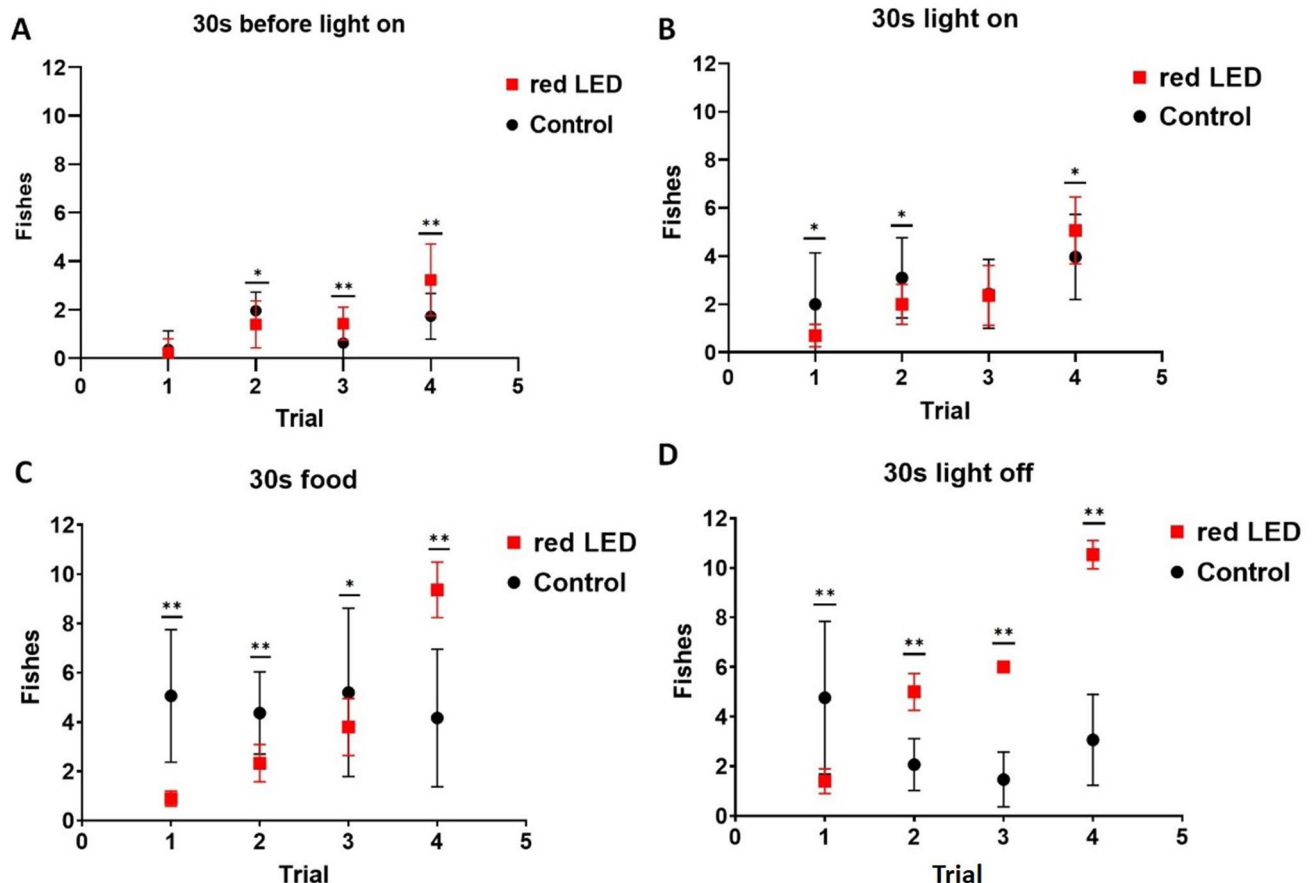


Figure 2. Zebrafish simple appetite conditioning responses using one stimulus: Red LED light. (A) Number of fish that were in the eating behavior before the light was turned on, (B) while the light was on, (C) during the feeding period and (D) after the stimulus is turned off. The horizontal lines of each group denote the mean $\pm$ SD and the asterisks on the brackets indicate statistical difference in comparison to the frequency of fish between the attempt and the control group by Mann–Whitney U-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Complex conditioning: red light and vibracall. In the second experiment, 16 new zebrafish were used for the training considered complex, where the fish should recognize two stimuli: LED light (red color) and vibration, in order to make a correct decision to go to the side of the corresponding tank (right or left side) to the triggered stimulus. There were 20 total attempts, alternating stimuli (red LED and vibracall) during training.

Before the red LED lights up (Fig. 3A), the behavior of the fish was observed for comparative purposes. There was a progression of behavior in a non-linear way between the initial attempt (trial 1: 6.5 ± 3.8 (mean $\pm$ SD), variation of 58.56%) and the last attempt (trial 10: 1.58 ± 0.43 (mean $\pm$ SD), variation of 34.91%), t test = 14.696, $df = 149$, $p < 0.0001$, but there was a change in the behavior of the fish between all attempts ($F_{9,13} = 218.0$, $p < 0.0001$). However, during the period in which the red LED was on, the zebrafish showed a strong change in behavior between the stimulated group and the control group in all attempts (trial 1: test $t = -43.77$, $p < 0.0001$; trial 2: test $t = -51.51$, $p < 0.0001$; trial 3: test $t = -29.57$, $p < 0.0001$; trial 4: test $t = -13.09$, $p < 0.0001$; trial 5: test $t = -28.25$, $p < 0.0001$; trial 6: test $t = -17.08$, $p < 0.0001$; trial 7: test $t = -19.79$, $p < 0.0001$; trial 8: test $t = -28.45$, $p < 0.0001$; trial 9: test $t = -33.31$, $p < 0.0001$; trial 10: test $t = -33.71$, $p < 0.0001$), the fish associated the stimulus to the feeding period quickly, shifting to the space reserved for feeding (Fig. 3F, red area), showing that the behavior of the fish has changed in all attempts, having a significant progression during training ($F_{9,13} = 11.55$, $p < 0.0001$) (Fig. 3B).

The results of the tests with the vibration are shown in Fig. 3C and D. Before the vibration was triggered (Fig. 3C), the fish were only a few times in the food compartment (Fig. 3F, green area), with a non-linear behavior between the initial attempt (trial 1: 4.29 ± 1.44 (mean $\pm$ SD), variation of 33.55%) and the last attempt (trial 10: 8.22 ± 2.96 (mean $\pm$ SD), variation of 36.01%), t test = 15.424, $df = 149$, $p < 0.0001$, but there was a change in the behavior of the fish between all attempts ($F_{9,13} = 180.0$, $p < 0.0001$). In the period stimulated with activated vibration (Fig. 3D), the fish were able to associate the vibracall stimulus with the feeding period, with a significant change in the behavior of the stimulated fish in relation to the control group in all attempts (trial 1: test $t = 7.69$, $p < 0.0001$; trial 2: test $t = -23.50$, $p < 0.0001$; trial 3: test $t = -10.97$, $p < 0.0001$; trial 4: test $t = 16.03$, $p < 0.0001$; trial 5: test $t = 7.43$, $p < 0.0001$; trial 6: test $t = -9.85$, $p < 0.0001$; trial 7: test $t = -23.38$, $p < 0.0001$; trial 8: test $t = -14.13$, $p < 0.0001$; trial 9: test $t = -37.08$, $p < 0.0001$; trial 10: test $t = -10.20$, $p < 0.0001$). In all training periods, during the triggered stimulus, there was a significant progression in the behavior of the fish ($F_{9,13} = 236.5$, $p < 0.0001$).

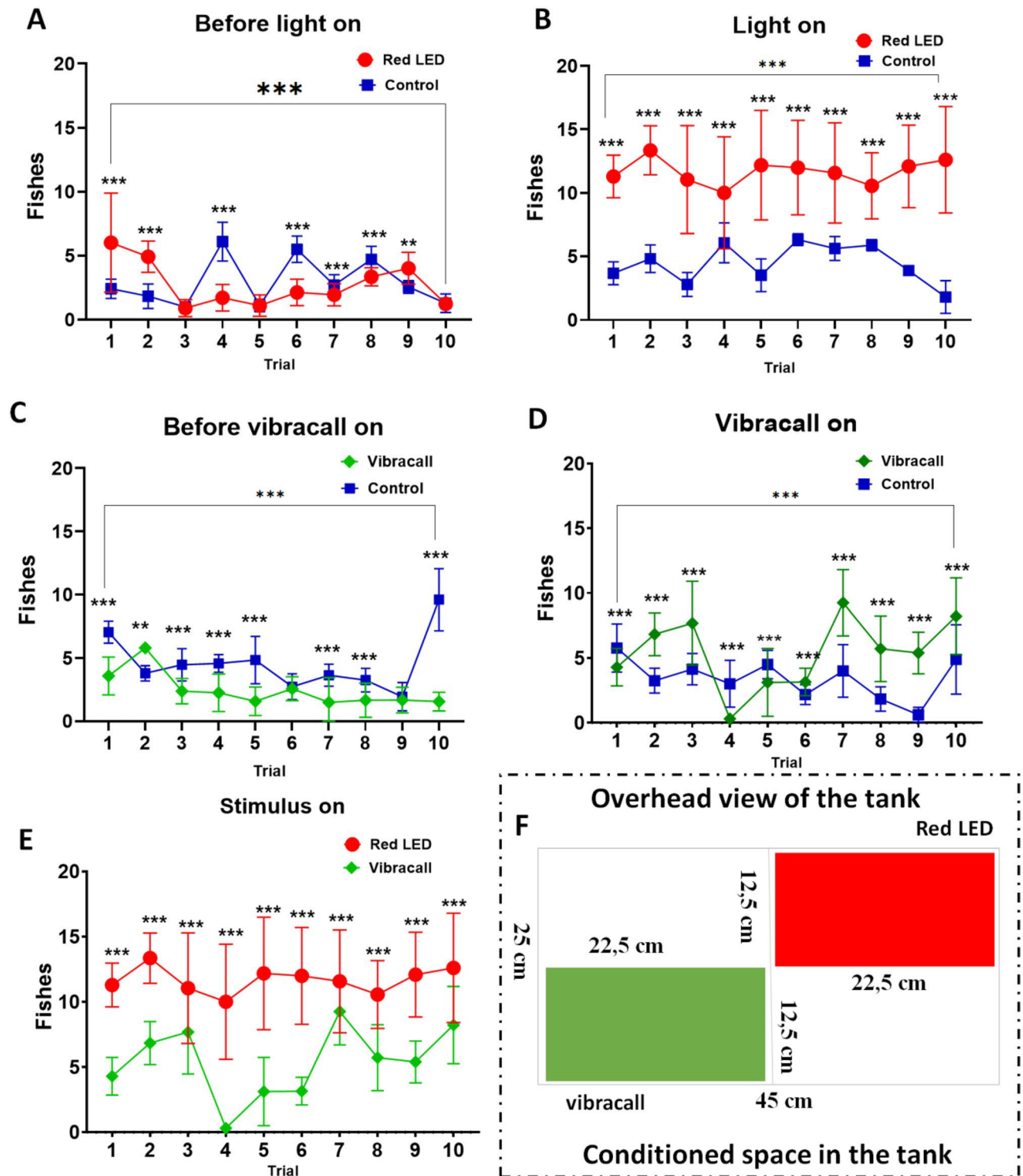


Figure 3. Responses of zebrafish complex appetitive conditioning using two stimuli: red LED light and vibration. (A) Number of fish that were in the feeding behavior before the light was turned on. (B) Number of fish conditioned with red LED light stimulus during the attempts. (C) Number of fish in the food compartment before the vibracall stimulus is activated. (D) Number of fish conditioned with vibracall stimulus during the attempts. (E) Comparison of the number of fish conditioned by light and vibracall. (F) Top view of the tank referring to the conditioning area (red area: red LED and green area: vibracall). The horizontal lines of each group denote the mean $\pm$ SD and the asterisks on the brackets indicate statistical difference in comparison with the frequency of fish between the attempt and the control group by student t test (* p < 0.05; ** p < 0.001, *** p < 0.0001).

It is observed that the zebrafish learned to associate the red light stimulus more quickly than the vibration stimulus (Fig. 3E). There was a strong significant difference in all trials (trial 1: test $t = 75.92$, $p < 0.0001$; trial 2: test $t = 28.89$, $p < 0.0001$; trial 3: test $t = 10.01$, $p < 0.0001$; trial 4: test $t = 28.39$, $p < 0.0001$; trial 5: test $t = 25.05$, $p < 0.0001$; trial 6: test $t = 33.28$, $p < 0.0001$; trial 7: test $t = 7.36$, $p < 0.0001$; trial 8: test $t = 27.79$, $p < 0.0001$; trial 9: test $t = 29.87$, $p < 0.0001$; trial 10: test $t = 21.21$, $p < 0.0001$). In addition, the behavior of the fish appeared to be more stable in all attempts while the light was on (mean $\pm$ SD: 11.67 ± 0.98 , variation of 8.45%) than stimulation by vibracall (mean $\pm$ SD: 5.39 ± 2.74 , 50.76% change).

Change in the behavior of fish conditioned with two stimuli. The degree of coordination of the zebrafish group was measured to quantify the intensity of the parallel orientation of the fish school. In all attempts at conditioning using the red light stimulus, we found a greater polarity between the zebrafish groups stimulated in relation to the control group (trial 1: test $t = 3.21$, $p = 0.002$; trial 2: test $t = 1.077$, $p = 0.283$; trial 3: test $t = 11.76$, $p < 0.0001$; trial 4: test $t = 10.47$, $p < 0.0001$; trial 5: test $t = 2.10$, $p = 0.037$; trial 6: test $t = 7.59$, $p < 0.0001$; trial 7: test $t = 1.92$, $p = 0.057$; trial 8: test $t = 7.81$, $p < 0.0001$; trial 9: test $t = 10.50$, $p < 0.0001$; trial 10: test $t = 4.41$, $p < 0.0001$) (Fig. 4A). However, the polarization of the fish during the connected vibracall seemed to be more variable than in the red stimulus. In some trial attempts there were no significant differences between the stimulated group and the control group (trial 6: test $t = -1.13$, $p > 0.05$; trial 7: test $t = 0.757$, $p > 0.05$) (Fig. 4B).

Fish stimulated with the red LED stimulus were faster in all conditioning attempts compared to the unstimulated group (trial 1: test $t = 24.01$, $p < 0.0001$; trial 2: test $t = 25.46$, $p < 0.0001$; trial 3: test $t = 23.64$, $p < 0.0001$; trial 4: test $t = 16.022$, $p < 0.0001$; trial 5: test $t = 18.39$, $p < 0.0001$; trial 6: test $t = 19.79$, $p < 0.0001$; trial 7: test $t = 19.60$, $p < 0.0001$; trial 8: test $t = 24.52$, $p < 0.0001$; trial 9: test $t = 25.39$, $p < 0.0001$; trial 10: test $t = -5.26$, $p < 0.0001$), the zebrafish were able to access the area marked for fast-progress feeding, showing that the fish understood that it was the period prior to feeding ($F_{9,13} = 11.11$, $p < 0.0001$) (Fig. 4C). However, the fish stimulated by vibracall showed some instabilities in the speed covered in relation to the control group, and in some attempts they did not present significant differences (trial 5: test $t = -0.028$, $p = 0.978$; trial 9: test $t = -1.87$, $p = 0.063$), but there was a change in behavior during all attempts ($F(9, 1490) = 70.03$, $p < 0.0001$) (Fig. 4D). In addition, stimulated fish traveled more through the tank during stimulated conditioning attempts compared to fish in the control group ($F_{3,36} = 53.48$, $p < 0.0001$) (Fig. 4E).

Then, we tested how the size of the fish group ($N = 3, 6, 8$ and $11, 16$) affects the behavior inside the tank (Fig. 5A). We noticed that the polarization decreases as the groups are increased, during the free swim. Thus, the larger groups showed low and rapidly variable polarization (group with $N = 3$, mean $\pm$ SD: 0.466 ± 0.2643 , variation of 56.69%; group with $N = 6$, mean $\pm$ SD: 0.427 ± 0.18 , variation of 42.73%; group with $N = 8$, mean $\pm$ SD: 0.288 ± 0.132 , variation of 45.81%; group with $N = 11$, mean $\pm$ SD: 0.262 ± 0.174 , variation of 66.64%; group with $N = 16$, mean $\pm$ SD: 0.226 ± 0.11 , variation of 52.15%), with significant differences as the group of fish increased in size ($F_{4,3} = 204.6$, $p < 0.0001$). Figure 5B–F show the zebrafish freestyle traces in different groups, respectively. Note that fish in smaller groups have firmer clusters and more crowded swimming.

Exploration in the tank. The heat map developed based on the spatial position of the fish in the periods of complex training (before and during the connected stimuli), showed the fish's intention during the attempts. For comparative purposes, in Fig. 6, there are the heat maps of the red light training (feeder positioned on the right side of the aquarium, Fig. 6B, the vibracall (feeder positioned on the left side of the aquarium, Fig. 6D) and the control groups (Fig. 6A,C), corresponding to attempts 1 to 10. It is observed that the fish changed the behavior during the consecutive attempts. Thus, during the period of the red light on Fig. 6B, most fish moved to the right side waiting for food. However, in the period when the vibracall was initially activated, the fish seemed to swim more confused to position themselves on the side corresponding to the stimulus (left side, Fig. 6D, and only in attempt 7 did the fish learn the correct location to wait for food.

Interaction network in zebrafish. To evaluate the processing of information distributed among the fish in the tank, mutual information was used, the difference in the angle of the fish's head during the movement between the frames. Figure 7 shows the behavioral dynamics of the school, the arrow between the nodes indicates that the fish triggered a locomotor change, and the thickness of this arrow is the value of the measure of mutual information between a pair of fish, measured by the frequency of interactions between fish. Thus, the most active fish influence the behavior change of the least active fish. It is observed that the groups with larger quantities of fish seemed to be more stable in the behavior change (groups with 8 and 11 fish, Fig. 7C,D), while the groups with smaller quantities of fish presented a greater change in behavior (Fig. 7A,B). In addition, at least one fish in each group changes the interaction with the other fish, which can be considered the dominant fish in the school. Evaluating the communication of the group of fish during the conditioned training (group with 16 fish, supplementary file), it was observed that during the conditioning period by the red light, the fish seemed to have more stable interactions in relation to the conditioning period with the vibracall, suggesting that more fish influenced the dynamics of the behavior of others to associate the stimulus with food (see Figure S2).

Discussion

In this study, a fully automatic behavioral assessment system was developed to measure the zebrafish response in two behavioral perceptions: simple and complex conditioning. The environment automatically delivered stimuli and food during a zebrafish conditioning task.

In addition, the developed algorithm verified the videos captured from the established task, analyzing the fish individually and in groups, presenting an assessment of the behavioral dynamics of the conditioned fish. Although there are some automatic zebrafish conditioning systems^{5–7,48–52}, it is important to develop adjustable

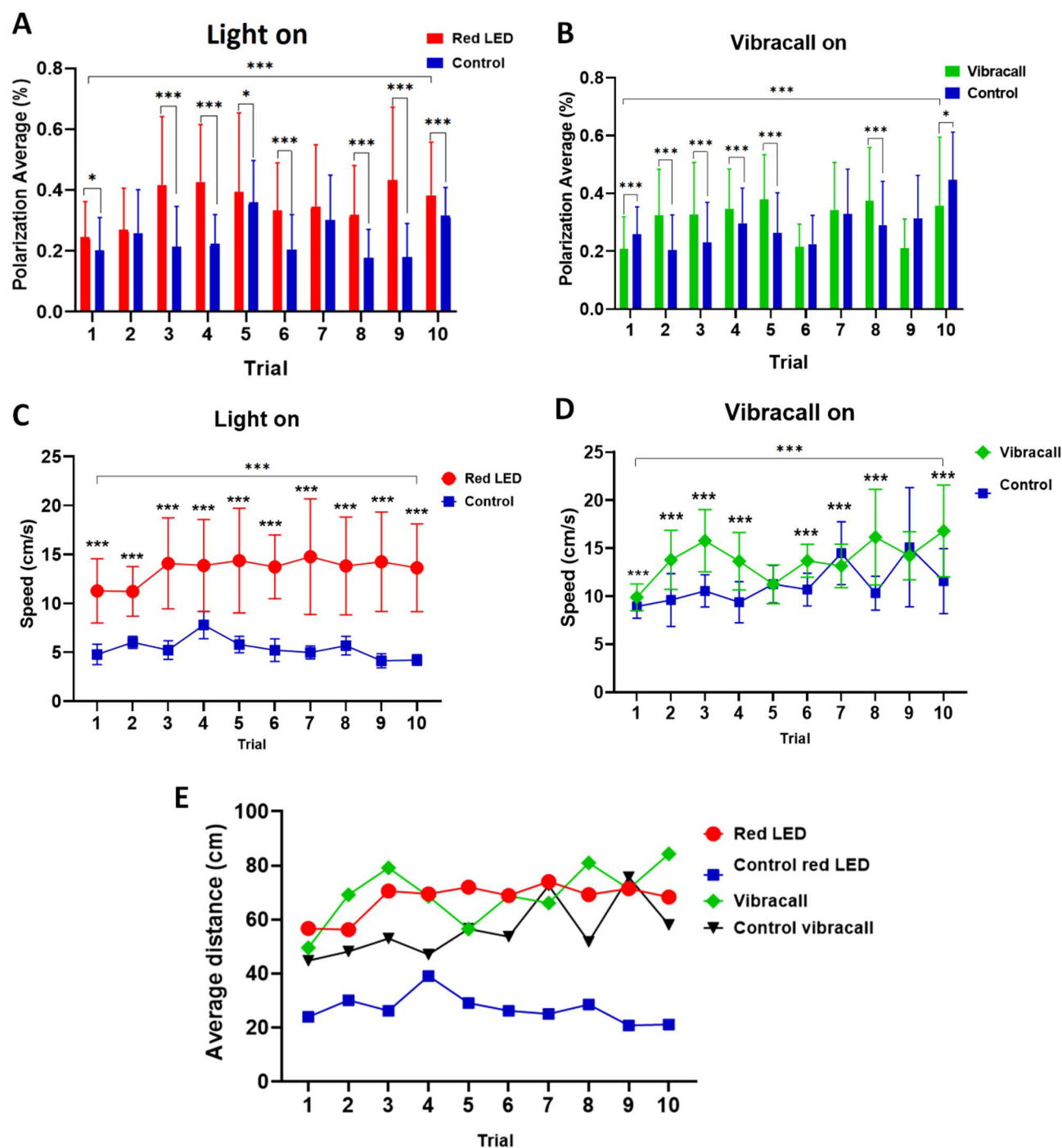


Figure 4. Zebrafish group behavior responses stimulated with red LED light and vibration. (A) Average polarization of the zebrafish groups during attempts at conditioning with red light and control group. (B) Average polarization of the zebrafish groups during attempts at conditioning with vibracall and control group. (C) Average speed covered by the zebrafish groups during conditioning with red light and control group. (D) Average speed traveled by the zebrafish groups during conditioning with vibracall and control group. (E) Relation of the distance traveled between the groups of fish stimulated with light, vibracall and control. The horizontal lines of each group denote the mean $\pm$ SD and the asterisks on the brackets indicate statistical difference in comparison with the frequency of fish between the attempt and the control group by student t test (* p < 0.05; ** p < 0.001, *** p < 0.0001).

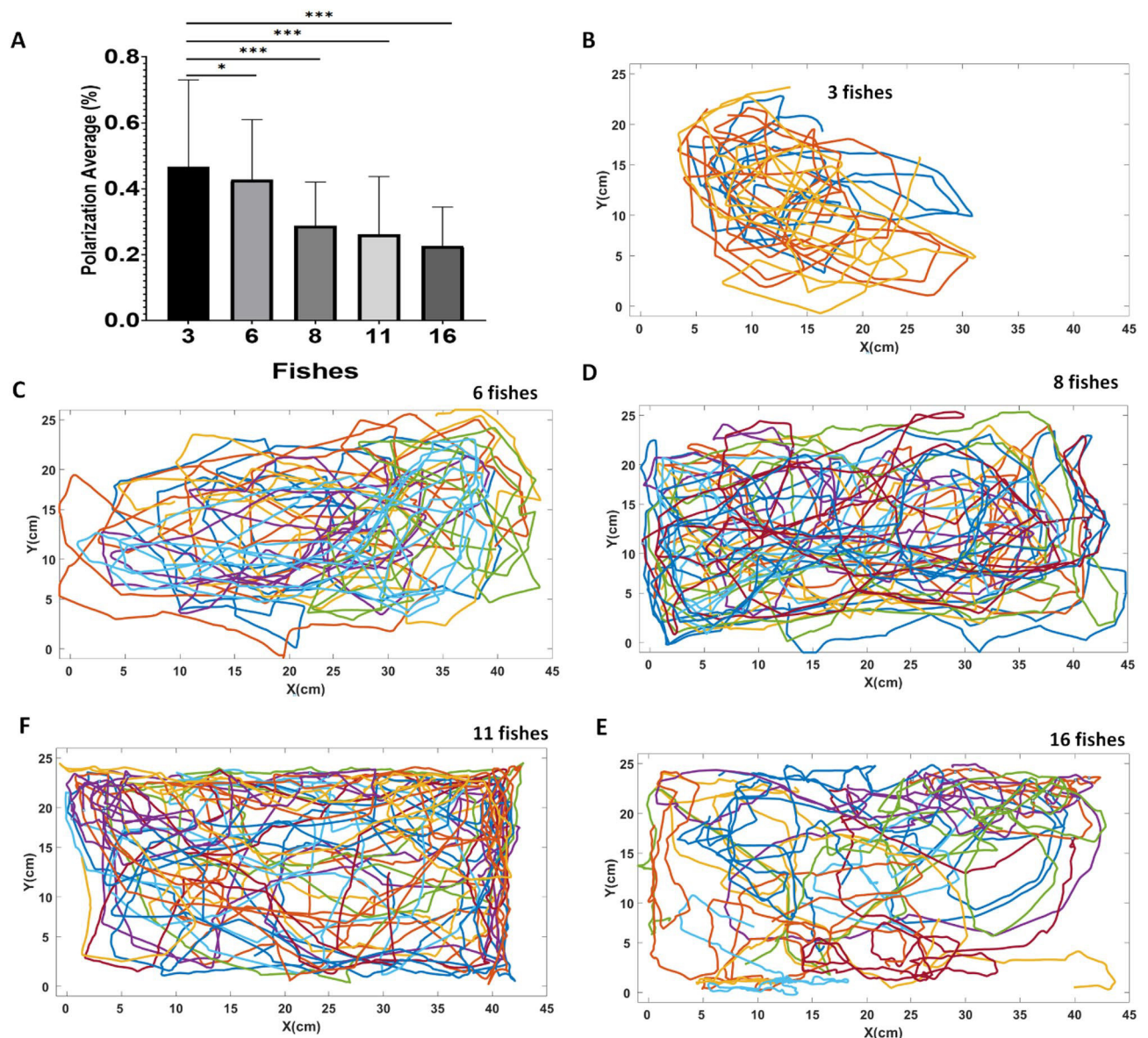


Figure 5. Polarization in groups (N = 3, 6, 8, 11 and 16 fishes) of different sizes of zebrafish. The horizontal lines of each group denote the mean $\pm$ SD and the asterisks on the brackets indicate statistical difference in comparison with the frequency of fish between the attempt and the control group by student t test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

equipment for the automated conditioning protocol. Usually, several behavioral analysis algorithms are developed independently, such as the available tracking software^{4,12,25–31}.

After processing the data, our results demonstrate that the zebrafish learned quickly in simple conditioning, which made an effective association between a conditioned light stimulus and a food reward. In this way, the zebrafish was able to learn from the second experimental attempt at appetizing conditioning (Fig. 2). However, another survey with similar devices showed that the zebrafish learned with at least five daily training attempts⁷. In the most complex assessment, the zebrafish encountered difficulties in some attempts with the vibracall stimulus during the association of the stimulus triggered to the corresponding compartment. However, they were successful in relating the stimulus to a red LED (Fig. 3). Studies show that zebrafish are able to differentiate colors^{13,17,19}, and here, that the zebrafish can learn properly from red LED light stimuli.

Previous studies have shown that zebrafish can form double associations (stimulus and environment). In this, the fish can associate both the triggered stimulus time with a food reward and between the reward and its location^{7,26,51}. In this way, we divided the aquarium area into four regions, two areas being considered for conditioning (Fig. 3F). This strategy was used to avoid bias in the analysis of the results. Furthermore, it is still not entirely clear whether the zebrafish formed a cognitive map of the environment or just formed associations between a limited space for food (such as the area of the food compartment) and the location of the feeder^{7,26}. In this study, in simple conditioning, the fish started to move constantly to the delimited arena, from the second

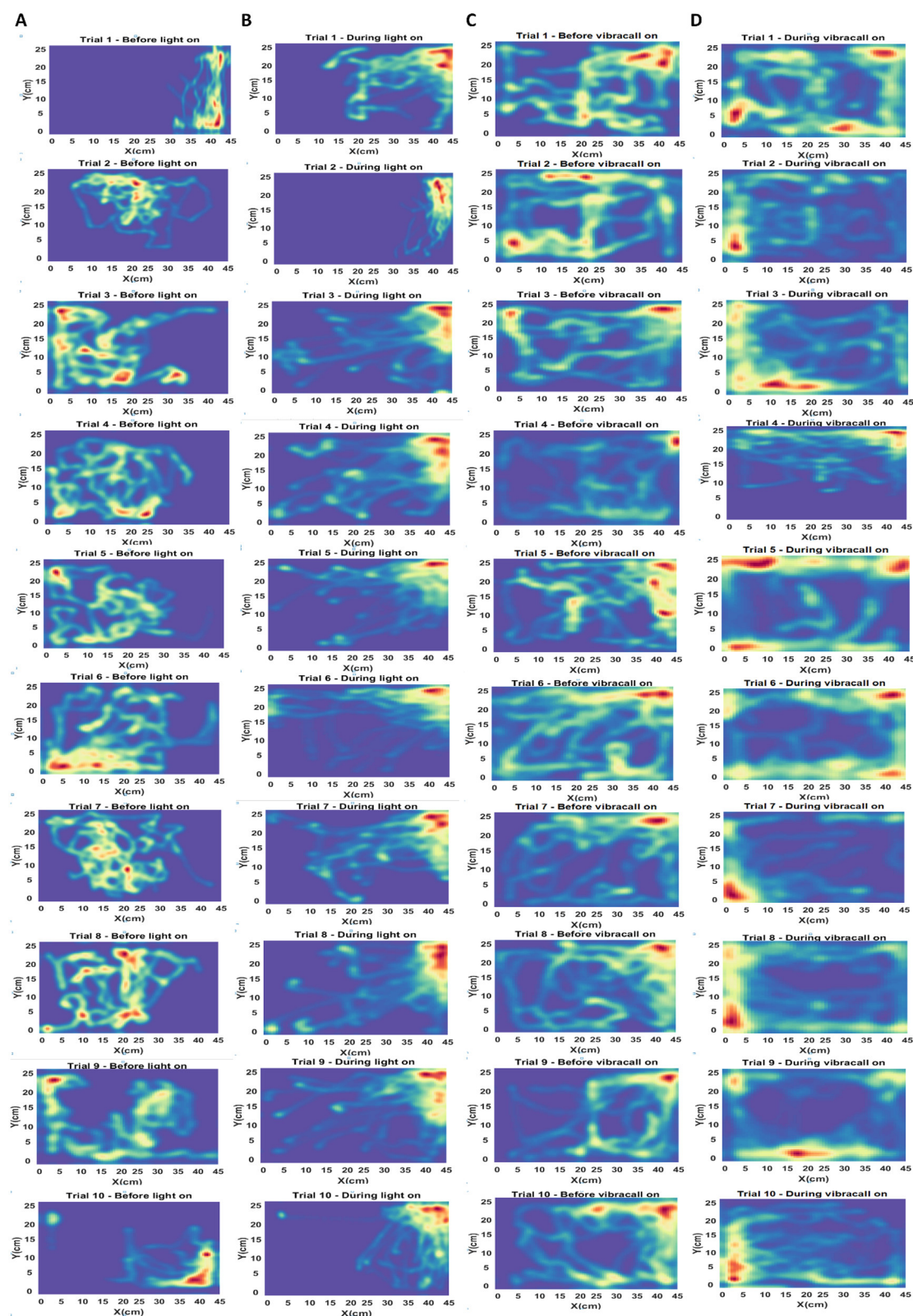


Figure 6. Thermal maps of the zebrafish's location during complex conditioning (red and vibracall). The heat map contains records of the zebrafish's location during training. At the moment when the stimulus was triggered, most fish moved to the delimited area of each stimulus, being the right side for the red LED light stimulus and the left side for the vibracall stimulus. (A) location of the fish before the red LED light was on, (B) location of the fish while the red LED light was on, (C) location of the fish before the vibracall stimulus on and (D) location of the fish during the vibracall stimulus on.

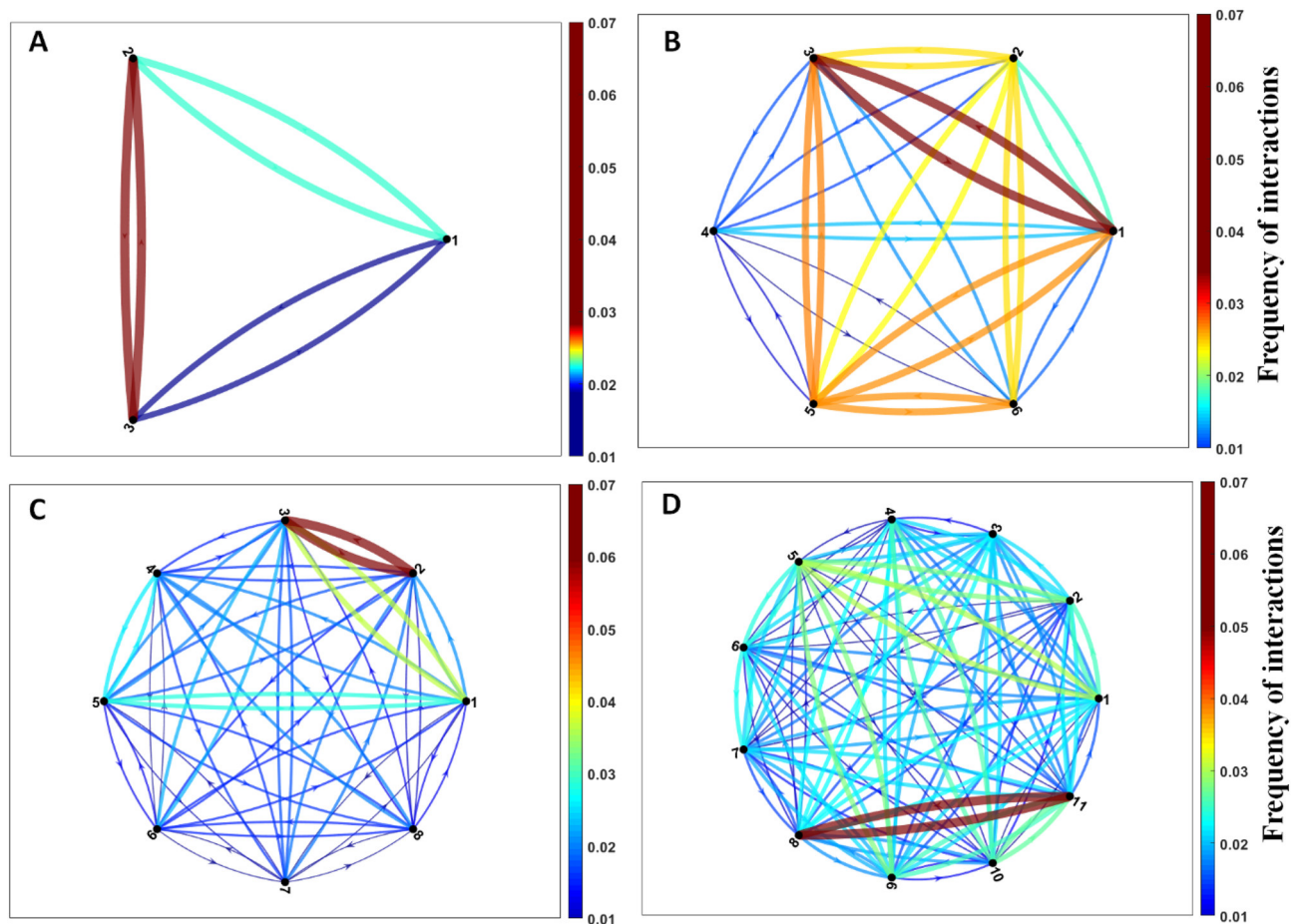


Figure 7. Network of zebrafish shoal interactions. Mutual information was measured from the difference in the angle of the fish's head during movement in the video. Two arrows connect two fish during locomotor activity, being the response of the influence of one fish to another target fish. The line thickness represents the frequency of interactions. Frequency of interactions of the group with three fish (A), six fish (B), eight fish (C) and eleven fish (D).

attempt, waiting for more food (Fig. 3). In the most complex training, however, the fish quickly associated to the light stimuli in all attempts, having more difficulties with the vibracall stimulus, as shown in the thermal map (Fig. 6).

It was also observed that the zebrafish group that received the associative stimulus had greater polarity in relation to the control group (Fig. 4A,B). The fish were agitated during the connected stimulus and quickly headed for the food conditioning area, so the group movement coordination was firmer. Although the zebrafish has different polarization distributions for each group of fish formed, these groups can be organized as “shoals”, which are only aggregates of individuals, or “schools”, where the aggregates of individuals have a synchronized and highly polarized movement.

Other characteristics of the movement of the fish group can vary between shoals and schools, with the zebrafish school being faster and less dense compared to the zebrafish shoals⁵². In that study, it was observed that polarization was stronger in stimulated groups than in control groups. In addition, the groups with smaller amounts of fish showed greater polarization, the fish were swimming in the same difference and clusters (Fig. 5). The increase in the group may influence the dynamics of the fish school. Thus, in other models of collective movement, the polarization of a group takes into account its size or density^{52,53}.

When analyzing the dynamics of the interaction network between the fish during the conditioning, it was noticed that the vibracall stimulus left the fish more agitated and consequently exchanged more information, influencing the dynamics of the movements of the fish school (Fig. 7 and Supplementary Information S2). Thus, it was noticed that the most active fish influence the change in the behavior of less active fish. And that larger groups of fish seemed to be more stable in changing their behavior.

Automated zebrafish monitoring offers advantages for more accurate behavioral analysis compared to manual systems, ensuring more controlled work and without human intervention (See Video 1, Supplementary File). The proposed system can clearly assess the interest and behavioral dynamics of fish individually and organized in groups. Thus, our system allows for the monitoring of fish in conditioned and free movements, reducing human invasiveness in research. In addition, it is a fully automatic system that can be adjusted according to a chosen protocol. Here, we chose conditioning by two stimuli, but it is easily adaptable to other approaches, or approaches

that take into account video processing and behavior analysis, being established in real time or after training. Some automatic control tools may be limited to experiments and not adjustable for other experiments. In this system, we can adjust for various experiences such as assessing behavior for toxicity, sleep, learning by aversion and several other behaviors that require video processing. In addition, this tool can be used for other species of smaller fish, however it will be necessary to train YOLOv2 with data from new fish.

Conclusion

A new automated system for real-time assessment of zebrafish conditioning was presented here. It was noticed that the zebrafish are able to learn with just two consecutive attempts. There was a difference in learning in relation to the red led light and vibracall stimuli, where fish learned more easily when they were stimulated by red LED light. Conditioned fish showed high polarization in relation to unstimulated fish. In addition, the higher polarization is related to smaller groups of fish, showing that the group dynamics are more stable and coordinated. It is believed that the methodology used will serve for future evaluations of behavioral applications of zebrafish research, not only for conditioning fish, but for other behavioral analyzes such as toxicity, sleep, aversion learning and several other behaviors that demand the processing of video, adjusting the evaluation protocol. In addition, this tool can be used for other species of smaller fish, however it will be necessary to train YOLOv2 with data from new fish.

Data availability

Source data are provided with this paper (Supplementary information).

Received: 22 December 2020; Accepted: 24 March 2021

Published online: 29 April 2021

References

1. Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R. C., Arganda, S. & de Polavieja, G. G. idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nat. Methods* **11**, 743–748 (2014).
2. Guttridge, T. L., Myrberg, A. A., Porcher, I. F., Sims, D. W. & Krause, J. The role of learning in shark behaviour. *Fish Fish.* **10**, 450–469 (2009).
3. Magurran, A. E. & Higham, A. Information transfer across fish shoals under predator threat. *Ethology* **78**, 153–158 (1988).
4. Chacon, D. M. & Luchiar, A. C. A dose for the wiser is enough: the alcohol benefits for associative learning in zebrafish. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **53**, 109–115 (2014).
5. Parker, M. O. *et al.* Development and automation of a test of impulse control in zebrafish. *Front. Syst. Neurosci.* **7**, 65 (2013).
6. Parker, M. O., Millington, M. E., Combe, F. J. & Brennan, C. H. Development and implementation of a three-choice serial reaction time task for zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **227**, 73–80 (2012).
7. Doyle, J. M. *et al.* A simple automated system for appetitive conditioning of zebrafish in their home tanks. *Behav. Brain Res.* **317**, 444–452 (2017).
8. Bilotta, J., Risner, M. L., Davis, E. C. & Haggblom, S. J. Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. *Zebrafish* **2**, 259–268 (2005).
9. Manabe, K., Dooling, R. J. & Takaku, S. An automated device for appetitive conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* **10**, 518–523 (2013).
10. Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A. & Parichy, D. M. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* **4**, 21–40 (2007).
11. Parker, M. O. *et al.* The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **55**, 94–100 (2014).
12. Sison, M. & Gerlai, R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behav. Brain Res.* **207**, 99–104 (2010).
13. Avdesh, A. *et al.* Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *J. Alzheimer's Dis.* **28**, 459–469 (2012).
14. Fero, K., Yokogawa, T. & Burgess, H. A. The behavioral repertoire of larval zebrafish. *NeuroMethods* **52**, 249–291 (2011).
15. Tegelenbosch, R. A. J., Noldus, L. P. J. J., Richardson, M. K. & Ahmad, F. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour* **149**, 1241–1281 (2012).
16. De Marco, R. J., Groneberg, A. H., Yeh, C. M., Treviño, M. & Ryu, S. The behavior of larval zebrafish reveals stressor-mediated anorexia during early vertebrate development. *Front. Behav. Neurosci.* **8**, 367 (2014).
17. Spence, R. & Smith, C. Innate and learned colour preference in the zebrafish, *Danio rerio*. *Ethology* **114**, 582–588 (2008).
18. Mueller, K. P. & Neuhauss, S. C. F. Automated visual choice discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Integr. Neurosci.* **11**, 73–85 (2012).
19. Roy, T. *et al.* Color preferences affect learning in zebrafish, *Danio rerio*. *Sci. Rep.* **9**, 14531 (2019).
20. Luchiar, A. C. & Chacon, D. M. M. Physical exercise improves learning in zebrafish, *Danio rerio*. *Behav. Process.* **100**, 44–47 (2013).
21. Zeddies, D. G. & Fay, R. R. Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones. *J. Exp. Biol.* **208**, 1363–1372 (2005).
22. Bhandiwad, A. A., Zeddies, D. G., Raible, D. W., Rubel, E. W. & Sisneros, J. A. Auditory sensitivity of larval zebrafish (*Danio rerio*) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *J. Exp. Biol.* **216**, 3504–3513 (2013).
23. Cervi, A. L., Poling, K. R. & Higgs, D. M. Behavioral measure of frequency detection and discrimination in the zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* **9**, 1–7 (2012).
24. Neo, Y. Y. *et al.* Behavioral changes in response to sound exposure and no spatial avoidance of noisy conditions in captive zebrafish. *Front. Behav. Neurosci.* **9**, 28 (2015).
25. Al-Imari, L. & Gerlai, R. Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **189**, 216–219 (2008).
26. Karnik, I. & Gerlai, R. Can zebrafish learn spatial tasks? An empirical analysis of place and single CS–US associative learning. *Behav. Brain Res.* **233**, 415–421 (2012).
27. Sison, M. & Gerlai, R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. *Neurobiol. Learn. Mem.* **96**, 230–237 (2011).
28. Bai, Y.-X. *et al.* Automatic multiple zebrafish tracking based on improved HOG features. *Sci. Rep.* **8**, 10884 (2018).
29. Xu, Z. & Cheng, X. E. Zebrafish tracking using convolutional neural networks. *Sci. Rep.* **7**, 42815 (2017).
30. Qian, Z.-M., Cheng, X. E. & Chen, Y. Q. Automatically detect and track multiple fish swimming in shallow water with frequent occlusion. *PLoS ONE* **9**, e106506 (2014).

31. Wang, S. H., Cheng, X. E., Qian, Z.-M., Liu, Y. & Chen, Y. Q. Automated planar tracking the waving bodies of multiple zebrafish swimming in shallow water. *PLoS ONE* **11**, e0154714 (2016).
32. Thomson, J. S., Al-Temeemy, A. A., Isted, H., Spencer, J. W. & Sneddon, L. U. Assessment of behaviour in groups of zebrafish (*Danio rerio*) using an intelligent software monitoring tool, the chromatic fish analyser. *J. Neurosci. Methods* **328**, 108433 (2019).
33. Deakin, A. G. *et al.* Automated monitoring of behaviour in zebrafish after invasive procedures. *Sci. Rep.* **9**, 9042 (2019).
34. Bossé, G. D. & Peterson, R. T. Development of an opioid self-administration assay to study drug seeking in zebrafish. *Behav. Brain Res.* **335**, 158–166 (2017).
35. Baker, M. R. & Wong, R. Y. Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. *Sci. Rep.* **9**, 9935 (2019).
36. Vignat, C. *et al.* Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish* **10**, 365–375 (2013).
37. Zarantonello, M. *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*) physiological and behavioural responses to insect-based diets: a multidisciplinary approach. *Sci. Rep.* **10**, 10648 (2020).
38. de Almeida Moura, C., da Silva Lima, J. P., Silveira, V. A. M., Miguel, M. A. L. & Luchiar, A. C. Time place learning and activity profile under constant light and constant dark in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Process.* **138**, 49–57 (2017).
39. Percie du Sert, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biol.* **18**, e3000410 (2020).
40. You, M.-S. *et al.* Red LED light treatment promotes cognitive learning through up-regulation of trpm4 in zebrafish. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **213**, 112073 (2020).
41. Redmon, J. & Farhadi, A. YOLO9000: better, faster, stronger. In *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) 2017-Janua*, 6517–6525 (IEEE, 2017).
42. Liu, Z., Chen, Z., Li, Z. & Hu, W. An efficient pedestrian detection method based on YOLOv2. *Math. Probl. Eng.* **2018**, 1–10 (2018).
43. de Oliveira Barreiros, M., de Oliveira Dantas, D., de Oliveira Silva, L. C., Ribeiro, S. & Barros, A. K. Zebrafish tracking using YOLOv2 and Kalman filter. *Sci. Rep.* **11**, 3219 (2021).
44. Romero-Ferrero, F., Bergomi, M. G., Hinz, R. C., Heras, F. J. H. & de Polavieja, G. G. Idtracker.ai: tracking all individuals in small or large collectives of unmarked animals. *Nat. Methods* **16**, 179–182 (2019).
45. Butail, S., Ladu, E., Spinello, D. & Porfiri, M. information flow in animal–robot interactions. *Entropy* **16**, 1315–1330 (2014).
46. Niizato, T. *et al.* Finding continuity and discontinuity in fish schools via integrated information theory. *PLoS ONE* **15**, e0229573 (2020).
47. Crosato, E. *et al.* Informative and misinformative interactions in a school of fish. *Swarm Intell.* **12**, 283–305 (2018).
48. de Chazal, P., Penzel, T. & Heneghan, C. Automated detection of obstructive sleep apnoea at different time scales using the electrocardiogram. *Physiol. Meas.* **25**, 967–983 (2004).
49. Manabe, K., Dooling, R. J. & Takaku, S. Differential reinforcement of an approach response in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Process.* **98**, 106–111 (2013).
50. Cerutti, D. T., Jozefowicz, J. & Staddon, J. E. R. Rapid, accurate time estimation in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Process.* **99**, 21–25 (2013).
51. Braubach, O. R., Wood, H.-D., Gadbois, S., Fine, A. & Croll, R. P. Olfactory conditioning in the zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **198**, 190–198 (2009).
52. Miller, N. & Gerlai, R. From schooling to shoaling: patterns of collective motion in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE* **7**, e48865 (2012).
53. Becco, C., Vandewalle, N., Delcourt, J. & Poncin, P. Experimental evidences of a structural and dynamical transition in fish school. *Phys. A Stat. Mech. Appl.* **367**, 487–493 (2006).

Author contributions

M.O.B. idealized and put the research into practice, wrote the manuscript and analyzed the data. F.G.B., developed the experimental platform and the data processing algorithm. D.O.D., developed the experimental platform, helped in the development of the image processing algorithm and analyzed the data. D.L.S., helped to develop the experimental physical platform. S.R., analyzed the data and revised the manuscript. G.C.S., contributed to the biological discussions of the experiment and fish behavior. A.K.B. evaluated the data and revised the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Funding

This work was funded by the Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão—FAPEMA.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87502-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.d.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021