

MICROTOMOGRÁFIA USANDO RECUPERAÇÃO DE FASE COMO
FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS ESTRUTURAS
INTERNAS DO *RHODNIUS PROLIXUS*

André Pereira de Almeida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Rio de Janeiro
Dezembro de 2013

MICROTOMOGRÁFIA USANDO RECUPERAÇÃO DE FASE COMO
FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS ESTRUTURAS
INTERNAS DO *RHODNIUS PROLIXUS*

André Pereira de Almeida

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc.

Profa. Regina Cély Rodrigues Barroso, D.Sc.

Profa. Patrícia Azambuja Penna, D.Sc.

Prof. Marcelo Salabert Gonzalez, D.Sc.

Profa. Simone Coutinho Cardoso, D.Sc.

Prof. Liebert Parreiras Nogueira, D.Sc.

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2013

Almeida, André Pereira de

Microtomografia usando recuperação de fase como ferramenta de avaliação e determinação das estruturas internas do *rhodnius prolixus*/ André Pereira de Almeida. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XI, 97 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Tese (doutorado) – UFRJ / COPPE / Programa de Engenharia Nuclear, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 70-76

1.Tomografia computadorizada. 2.Recuperação de fase. 3.Luz Síncrotron. 4.*Rhodnius Prolixus*. I Braz, Delson *et al*. II.Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III.Título

Aos meus filhos Miguel e Maria Clara

À minha esposa Lilian

Aos meus pais Jaime (in memoriam) e Maria.

Aos meus irmãos Julio e Fabiana

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me capacitar e por colocar pessoas ao meu lado para me ajudarem.

À minha família por todo apoio e confiança.

À professora Regina, pela orientação, confiança e apoio na minha trajetória acadêmica.

Ao professor Delson, pela orientação e apoio.

Ao professor José Soares, pela ajuda na aquisição dos dados.

Ao professor Liebert, pela ajuda na reconstrução das imagens tomográficas.

Ao professor Marcelo e a professora Patrícia por nos fornecerem as amostras e pelo apoio nas análises dos dados.

Aos componentes do laboratório de física aplicada para ciências biomédicas e ambientais, da UERJ.

Ao Programa de Usuários ICTP/ELETTRA pelo apoio financeiro recebido para realização das medidas no ELETTRA Synchrotron Radiation Facility, na Itália. À Dra. Giuliana Tromba, coordenadora da linha SYRMEP.

E, ao CNPq pelo suporte financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

MICROTOMOGRÁFIA USANDO RECUPERAÇÃO DE FASE COMO
FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS ESTRUTURAS
INTERNAS DO *RHODNIUS PROLIXUS*

André Pereira de Almeida

Dezembro/2013

Orientadores: Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Programa: Engenharia Nuclear

A absorção foi por um longo tempo o único mecanismo de contraste que poderia ser usado para imagem e reconstrução de estruturas 3D. O advento das técnicas de raios X usando contraste de fase mudaram este panorama. Amostras com baixa absorção podem ser claramente visualizadas, permitindo recentes avanços em imagens radiográficas para pequenas amostras biológicas. Neste trabalho, imagens obtidas usando microtomografia por contraste de fase usando radiação síncrotron (SR-PhC- μ CT) foram usadas para estudar estruturas internas do *Rhodnius prolixus*, um dos mais importantes insetos vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas na América Latina. Imagens 3D reconstruídas a partir de projeções submetidas à abordagem de recuperação de fase foram comparadas àquelas obtidas através da reconstrução direta de radiografias por contraste de fase. O uso da SR-PhC- μ CT torna possível o acesso a informação sobre a sintopia de órgãos e estruturas internas do *R. prolixus* sem destruí-los, fornecendo dados precisos e preservados referentes à sua função e desenvolvimento. A comparação das imagens sugere a natureza complementar das duas abordagens, enfatizando detalhes (sem recuperação de fase) ou da estrutura global (com recuperação de fase) da amostra.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

MICROTOMOGRAPHY USING PHASE RETRIEVAL AS A TOOL FOR
EVALUATION AND DETERMINATION OF INTERNAL STRUCTURES OF
RHODNIUS PROLIXUS

André Pereira de Almeida

December/2013

Advisors: Delson Braz

Regina Cély Rodrigues Barroso

Department: Nuclear Engineering

Absorption was for a long time, the only contrast mechanism that could be used for the imaging and reconstruction of 3D structures. The advent of X-ray phase-contrast (PhC) techniques greatly changed this. Samples with low absorption differences can be clearly visualized, allowing the recent advances in X-ray imaging for small biological samples. In this work, the phase-amplitude retrieval approach from images obtained using phase contrast synchrotron X-ray microtomography (SR-PhC- μ CT) was used to study internal structures of the *Rhodnius prolixus*, which is one of the most important insect vector of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease in Latin America. 3D images reconstructed from phase-retrieved projections were compared to those obtained through direct tomographic reconstruction of the phase contrast radiographs. The use of SR-PhC- μ CT has made it possible to access information on organs syntopy and structure of *R. prolixus* without invading or disrupting them, so supplying precise and conserved data concerning their function and development. The comparison of images suggests the complementary nature of the two approaches, which emphasize details (without phase retrieval) or the overall structure (with phase retrieval) of the sample.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. ASPECTOS GERAIS	3
2.1. Objetivo	3
2.2. Objetivos específicos	3
2.3. Justificativas.....	3
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
3.1. Tomografia Computadorizada	5
3.1.1. Teorema da projeção de Fourier	10
3.1.2. Reconstrução de imagens	12
3.2. Radiação Síncrotron.....	18
3.2.1. Características Gerais	18
3.2.2. Produção da Luz Síncrotron	19
3.3. Contraste de fase	25
3.4. Intensidade e distribuição de fase	29
3.5. Imagem baseada na propagação (<i>Propagation-based imaging, PBI</i>).....	31
3.6. Coerência espacial e temporal	33
3.7. O problema da recuperação de fase (<i>The phase retrieval problem</i>).....	34
3.7.1. Algoritmo de transporte de intensidade (<i>transport of intensity, TIE</i>)	36
3.7.2. Algoritmo não-interativo de recuperação de fase baseado na aproximação de Born	37
3.8. <i>Rhodnius prolixus</i>	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. Microtomografias.....	44
4.1.1. SYRMEP	44

Preparação das Amostras	55
Tratamento das projeções para a recuperação de fase	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1. Análise das estruturas internas e externas.....	58
5.2. Análise das estruturas internas e externas usando recuperação de fase.....	61
5.3. Comparação das imagens obtidas com e sem recuperação de fase	65
6. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3-1 - Duas projeções de uma amostra constituída de um par de cilindros. (KAK, <i>et al.</i> ,1987).....	5
Figura 3-2 - Representação dos coeficientes de atenuação de uma seção transversal	6
Figura 3-3 - Representação esquemática dos raio- soma. BARROSO (1997).....	7
Figura 3-4 - Objeto atravessado por um feixe de raios X e projeção.	8
Figura 3-5 - Caso geral: projeção $P_{\theta}(t)$	9
Figura 3-6 - Teorema da Projeção de Fourier.....	11
Figura 3-7 - Pontos da transformada bidimensional, obtidos a partir da transformada de várias projeções.	12
Figura 3-8 - Filtros utilizados na reconstrução (OLIVEIRA, 2002).	16
Figura 3-9 - Retroprojeção para reconstrução de uma imagem.....	17
Figura 3-10 - Partes real e imaginária, delta e beta, do índice de refração complexo da água. (http://henke.lbl.gov/cgi-bin/getdb.pl)	28
Figura 3-11- Coeficiente de absorção de massa.Lewis (2004).....	28
Figura 3-12 Ângulo de refração devido ao deslocamento de fase induzido pelo objeto	30
Figura 3-13- Padrão registrado por um detector situado a uma distância determinada ..	31
Figura 3-14 – <i>Setup</i> PBI	32
Figura 3-15 - O processo de recuperação fase seguido de reconstrução tomográfica....	39
Figura 3-16 - <i>Rhodnius prolixus</i> (5° estágio).	42
Figura 3-17 - Esquema do ciclo biológico do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> com o inseto vetor <i>Rhodnius prolixus</i> . O inseto alimentado com sangue infectado com a forma tripomastigota os quais se transformam em (B) população de parasitas crescendo. No reto, epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas (C) os quais são eliminados com as fezes e a urina (GARCIA et al, 2007).epimastigotas e alguns spheromastigotes no estômago (A). No intestino, epimastigotas multiplicadas.	42
Figura 4-1 – Esquema funcional da linha SYRMEP.....	45
Figura 4-2 – Câmara de ionização.....	45
Figura 4-3 – Suporte rotacional.	46
Figura 4-4 – Câmera CCD 16-bits utilizada na aquisição das imagens.	46
Figura 4-5 – Setup experimental usado para obtenção de imagens por transmissão e contraste de fase na linha do SYRMEP.....	47
Figura 4-6 – (a) Interface do sistema de controla da linha mini-BCS; (b) Submenu para cálculo automático da energia do feixe	48
Figura 4-7 – Monitor indicando o fluxo do feixe de raios X lido pela câmara de ionização	48
Figura 4-8 – Câmera CCD posicionada no trilho para seleção da distância amostra-detector	49
Figura 4-9–Interface do programa Newport para o alinhamento do centro da amostra e do detector	49

Figura 4-10 – Interface do programa Image Pro Plus: (a) Submenu para seleção da área de captura da imagem. (b) Submenu para seleção do tempo de aquisição e binning da imagem.	50
Figura 4-11 – (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas. (b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.	51
Figura 4-12 – (a) Imagem da amostra. (b) Imagem flat. (c) Imagem dark. (d) Imagem normalizada	53
Figura 4-13 – (a) Janela do programa de reconstrução mostrando um exemplo de projeção e a escolha do slice na imagem. (b) Sinograma da fatia escolhida definindo os limites esquerdo e direito e o filtro usado.	55
Figura 4-14- Alimentação do <i>Rhodnius prolixus</i>	55
Figura 4-15 – Interface gráfica do <i>plugin</i> de recuperação de fase, ANKAphase	57
Figura 5-1-Visualização externa do <i>R.prolixus</i> .(Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012a)	58
Figura 5-2 Volume reconstruído do <i>R.prolixus</i> . (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012a)	59
Figura 5-3 - Seção horizontal, virtual da cabeça do <i>R. prolixus</i> (a). Seção sagital virtual da cabeça do <i>R. prolixus</i> (b). (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012a)	61
Figura 5-4 - - Seção horizontal, virtual da cabeça do <i>R.prolixus</i> , usando recuperação de fase. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b)	62
Figura 5-5-Seção sagital virtual da cabeça do <i>R.prolixus</i> , usando <i>recuperação de fase</i> . (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b).....	63
Figura 5-6 - Seção dorsal, virtual da cabeça do <i>R.prolixus</i> , usando <i>recuperação de fase</i> . (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b).....	64
Figura 5-7 - Seção horizontal, virtual do protórax do <i>R.prolixus</i> , com <i>recuperação de fase</i> . (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b)	65
Figura 5-8 Seção horizontal, virtual da cabeça do <i>R.prolixus</i> .(a) Sem recuperação de fase e (b)com recuperação de fase. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2014).....	66
Figura 5-9 Seção sagital virtual da cabeça do <i>R.prolixus</i> .(a) Sem recuperação de fase e (b)com recuperação de fase. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2014).....	66
Figura 5-10 Volume reconstruído do <i>R.prolixus</i> , visualização anteposterior.(a) Sem recuperação de fase e (b)com recuperação de fase.....	67

1. INTRODUÇÃO

Tomografia Computadorizada (TC) é uma técnica de imagem baseada na absorção de raios X com inúmeras aplicações científicas e tecnológicas (HOUNSFIELD, 1973). No entanto, há um problema bem conhecido em técnicas baseadas na absorção de raios X, a baixa sensibilidade que torna difícil a aplicação destas técnicas para a obtenção de imagem de tecidos moles, tais como amostras biológicas. Por outro lado, as amostras biológicas que apresentam um baixo contraste, por absorver pouca radiação, produzem deslocamentos de fase significativos no feixe de raios X. Se um feixe de raios X suficientemente coerente tal como o obtido de uma fonte síncrotron de terceira geração for usado, o contraste de fase pode ser obtido simplesmente afastando o detector da amostra (FITZGERALD, 2000; XIAO *et al.*, 2004; LANGERA, 2008; BURVALL, 2011).

Em física, o problema de fase (*phase problem*) é o nome dado para o problema da perda da informação relativa à fase que pode ocorrer ao efetuar uma medição física. O próprio nome vem do campo de cristalografia de raios X, em que o problema de fase tem de ser resolvido para a determinação de uma estrutura de dados de difração. O problema de fase é também conhecido nas áreas de geração de imagens e de processamento de sinal. Várias abordagens têm sido desenvolvidas ao longo dos anos (GLUSKER, *et al.*, 1994).

Recuperação de fase (*phase retrieval*) é o processo de encontrar soluções usando algoritmos para o problema de fase, e é a chave para a quantificação de imagens obtidas pela técnica de contraste de fase que utiliza raios X como fonte de radiação. Para recuperar a imagem de fase de um campo de onda de raios X, em geral, é preciso várias imagens de contraste de fase. WU *et al.* (2005) fizeram uma nova observação da dualidade fase-atenuação para tecidos moles, e mostraram que é necessária apenas uma imagem de contraste de fase para a recuperação fase com base nessa dualidade (WU *et al.*, 2005).

Existe uma relação quantitativa entre a mudança de fase induzida por um objeto e a intensidade registrada. A inversão desta relação é chamada de recuperação de fase. Uma vez que a mudança de fase é proporcional às projeções através da distribuição tridimensional no índice de refração do objeto, recuperando a fase, o índice de refração pode ser reconstruído, utilizando a fase como entrada para um algoritmo de reconstrução tomográfica (LANGERA, 2008). Um método de recuperação de fase proposto por

Gureyev (GUREYEV, 2004a, 2004b), que se baseia na aproximação de Born, pode ser combinado com a dualidade fase-atenuação de tecidos moles. De acordo com a análise de uma simulação, Gureyev verificou que é possível a recuperação de fase a partir de radiografias de contraste de fase, que é uma função apenas da distância amostra-detector (*Sample to Detector Distance - SDD*).

A reconstrução qualitativa, ou seja, quando não é feita a recuperação de fase está relacionada com o Laplaciano tridimensional da distribuição do índice de refração o qual, geralmente, pode ser visto como uma forma de realce nas bordas (efeito halo) e que pode ser usado para análise qualitativa (WU *et al*, 2008).

O desenvolvimento de fontes de radiação síncrotron e técnicas de imagem de contraste de fase resultaram em grandes avanços tanto em imagem microscópica, como para imagens de raios X em tempo real de organismos vivos (CLOETENS *et al*, 1996).

Recentemente, uma análise do contraste de fase em imagens radiográficas foi feita por SOCHA *et al*. (2007). Depois, WESTNEAT *et al*. (2008) publicou uma excelente revisão sobre imagens obtidas usando fontes síncrotron de raios X e delineou os muitos usos para imagem que auxiliam o estudo da anatomia dos organismos vivos.

Aplicação da técnica de microtomografia computadorizada de raios X (μ CT) em insetos é bastante recente (HÖRNSCHEMEYER *et al*. 2002, 2006;. BEUTEL *et al*, 2008;. EBERHARD *et al*, 2010; ZHANG *et al*, 2010) e a sua variante microtomografia com fonte síncrotron que usa as informações do contraste de fase (SR-PhC- μ CT) é ainda mais recente (BETZ *et al*, 2007; JAKUBEKA *et al*, 2007;. WESTNEAT *et al*, 2008; HEETHOFF & NORTON, 2009; WEIDE & BETZ, 2009; HÖNNICKE *et al*, 2010; KIM *et al*, 2011).

2. ASPECTOS GERAIS

2.1. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo principal a aplicação da técnica de microtomografia computadorizada de raios X usando recuperação de fase com radiação síncrotron, para a identificação de estruturas anatômicas do *Rhodnius prolixus*, que é um dos insetos vetor mais importante do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas na América Latina (GARCIA *et al.*, 2007).

2.2. Objetivos específicos

- Analisar as estruturas internas do *Rhodnius prolixus*, usando microtomografia por contraste de fase usando radiação síncrotron (SR-PhC- μ CT).
- Aplicar a técnica de recuperação de fase, nas projeções adquiridas nas medidas de SR-PhC- μ CT, para analisar as estruturas internas do *Rhodnius prolixus*.
- Comparar as duas análises citadas nos itens anteriores.

2.3. Justificativas

Um conhecimento detalhado das estruturas anatômicas de insetos é fundamental para uma melhor compreensão de sua função e evolução. Podem-se destacar algumas estruturas importantes do inseto *Rhodnius prolixus*, como o protocérebro, região reguladora dos processos fisiológicos de muda e metamorfose através dos produtos de suas células neurosecretoras. Outra estrutura relevante é o *corpus allatum*, uma glândula endócrina responsável pela produção do hormônio juvenil que modula o processo de muda para os estágios ninfais. Ambas as estruturas são atualmente alvo de estudos com drogas capazes de atuar sobre sua fisiologia alterando o ciclo de vida e reprodução de insetos assim como o inibir o desenvolvimento do *T. cruzi* nestes vetores.

O uso da técnica de microtomografia usando radiação síncrotron por contraste de fase (SR-PhC- μ CT) em *Rhodnius prolixus* como modelo de estudos de diferentes tecidos poderá esclarecer alterações estruturais durante o desenvolvimento e reprodução desta

espécie. As estruturas internas que foram identificadas neste trabalho usaram o trabalho pioneiro de RAMÍRES-PÉREZ (1969) sobre estudos anatômicos do sistema nervoso do *Rhodnius prolixus*. O estudo de RAMÍRES-PÉREZ foi totalmente baseado no processo tradicional de dissecções. Neste trabalho, são apresentados os primeiros resultados da investigação não-invasiva das estruturas externas e da anatomia do *Rhodnius prolixus*. A microtomografia permite a aquisição de dados volumétricos reais que podem ser usados para visualização 3D e para manipulação virtual deste tipo de inseto, em qualquer direção, com resolução micrométrica sem demoradas e elaboradas dissecções.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Tomografia Computadorizada

A semântica da palavra tomografia remete-se a duas palavras do grego: “tomo”(seção) +“graphein”(grafia). Portanto, tomografia é uma imagem da seção transversal de um objeto, a partir de dados coletados deste objeto iluminado em diversas direções. O impacto desta técnica na medicina foi revolucionário, uma vez que permitiu aos médicos visualizar órgãos internos (ensaio não-destrutivo) com precisão e segurança nunca vista para o paciente. Existem numerosas aplicações de imagens por tomografia computadorizada, como por exemplo, nas indústrias e nas diversas áreas de pesquisa científica.

Fundamentalmente, a tomografia reconstrói imagens a partir de suas projeções. No sentido estrito da palavra, uma projeção em um determinado ângulo é a integral da imagem no sentido indicado por esse ângulo (KAK, *et al.*,1987), como indicado pela Figura 3-1.

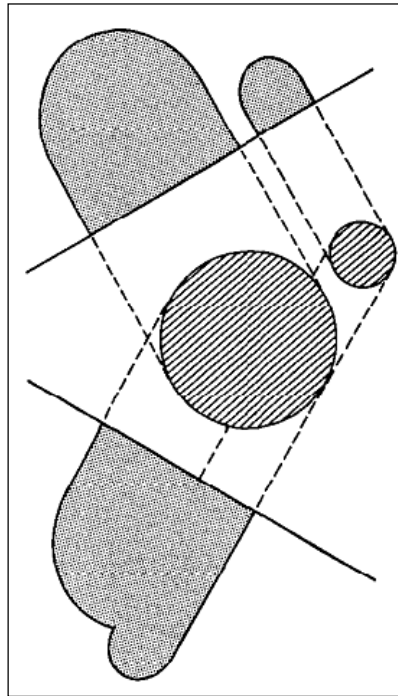


Figura 3-1 - Duas projeções de uma amostra constituída de um par de cilindros. (KAK, *et al.*,1987)

A Figura 3-2 apresenta a seção transversal de um objeto a uma altura qualquer. A função $f(x,y)$ representa o coeficiente de atenuação de raios X no ponto (x,y) . Esta representação será utilizada no desenvolvimento a seguir.

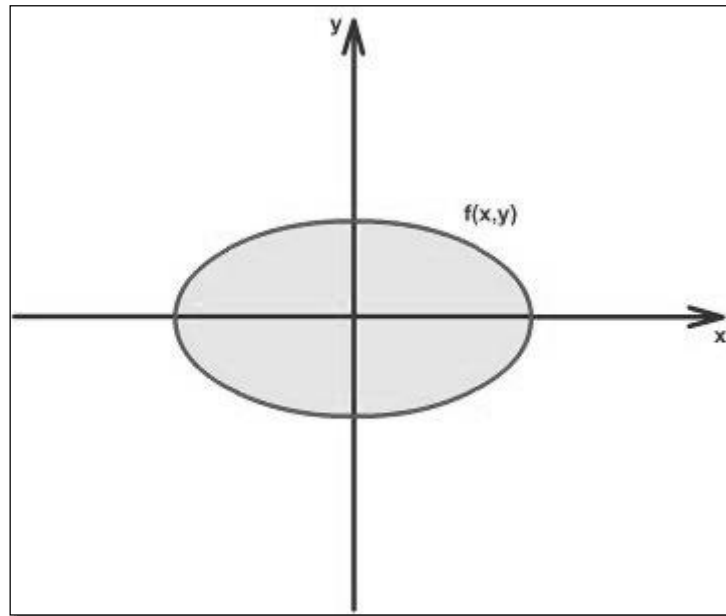


Figura 3-2 - Representação dos coeficientes de atenuação de uma seção transversal

Para realizar a reconstrução de uma seção transversal, a tomografia de raios X utiliza, como informação externa, a atenuação que um feixe de raios X sofre ao atravessar um objeto. Ao atravessar um objeto ao longo de um determinado caminho reto, um feixe monocromático obedece à Lei de Beer-Lambert:

Equação 3-1

$$\int_{\text{raio}} \mu(x, y) ds = \int_{\text{raio}} f(x, y) ds = \ln \frac{I_0}{I}$$

onde $\mu(x,y)$ ou $f(x,y)$ é o coeficiente de atenuação no ponto (x,y) , I_0 é o número de fótons que entram no objeto e I é o número de fótons que saem do objeto.

O problema consiste em determinar os coeficientes de atenuação $\mu(x,y)$ em cada ponto do corpo de prova. Como já foi exposto, a determinação do coeficiente de atenuação pode ser calculado a partir da Equação 3-1, onde a integral corresponde ao raio-soma, sendo este a soma de todos os coeficientes de atenuação numa determinada direção. BARROSO (1997).

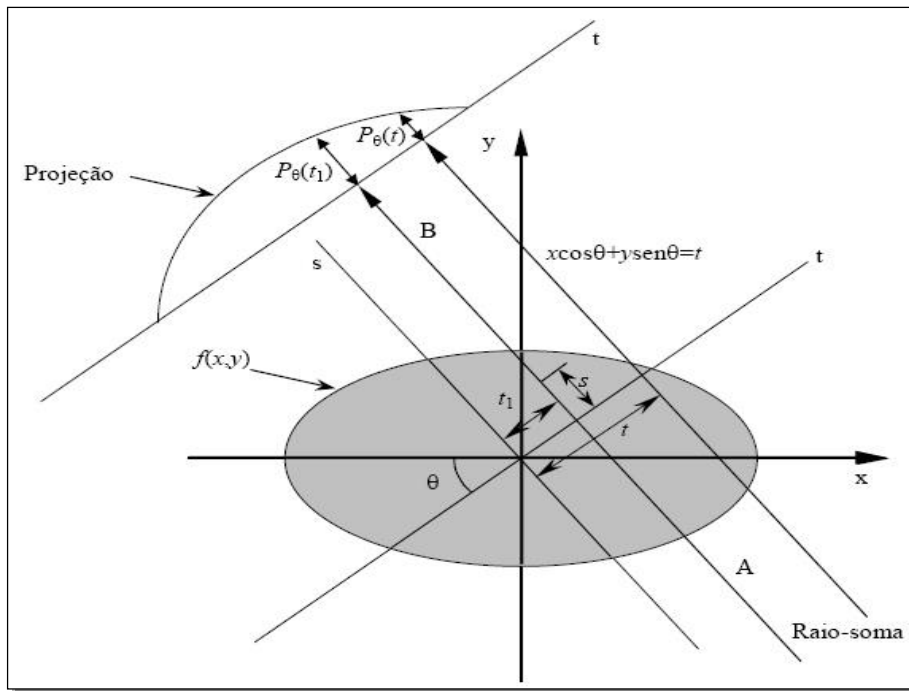


Figura 3-3 - Representação esquemática dos raio-soma. BARROSO (1997)

Como em um objeto real o coeficiente de atenuação varia de um ponto para outro, a atenuação sofrida por um fóton de raio X ao longo de um caminho A não será necessariamente igual à atenuação sofrida ao longo de um caminho B. Em outras palavras, o número de fótons I que emergem de uma trajetória A não será necessariamente igual ao número de fótons provenientes de uma trajetória B.

A Figura 3-4 mostra a seção transversal de um objeto sendo atravessada por um feixe de raios X paralelo (todos os raios do feixe são paralelos). A parte superior da figura apresenta a curva da atenuação sofrida pelo feixe em função da coordenada t .

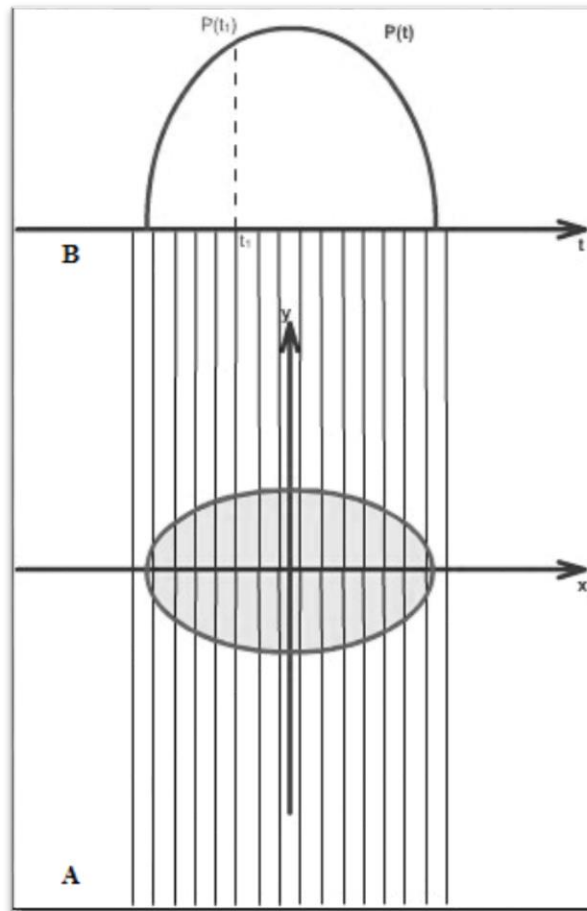


Figura 3-4 - Objeto atravessado por um feixe de raios X e projeção.

A amplitude da curva para um determinado valor $t=t_1$ é função dos coeficientes de atenuação ao longo do caminho AB . A curva $P(t)$ é denominada projeção e constitui a informação necessária para a reconstrução de uma seção transversal.

Na figura acima, o eixo t representa uma linha de detectores. Cada ponto da curva $P(t)$ é dado pela intensidade medida por cada detector.

Existem três tipos de projeções: projeções paralelas (ou projeções de feixe paralelo), projeções de feixe em leque e projeções de feixe em cone. A Figura 3-4 mostra um exemplo de projeção paralela (*parallel projection*).

O eixo t , entretanto, pode ter uma orientação qualquer, não necessitando estar paralelo ao eixo x como na Figura 3-4. A Figura 3-5 apresenta uma projeção $P_\theta(t)$, onde θ é o ângulo formado pelos eixos t e x .

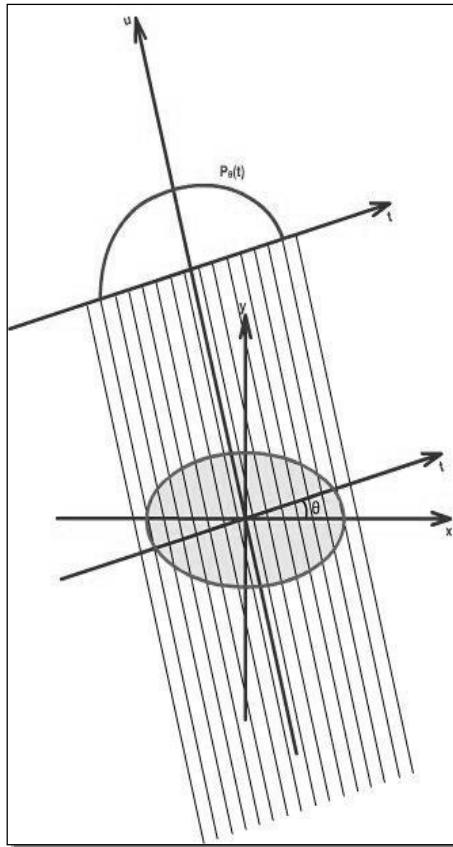


Figura 3-5 - Caso geral: projeção $P_{\theta}(t)$

Assim, para o caso geral, uma projeção $P_{\theta}(t)$ é dada pela integral de linha abaixo, onde (θ, t) representa as coordenadas da trajetória percorrida por um raio X.

Equação 3-2

$$P_{\theta}(t) = \int_{(\theta, t)} f(x, y) ds$$

O sistema de coordenadas (t, u) corresponde à rotação do par de eixos (x, y) de um ângulo θ :

Equação 3-3

$$\begin{bmatrix} t \\ u \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\theta & \text{sen}\theta \\ \text{sen}\theta & -\cos\theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$$

Utilizando a Equação 3-2 e a expressão acima relativa a t ($t = x\cos\theta + y\text{sen}\theta$), pode-se escrever a projeção $P_{\theta}(t)$ da seguinte forma:

Equação 3-4

$$P_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy$$

A Equação 3-4 é conhecida como a **Transformada de Radon** da função $f(x, y)$.

3.1.1. Teorema da projeção de Fourier

O Teorema da Projeção, também conhecido como o Teorema da Faixa Central, relaciona as projeções paralelas de um objeto com sua transformada de Fourier bidimensional. Este teorema é de grande importância e constitui uma ferramenta fundamental para o método de reconstrução por **retroprojeção filtrada**.

O Teorema da Projeção de Fourier baseia-se nas transformadas de Fourier unidimensional e bidimensional. As Equação 3-5 e Equação 3-6 apresentam as definições das transformadas de Fourier unidimensional e bidimensional, respectivamente:

Equação 3-5

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-j2\pi\omega t} dt$$

Equação 3-6

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-j2\pi(ux+vy)} dx dy$$

Como definido na seção anterior, $f(x, y)$ representa a distribuição dos coeficientes de atenuação da seção transversal de um objeto. Tomando esta transformada para o caso particular em que $v=0$, obtém-se a seguinte expressão:

Equação 3-7

$$F(u, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-j2\pi(ux)} dx dy$$

A Equação 3-7 pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$F(u,0) = \int_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) dy \right] e^{-j2\pi(ux)} dx$$

Equação 3-8

$$P_0(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) dy$$

$$F(u,0) = S_0(x) = \int_{-\infty}^{\infty} P_0(x) e^{-j2\pi(ux)} dx$$

$$S_\theta(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_\theta(t) e^{-j2\pi\alpha t} dt = F(\omega, \theta)$$

Forma geral do Teorema da Projeção de Fourier

A Figura 3-6 ilustra o Teorema da Projeção: a transformada de Fourier unidimensional de uma projeção formando um ângulo θ com o eixo x é igual aos valores da transformada bidimensional do objeto ao longo de uma linha radial subtendendo o mesmo ângulo θ com o eixo u.

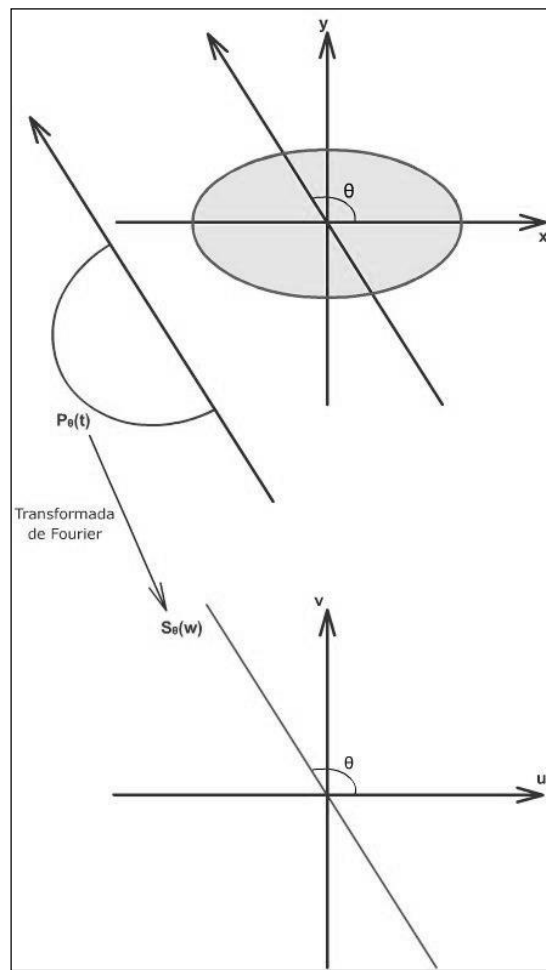


Figura 3-6 - Teorema da Projeção de Fourier.

3.1.2. Reconstrução de imagens

Segundo o Teorema da Projeção de Fourier, a transformada de Fourier de uma projeção que forma um ângulo θ com o eixo x fornece os valores da transformada bidimensional do objeto ao longo de uma linha radial formando o mesmo ângulo com o eixo u . Desta forma, calculando a transformada de Fourier de um número grande de projeções formando vários ângulos com o eixo x , obtêm-se os valores da transformada bidimensional do objeto ao longo de várias linhas radiais (Figura 3-7).

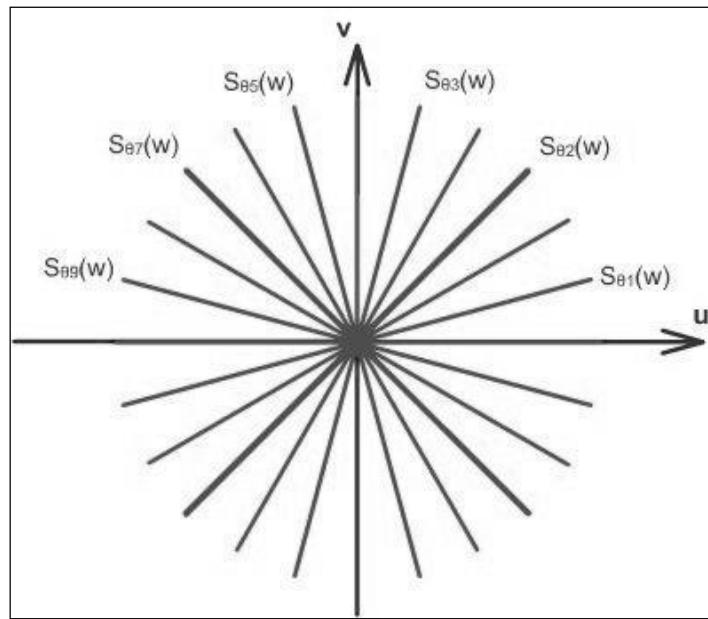


Figura 3-7 - Pontos da transformada bidimensional, obtidos a partir da transformada de várias projeções.

É possível obter a imagem da seção reta original a partir desta distribuição de pontos. Para isso, são necessárias duas etapas: (a) uma interpolação de forma a obter pontos distribuídos em coordenadas cartesianas e (b) a transformada bidimensional de Fourier inversa, fornecendo os valores da imagem no domínio do espaço. Este método é conhecido como reconstrução direta de Fourier (*direct Fourier reconstruction*).

Devido à dificuldade de interpolação de coordenadas polares para coordenadas cartesianas, esta técnica de reconstrução é pouco empregada.

A técnica mais conhecida e utilizada de reconstrução de imagens é a retroprojeção filtrada (*filtered backprojection*). Como será visto a seguir, este método, que tem como

fundamento o Teorema da Projeção, faz proveito de uma mudança de coordenadas dos argumentos da transformada bidimensional inversa de Fourier.

A transformada de Fourier inversa de duas dimensões na coordenada cartesiana é dada pela Equação 3-9 e na coordenada polar pela Equação 3-10.

Equação 3-9

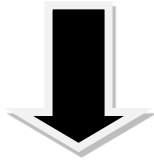
$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u, v) e^{j2\pi(ux+vy)} du dv$$

Equação 3-10

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} F(\omega, \theta) e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} \omega d\omega d\theta$$

Separando os limites da integral anteriormente citada de 0 até π e de π até 2π , obtém-se:

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} F(\omega, \theta) e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} \omega d\omega d\theta + \int_{\pi}^{2\pi} \int_0^{\infty} F(\omega, \theta) e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} \omega d\omega d\theta$$



Equação 3-11

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} F(\omega, \theta) e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} \omega d\omega d\theta + \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} F(\omega, \theta + \pi) e^{j2\pi\omega(x \cos(\theta + \pi) + y \sin(\theta + \pi))} \omega d\omega d\theta$$

A transformada de Fourier em coordenadas polares obedece à seguinte propriedade:

$$F(\omega, \theta + \pi) = F(-\omega, \theta)$$

A substituição desta propriedade na Equação 3-11 resulta na equação a seguir:

Equação 3-12

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} F(\omega, \theta) |\omega| e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} d\omega d\theta$$

Aplicando o Teorema da Projeção (Equação 3-8) na Equação 3-12, obtém-se:

Equação 3-13

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(\omega) |\omega| e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} d\omega d\theta$$

Esta expressão é a equação principal do método da retroprojeção filtrada. Este nome surge da interpretação da Equação 3-13 ao ser dividida em duas integrais:

Equação 3-14

$$Q_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(\omega) |\omega| e^{j2\pi\omega(x \cos \theta + y \sin \theta)} d\omega$$

Equação 3-15

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} Q_{\theta}(\omega) (x \cos \theta + y \sin \theta) d\theta$$

A Equação 3-14 é a transformada inversa de Fourier do produto $S_{\theta}(\omega)|\omega|$. Esta multiplicação representa a filtragem da projeção $P_{\theta}(t)$ (cuja transformada é $S_{\theta}(\omega)$) pela função $|\omega|$. $Q_{\theta}(t)$ é denominada projeção filtrada.

A Equação 3-15 representa a operação de retroprojeção das projeções filtradas $Q_{\theta}(t)$. O valor de um determinado ponto de coordenadas (x, y) da imagem original é dado pelo somatório (ou integral) dos diversos valores $Q_{\theta}(x \cos \theta + y \sin \theta)$, para θ variando de 0 a θ .

O termo $|\omega|$ surgiu devido à mudança do sistema de coordenadas (de retangulares para polares). Matematicamente é conhecido como Jacobiano. No âmbito de reconstrução de imagens, $|\omega|$ é popularmente chamado de “filtro”. Este “filtro” possui um comportamento que enfatiza as altas frequências presentes nas projeções adquiridas no sistema tomográfico. Sendo $\omega(\xi)$ uma função janela de limitação de banda que é escolhida para dar uma resposta em alta frequência, mais moderada, para alcançar o melhor compromisso entre a largura de banda do filtro e a supressão de ruído, podem ser acoplados outros filtros dentro das equações de retroprojeção onde se encontrava somente o filtro rampa $|\omega|$, de forma a minimizar o efeito de ênfase das altas frequências. Existem quatro filtros comumente utilizados para esta suavização (

Tabela 3-1).

Tabela 3-1 - Filtros de reconstrução

Filtro	Resposta em frequência
Ram-Lak	$ \xi \text{rect}(\xi d)$
Shepp-Logan	$ \xi \sin c(\xi d) \text{rect}(\xi d)$
Co-seno Passa Baixa	$ \xi \cos(\xi d) \text{rect}(\xi d)$
Generalizado de Hamming	$ \xi [\alpha + (1 - \alpha) \cos 2\pi \xi d] \text{rect}(\xi d), 0 \leq \alpha \leq 1$

Os gráficos de resposta em frequência e resposta impulsiva dos filtros descritos acima são mostrados na Figura 3-8. Neste trabalho, o filtro Shepp-Logan foi utilizado.

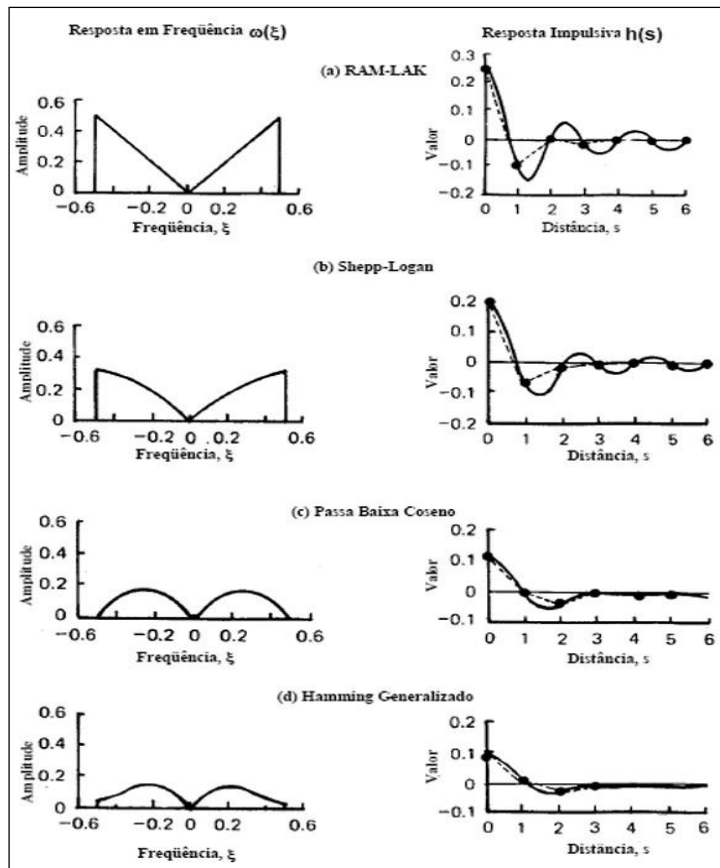


Figura 3-8 - Filtros utilizados na reconstrução (OLIVEIRA, 2002).

A Figura 3-9 mostra o significado da contribuição de uma projeção filtrada $Q_{\theta_1}(t)$ qualquer.

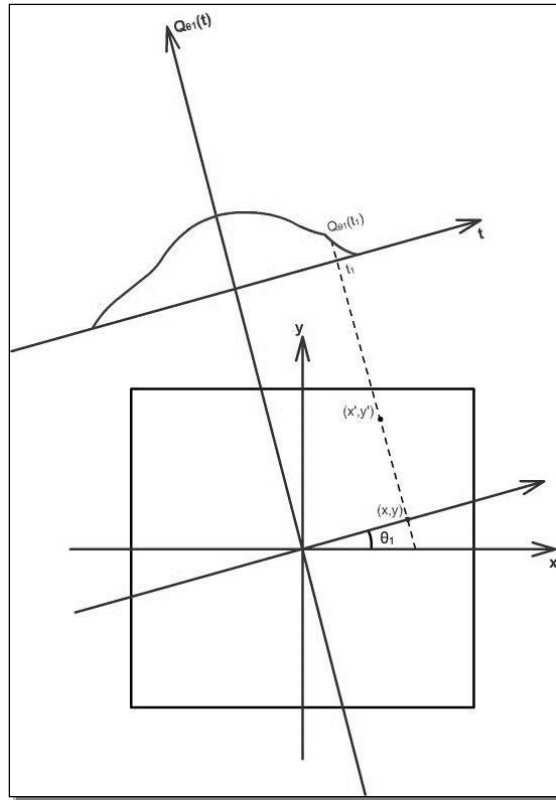


Figura 3-9 - Retroprojeção para reconstrução de uma imagem.

Para o ângulo θ_1 , o valor da projeção filtrada $Q_{\theta}(t)$ que contribuirá para o valor final no ponto (x, y) é dado pela coordenada $t_1 = x \cos \theta_1 + y \sin \theta_1$. Para o mesmo ângulo θ_1 e o ponto (x', y') , o valor da coordenada t será o mesmo: $t_1' = x' \cos \theta_1 + y' \sin \theta_1 = t_1$.

Portanto, o valor da projeção filtrada $Q_{\theta_1}(t_1)$ é retroprojetado na região da imagem original, contribuindo para todos os pontos ao longo da reta $t = t_1$. Todos os valores de $Q_{\theta_1}(t)$ são desta maneira retroprojetados na região da imagem original. Este processo é realizado para todos os ângulos θ_i em que foram adquiridas as projeções P_{θ_i} .

3.2. Radiação Síncrotron

3.2.1. Características Gerais

Sempre que uma carga elétrica é acelerada, da mesma forma que elétrons oscilando numa antena, ela emite radiação eletromagnética. Uma partícula que é acelerada de forma harmônica gera um campo elétrico senoidal em função do tempo, e este oscila de acordo com a frequência do seu movimento. Se a velocidade da partícula for bem inferior à da luz, essa emissão tem o seu valor máximo para ângulos perpendiculares à direção de aceleração. Por outro lado, nas proximidades da velocidade da luz ocorrem mudanças interessantes na emissão de radiação, relacionadas com as frequências emitidas e a forma (direção) de como a partícula emite. Alterações mais profundas ocorrem a velocidades relativísticas no movimento circular em que o espectro de emissão de radiação torna-se quase-contínuo, apresentando uma infinidade de harmônicos da frequência fundamental de oscilação. Esta radiação é conhecida como luz síncrotron (CASTILHO, 2006).

A radiação ou luz síncrotron é gerada por aceleradores anulares nos quais circula uma corrente pulsada de elétrons de alta energia ($E \gg m_0 c^2$) com velocidade praticamente igual à velocidade da luz. A radiação síncrotron é gerada pelo movimento circular destes elétrons em velocidades relativísticas nas tangentes às curvaturas de sua trajetória.

O processo de produção é iniciado por um canhão de elétrons de um acelerador linear. Os aceleradores lineares são aceleradores de partículas carregadas, como elétrons, prótons ou íons pesados. As partículas carregadas entram em um tubo onde existem campos elétricos alternados. Estas partículas são aceleradas primeiramente por um campo elétrico e entram em um tubo de corrente ou “*drift tube*” onde são protegidas do campo elétrico e o atravessam com velocidade constante até a próxima abertura. Neste ponto as partículas são novamente aceleradas e a cada abertura entre os tubos aceleradores as partículas recebem mais e mais energia. Esse processo é capaz de acelerar as partículas carregadas com energias muito grandes.

O feixe de elétrons gerado pelo acelerador linear é injetado em um anel de armazenamento, onde há três dispositivos básicos: os dipolos magnéticos, formados por ímãs dipolares que produzem um campo magnético homogêneo no sentido vertical que são responsáveis pela deflexão do feixe e consequente produção de luz síncrotron; os quadripolos ou sextupolos que estão situados nos trechos retos do anel e servem para

focalizar os elétrons e reduzir as aberrações cromáticas; e a cavidade de rádio frequência que está situada em um ou mais dos trechos retos e é responsável por acelerar os elétrons injetados a baixa energia até a energia final e por fornecer aos elétrons, em cada passagem pelo interior da mesma, a energia perdida em cada volta devido à radiação produzida nas partes curvas de suas trajetórias para aumentar o tempo de vida do feixe (MARGARITONDO, 1995).

A utilização de luz síncrotron pressupõe o uso de monocromadores de modo a selecionar a região desejada do espectro eletromagnético.

Os feixes de raios X que se podem obter em uma máquina de luz síncrotron são extremamente intensos, colimados e dotados de um elevado grau de coerência longitudinal (espacial). Além disso, com a utilização de cristais monocromadores, é possível obter feixes praticamente monocromáticos com energia selecionável dentro de um amplo espectro de energia. O feixe é, por sua natureza, laminar com altura de alguns milímetros e com largura de algumas dezenas de centímetros no plano do objeto, o que o torna ideal para sistemas de imagem. As características geométricas do feixe podem também ser modificadas mediante o uso de cristais assimétricos ou de outras óticas, de modo a adaptar-se a exigências específicas (ARFELLI *et al.*, 2000).

3.2.2. Produção da Luz Síncrotron

Uma onda eletromagnética é uma perturbação que se propaga espacialmente (no vácuo), associada aos campos elétrico e magnético oscilantes no tempo. A energia transportada pela onda é a energia armazenada nesses campos. A densidade de energia (energia por unidade de volume) da onda eletromagnética pode ser determinada da seguinte forma (JACKSON, 1999):

Equação 3-16

$$\rho = \frac{1}{2} \varepsilon_o E^2 + \frac{1}{2\mu_o} B^2$$

onde E e B representam os módulos dos campos elétrico e magnético, respectivamente. Para uma melhor simplificação na notação, será utilizado o sistema c.g.s (gaussiano) em que faz-se a substituição $\varepsilon_o = \frac{1}{4\pi} = \frac{1}{\mu_o}$. Substituindo $c = \frac{1}{\sqrt{\mu_o \varepsilon_o}}$ (velocidade da luz no

vácuo) na Equação 3-16, pode-se escrever a energia em função do campo elétrico, já que

$$B = \frac{E}{c} :$$

Equação 3-17

$$\rho = \epsilon_0 E^2$$

A intensidade da onda eletromagnética (I), isto é, a potência dissipada por unidade de área (J/m^2) é calculada multiplicando-se a densidade energética pela sua velocidade c :

Equação 3-18

$$I = \rho c = c \epsilon_0 E^2$$

Considerando uma partícula carregada (um elétron, por exemplo) que se move aceleradamente, pode-se mostrar que o campo elétrico tem uma dependência angular em relação à direção da aceleração a , sendo diretamente proporcional ao módulo deste vetor:

Equação 3-19

$$E = \frac{e a \sin\theta}{c^2 \cdot r}$$

onde e é a carga do elétron e r o raio da esfera. Substituindo o módulo do campo elétrico na

Equação 3-18, pode-se calcular a energia dissipada por unidade de tempo (ou potência) multiplicando a intensidade pela área superficial de uma esfera¹

Equação 3-20

$$P = \frac{e^2 a^2 \sin^2\theta}{c^3}$$

A

¹ Considera-se um campo elétrico esfericamente simétrico gerado por um elétron no centro do sistema de coordenadas, isto é, no centro da esfera. Como o campo no interior de um condutor esférico é nulo, considera-se somente o campo [componente tangencial] gerado na casca esférica de espessura infinitesimal.

Equação 3-20 revela um padrão de emissão dipolar ou globular pela dependência com o quadrado do seno. Essa dependência angular pode ser eliminada por simples considerações geométricas. O sistema de coordenadas esféricas admite a seguinte relação fundamental: $x^2 + y^2 + z^2 = r^2$, que relaciona o raio da esfera com suas coordenadas cartesianas. O fato de o elétron estar no centro do sistema de coordenadas implica na igualdade dos valores quadráticos médios em cada direção, isto é: $\langle x^2 \rangle = \langle y^2 \rangle = \langle z^2 \rangle$; daí decorre que $\langle x^2 \rangle = \frac{1}{3} \langle x^2 + y^2 + z^2 \rangle = \frac{1}{3} \langle r^2 \rangle = \frac{r^2}{3}$. Fazendo-se uso da identidade trigonométrica fundamental, pode-se substituir a média do quadrado dos senos conforme apresentado abaixo:

Equação 3-21

$$\langle \text{sen}^2 \theta \rangle = \langle 1 - \cos^2 \theta \rangle = 1 - \frac{\langle x^2 \rangle}{r^2}$$

$$\langle \text{sen}^2 \theta \rangle = \frac{2}{3}$$

Substituindo este resultado na

Equação 3-20 chega-se finalmente à fórmula de *Larmor*, que nos fornece a potência dissipada por uma carga acelerada a velocidades bem inferiores à velocidade da luz:

Equação 3-22

$$P = \frac{2}{3} \frac{e^2}{c^3} a^2$$

A fórmula de *Larmor* mostra que a energia liberada por uma carga acelerada depende unicamente de agentes externos (força), sendo muito pequena em relação à energia que pode ser concedida pelos aceleradores lineares. Isso pode ser constatado substituindo $a = \frac{F}{m} = \frac{E_c}{md}$ na

Equação 3-22 para obter a potência em função da energia cinética da partícula (E_c) e do comprimento do acelerador (d):

Equação 3-23

$$P = \frac{2}{3} \frac{e^2 c}{d^2} \left(\frac{E_c}{mc^2} \right)^2$$

Pela

Equação 3-23 fica claro que a potência dissipada só será considerável quando a partícula for acelerada a uma energia próxima à sua energia de repouso (mc^2), o que não é tão simples de se conseguir devido aos efeitos relativísticos².

A situação é bem diferente quando se considera o movimento circular uniforme de uma partícula carregada, pois a perda em energia por revolução começa a não ser desprezível em relação ao ganho energético que pode ser conseguido pela aceleração por campos de radiofrequência. Substituindo na

Equação 3-22 a expressão da aceleração centrípeta $a_c = \frac{v^2}{r} = \frac{p^2}{m^2 \cdot r}$, obtém-se a potência dissipada a baixas velocidades ($< 0,1c$):

Equação 3-24

$$P = \frac{8}{3} \frac{e^2 c}{r^2} \left(\frac{E_c}{mc^2} \right)^2$$

Novamente as perdas energéticas não são consideráveis em relação ao ganho que pode ser obtido por re-aceleração na faixa de microondas, e podem ser minimizadas aumentando-se o raio orbital. Por outro lado, se a partícula carregada for acelerada de modo que sua energia seja bem superior à sua energia de repouso, a energia cinética será dada por $E_c = cp$ e a potência dissipada será considerável, crescendo com a quarta potência da energia:

² Quanto mais próximo da velocidade da luz quisermos acelerar uma partícula, maior será o trabalho necessário. Pela expressão relativística da energia de uma partícula: $E = mc^2 / \sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}$, percebe-se que seria necessária uma diferença de potencial infinita (trabalho infinito) para acelerá-la à velocidade da luz (Lemos, 2001).

Equação 3-25

$$P = \frac{8}{3} \frac{e^2 c}{r^2} \left(\frac{E_c}{mc^2} \right)^4$$

Este resultado foi obtido em 1898 por Liénard (um ano depois da dedução da fórmula de *Lamor*) e constitui um marco na história da luz síncrotron por representar a primeira previsão teórica de sua emissão.

A radiação dissipada a cada volta completada por um feixe de partículas carregadas a velocidades próximas da velocidade da luz pode ser determinada considerando, agora, o momento linear relativístico ($\gamma.m.v$) da seguinte forma:

Equação 3-26

$$P = \frac{2}{3} \frac{e^2 c}{r^2} \gamma^4 \beta^4$$

onde $\beta = \frac{v}{c}$. A energia perdida a cada volta pode ser calculada multiplicando-se a

potência pelo período $\left(\frac{2\pi.r}{c.\beta} \right)$:

Equação 3-27

$$\Delta E = \frac{4\pi}{3} e^2 \beta^3 \gamma^4$$

Caso a energia dos elétrons circulantes seja bem elevada ($\beta \rightarrow 1$), a perda energética pode ser calculada em função da energia do feixe circulante, já que $\gamma = \frac{E}{m.c^2}$

Substituindo o valor do raio clássico do elétron $\frac{e^2}{m.c^2} = 2,82.10^{-15} m$, chega-se à equação que relaciona a perda energética por volta, em função do raio da trajetória e da energia da partícula carregada.

Equação 3-28

$$\Delta E(keV) = 88,5 \frac{[E(GeV)]^4}{r(metros)}$$

Nos primeiros síncrotrons de elétrons ($r = 1\text{ m}$ e $E = 0,3\text{ GeV}$) havia uma perda média de aproximadamente 1 keV por volta – valor este pequeno mas não desprezível, se comparado ao ganho que podia ser conseguido através de reaceleração por radiofrequência. Em energias maiores as perdas tornavam-se consideráveis, explicando o porquê dos primeiros anéis de armazenamento operarem com baixas correntes de feixe para experiências de colisões de partículas, o que determinava um subaproveitamento da luz síncrotron. Com o aumento da demanda pelo uso científico da luz síncrotron, foram desenvolvidas fontes exclusivas e projetadas para se obter uma maior intensidade.

3.3. Contraste de fase

Imagens radiográficas de contraste de fase oferecem uma qualidade de imagem muito maior sobre as de métodos convencionais, muitas vezes em dose menor do que o exigido por técnicas de absorção convencionais. Apesar destas vantagens significativas a técnica permanece quase totalmente restrita a laboratórios com fontes de radiação síncrotron. Imagens radiográficas de contraste de fase têm sido estudadas há mais de 10 anos. A exploração do contraste de fase é tecnicamente muito exigente, mas os ganhos potenciais são tais que esta continua a ser uma área de crescimento (LEWIS, 2004).

O contraste de fase surge porque tanto a amplitude e a fase dos raios X são modificadas quando um feixe de raios X se propaga através de um objeto. Uma compreensão detalhada exige que a radiação deve ser tratada como um campo de ondas, em vez de uma simples óptica geométrica. Tal pensamento representa uma mudança significativa no campo das imagens radiográficas médicas e é talvez uma das razões pelas quais os efeitos da imagem de contraste de fase não foram muito considerados até recentemente (LEWIS, 2004).

Existem muitas técnicas para a obtenção do contraste de fase (BONSE, *et al.*, 1965; CHANPMAN, *et al.*, 1997; DAVID *et al.*, 2002). Desde as primeiras publicações sobre imagens de raios X por contraste de fase (BONSE e HART, 1965; DAVIS *et al.*, 1995; INGAL e BELIAEVSKAYA, 1995; SNIGIREV *et al.*, 1995; WILKINS *et al.*, 1996; NUGENT *et al.*, 1996, CLOETENS *et al.*, 1996; CHAPMAN *et al.*, 1997), diferentes métodos para esta aplicação foram desenvolvidos, como apresentado por Nugent (NUGENT, 2010). Atualmente quatro métodos estão em uso: interferometria, imagem reforçada por difração, contraste de fase em linha (*in-line*) e interferometria usando grades (FITZGERALD, 2000; PFEIFFER, *et al.*, 2007; MOMOSE, 2005). Entre estes métodos, os dois últimos apresentam vantagens distintas, já que podem ser usados com fontes policromáticas. A versão de interferometria usando grades pode ser realizada com fontes extensas, pois as exigências para a coerência espacial são reduzidos, à custa da diminuição do fluxo de radiação. O contraste de fase *in-line* (ou holografia, isto é, contraste de fase baseada na propagação) é o arranjo mais simples e, portanto, o menos sensível a desvios dos componentes ópticos, por exemplo. Esta vertente exige uma pequena fonte de alta coerência espacial e, portanto foi limitado a síncrotron ou fontes microfoco de baixa energia, mas recentemente tem sido demonstrado com fontes *table-*

top liquid-jet-anode (TUOHIMAA, *et al.* 2007). Nenhum dos métodos de contraste de fase de raios X produz medições diretas da fase, para isto é necessário um processamento de dados. Quanto a este aspecto a técnica para obtenção de contraste de fase mais simples é a interferometria, que requer apenas a consideração do deslocamento de fase em $2\pi rad$. A mais exigente é o contraste de fase baseada na propagação que requer recuperação fase, a simplicidade experimental é pago pelo processamento de dados mais complexo (BURVALL, 2011).

O arranjo experimental do contraste de fase baseada na propagação é semelhante ao de absorção de raios X. A principal diferença é a distância de propagação: na absorção a projeção de um objeto é capturada num plano perto da amostra, no contraste de fase baseada na propagação, o feixe de raios X propaga-se por uma distância através do espaço livre entre a amostra e o detector (BURVALL, 2011).

Neste momento uma simples particularidade técnica é considerada: se a coerência espacial do feixe de raios X é suficiente, o efeito de contraste de fase pode ser obtido fazendo com que o feixe se propague em espaço livre após interação com o objeto (SNIGIREV, *et al.*, 1995; CLOETENS, *et al.*, 1996; WILKINS, *et al.*, 1996; NUGENT, *et al.*, 1996).

O efeito sobre ondas de raios X que se propagam através de um objeto pode ser descrito pelo índice de refração complexo (ALS-NIELSEN & MCMORROW 2001):

Equação 3-29

$$n = 1 - \delta - i\beta$$

onde δ e β são os parâmetros de decréscimo do índice de refração e o índice de absorção, respectivamente. β está relacionado com o coeficiente de atenuação de massa μ , que é dado por:

Equação 3-30

$$\frac{4\pi\beta}{\lambda\rho} = \mu$$

Na tomografia por contraste de fase, a parte real, δ , do índice de refração é reconstruída. Para as condições experimentais geralmente usadas, δ é diretamente relacionado com a densidade eletrônica, ρ_e , (JENSEN *et al.*, 2011)

Equação 3-31

$$\rho_e = \frac{2\pi r_0}{\lambda^2} \delta$$

onde $r_0=2,82 \times 10^{-15}$ m é o comprimento de espalhamento de Thomson. A densidade eletrônica, ρ_e é frequentemente usada quando os resultados da tomografia por contraste de fase são apresentados.

A vantagem para a imagem por contraste de fase é que a parte real do índice de refração é algumas ordens de magnitude maior que a parte imaginária (HENKE *et al.*, 1993). Esta diferença na magnitude oferece a possibilidade de uma aumento substancial no contraste da imagem na tomografia por contraste de fase em comparação com a técnica convencional de tomografia por absorção.

As mudanças de fase e de atenuação associadas a uma distância x de propagação são dadas por

Equação 3-32

$$\Phi = \frac{2\pi}{\lambda} \int \delta(x) dx \quad e \quad -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \frac{4\pi}{\lambda} \int \beta(x) dx$$

onde I_0 é a intensidade incidente, I é a intensidade final e λ é o comprimento de onda. Assim, o deslocamento de fase e a absorção de um feixe de raios X que se propaga através de uma amostra dependem tanto da δ e β das componentes particulares a serem

No contexto da imagem de contraste de fase um aspecto importante é que em tecidos moles o δ em geral, é três vezes maior na ordem de grandeza que β na faixa de energia dos raios X. Além disso, δ decresce mais suave que β quando a energia é aumentada, como ilustrado na Figura 3-10. É este fato que cria o potencial para geração de imagens com baixa dose já que as diferenças dos tecidos moles são apenas aparentes a baixas energias quando se utiliza a absorção, ver Figura 3-11.

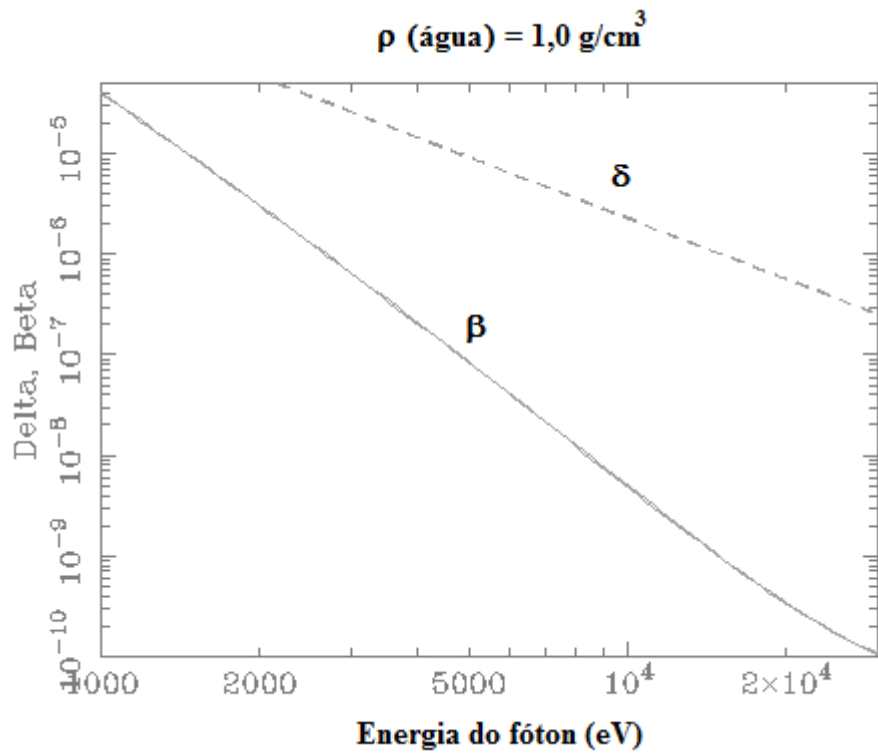


Figura 3-10 - Partes real e imaginária, delta e beta, do índice de refração complexo da água.

<http://henke.lbl.gov/cgi-bin/getdb.pl>

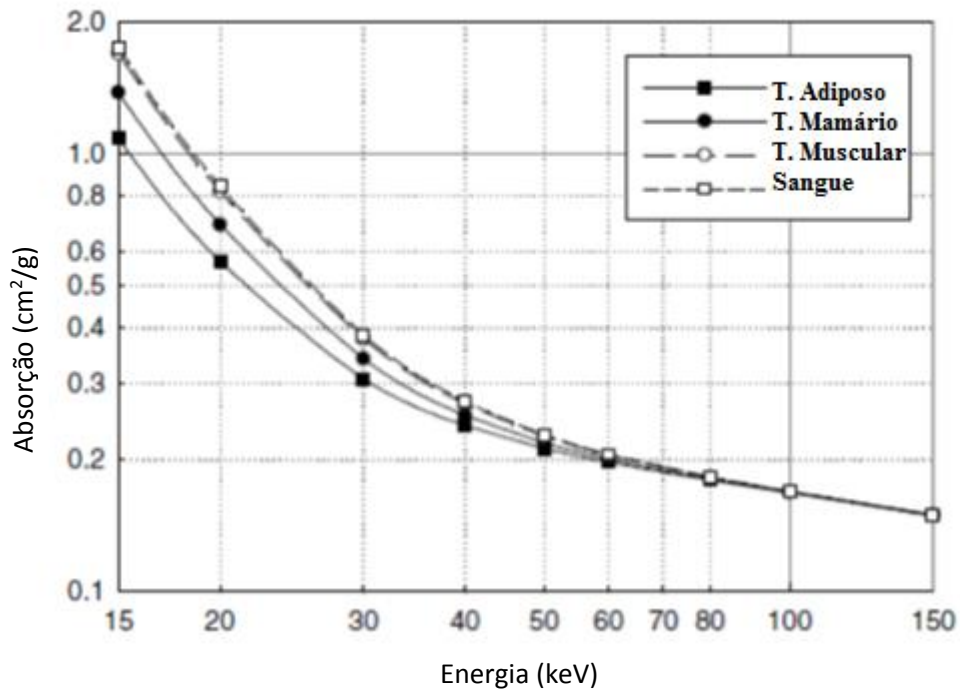


Figura 3-11- Coeficiente de absorção de massa.Lewis (2004).

A magnitude muito maior de δ sobre β significa que o deslocamento de fase de um feixe de raios X que se propaga através de um tecido mole pode ser muito maior que a variação da intensidade. Um estudo bem sucedido com imagens de contraste de fase requer um suficiente grau de coerência lateral na radiação iluminante. A coerência lateral é dada por:

Equação 3-33

$$d = \frac{\lambda r_1}{f}$$

onde λ é o comprimento de onda, r_1 é a distância da fonte-objeto e f é o tamanho da fonte. É evidente, portanto, que a otimização do contraste de fase é mais fácil com fótons de baixa energia, com um pequeno tamanho focal e uma distância fonte-objeto grande (KOTRE & BIRCH, 1999).

Curiosamente, a exigência de coerência temporal ou monocromaticidade não é tão rigorosa, com isso imagens de contraste de fase podem ser facilmente realizadas com fontes de radiação policromáticas (WILKINS *et al.* 1996). Do ponto de vista prático este fato é importante uma vez que fontes de raios X monocromáticas com intensidade suficiente para o diagnóstico usando imagens radiográficas são atualmente limitadas a fontes sincrotron.

3.4. Intensidade e distribuição de fase

Considerando o índice de refração, se a variação deste é pequena, os raios-X são transmitidos através do material quase em linha reta. Nesta hipótese, a intensidade dos raios X transmitidos através do objeto é afetada principalmente pelo coeficiente de absorção do objeto. A intensidade dos raios X, $I(x, y)$, no plano de contato é dada por:

Equação 3-34

$$I(x, y) = I_0 e^{-\int dz \mu(x, y, z)}$$

onde (x, y) são as coordenadas no plano de projeção, perpendicular a direção de projeção z e I_0 é a intensidade incidente, que é considerada constante.

Se o material é homogêneo, a Equação 3-34 é denominada Lei de Beer-Lambert, que já foi descrita na Equação 3-1.

Equação 3-35

$$I(x, y) = I_0 e^{-\int dz \mu T(x, y)}$$

onde $T(x, y)$ é a espessura projetada do material.

A mudança de fase do feixe de raios X se propagando por uma distância z é dado por:

Equação 3-36

$$\Phi(x, y) = -\frac{2\pi}{\lambda} \int dz \delta(x, y, z)$$

Para objetos homogêneos pode ser reescrita:

Equação 3-37

$$\Phi(x, y) = -\frac{2\pi}{\lambda} \int dz \delta T(x, y)$$

Um efeito importante que ocorre por causa das distorções da frente de onda, devido ao deslocamento de fase induzido pelo objeto, é a refração do feixe de raios X que passam através da amostra, que pode ser expresso por um ângulo $\Delta\theta_R$, Figura 3-12 (Born e Wolf, 1999):

Equação 3-38

$$\Delta\theta_R(x, y; \lambda) \cong -\lambda/2\pi \vec{\nabla}_{x,y} \Phi(x, y; \lambda)$$

Esta relação é válida se $|\vec{\nabla}_{x,y} \Phi(x, y; \lambda)| \ll 2\pi/\lambda$, que é chamada de aproximação paraxial.

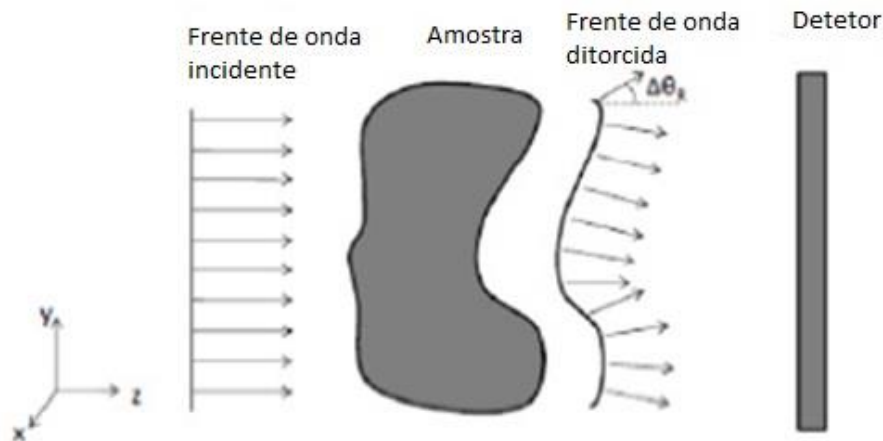


Figura 3-12 Ângulo de refração devido ao deslocamento de fase induzido pelo objeto

3.5. Imagem baseada na propagação (*Propagation-based imaging, PBI*)

Na imagem baseado em propagação, o objeto é exposto por um feixe de radiação altamente coerente e esta iluminação pode resultar em um desvio de fase. À medida que a radiação se propaga após atravessar a amostra, as partes da frente de onda que sofreram diferentes deflexões dão origem a um padrão característico. Este padrão é então registrado por um detector situado a uma distância conveniente (SNIGIREV *et al.*, 1995, CLOETENS *et al.*, 1996). Os desvios de fase, portanto são transformados em variações de intensidade detectáveis, em função da superposição destas frentes de ondas e consequentes interferências construtivas e destrutivas como mostrado na Figura 3-13.

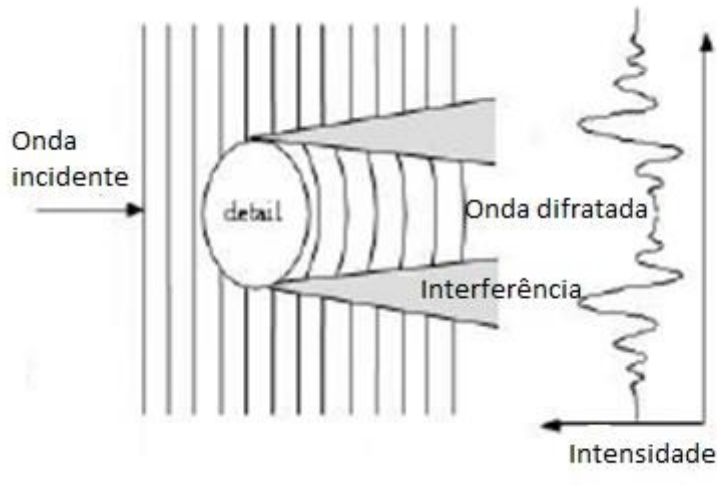


Figura 3-13-Padrão registrado por um detector situado a uma distância determinada

Em comparação com as outras técnicas de contraste de fase, PBI tem uma configuração simples (Figura 3-14). Ela não necessita de elementos ópticos entre a amostra e o detector. Isto implica na ausência de possíveis aberrações decorrentes dos elementos ópticos e é possível atingir uma alta resolução (Pogany *et al.*, 1997; Arhatari *et al.*; 2004, Gureyev *et al.*, 2008). O método baseado na propagação é uma modalidade de imagem de contraste de fase que tem um diferencial: a imagem não depende diretamente do desvio de fase induzida pelo objeto, mas da variação espacial. Em particular, neste caso, como será descrito a seguir, o contraste registrado na imagem é, numa primeira aproximação,

proporcional ao Laplaciano da mudança de fase em um plano perpendicular ao eixo óptico.

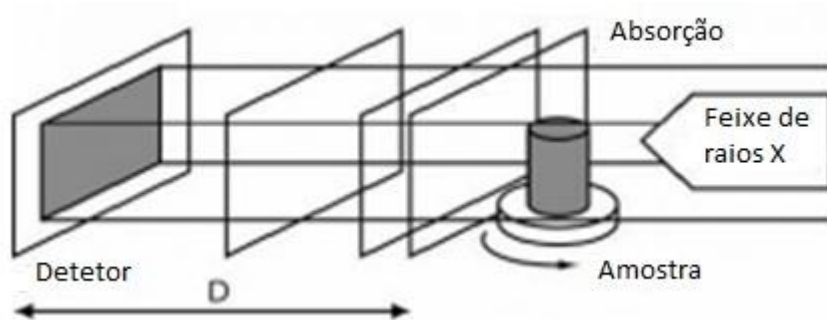


Figura 3-14 – Setup PBI

A formação do contraste de fase depende da distância D , chamada propagação efetiva ("desfocagem"), que é definida como:

Equação 3-39

$$D = \frac{d \cdot l}{d + l}$$

onde l é a distância fonte-amostra e d a distância fonte-detector.

A condição $l \gg d$, é adotada para o arranjo experimental baseada em radiação síncrotron, a distância D é simplesmente determinada pela distância de propagação, ou seja, $D \cong d$. Variando a distância D e considerando a escala de comprimento característica transversal h do objeto e uma onda plana monocromática, quatro regimes podem ser distinguidos (MAYO *et al*, 2002, GUREYEV, 2003):

- O regime de absorção, para o qual a amostra a uma distância D do detector é próximo de zero.
- A detecção de bordas ou regime de difração de campo próximo, caracterizada pela pequena distância D tal que $r_F^2 = \lambda D \ll h^2$.

A quantidade introduzida r_F é o raio no plano do objeto, chamada de primeira zona de Fresnel, que representa a região finita no objeto que contribui significativamente para um ponto P da imagem. Neste caso, o contraste é formado localmente em torno de características específicas da amostra. Os limites do objeto são fortemente reforçados (efeito *halo*) e um padrão de interferência distinto corresponde a cada margem, dando informações geométricas valiosas

sobre o objeto. Se introduzirmos o número de Fresnel, a condição acima para o regime de campo próximo pode ser expresso como $N_F \gg 1$.

- O regime de Fresnel ou intermediários, caracterizada pelas distâncias de desfocagem tais que: $r_F^2 = \lambda D \cong h^2$. Esta condição é também equivalente para $N_F \cong 1$
- O regime de difração Fraunhofer ou de campo longínquo (*far-field*), caracterizado por grandes distâncias desfocagem de tal forma que $r_F^2 = \lambda D \gg h^2$, e também $N_F \ll 1$

Neste último caso, as franjas de interferência são bem resolvidas, mas já não podem ser atribuídas a uma borda específica da amostra. As imagens não representam de forma confiável o objeto.

Assim, dependendo das condições experimentais, o padrão de difração de Fresnel melhora propriedades diferentes da amostra. Em particular, é possível demonstrar que a imagem é mais sensível a uma dada gama de frequências de uma característica de fase em particular, a uma distância determinada por $D \cong 1/(2\lambda f^2)$. Para esta distância o termo do contraste de fase é maximizado. Por exemplo, para $\lambda = 0.5\text{\AA}$, para ser possível detectar detalhes na que tenham dimensões de $10\mu m$, a distância ótima deve ser de $1m$. Uma vez que a distância de propagação é limitada ao comprimento da “cabana experimental”, para a seleção da energia (frequência) a ser utilizada, deve-se levar em consideração a limitação das distâncias a serem usadas, ficando intrinsecamente as baixas frequências em detrimento. Portanto, essa técnica é mais adaptada a objetos que causam variações rápidas do que os que produzem variações suaves na fase.

3.6. Coerência espacial e temporal

A coerência espacial e temporal é um aspecto muito importante de qualquer sistema de imagem de contraste de fase, uma vez que quantifica a capacidade de um campo de onda em ser portadora de informações de fase e as franjas de interferência.

As propriedades de coerência de um campo de onda podem ser descritas por funções de correlação dependentes do tempo e do espaço (BORN e WOLF, 1999), ligados à monocromaticidade dos raios X e ao tamanho angular da fonte, respectivamente:

- **Coerência temporal (longitudinal)** implica em uma relação de fase entre a onda $\Psi(t)$ e a onda $\Psi(t + \Delta t)$, separadas por um intervalo de tempo curto. A distância percorrida pela onda durante um período de tempo no qual a correlação permanece elevada é chamado o comprimento de coerência longitudinal $l_t = \lambda^2/\Delta\lambda$, onde λ é o comprimento de onda, que é associado à monocromaticidade $\Delta\lambda/\lambda$ do feixe.
- **Coerência espacial (transversal)** indica a correlação entre a amplitude de onda em diferentes pontos transversais à direção de propagação (entre a onda $\Psi(x)$ e onda $\Psi(x + \Delta x)$), em dois pontos separados por uma distância Δx). Esta propriedade é normalmente expressa em termos da coerência lateral (ou transversal) comprimento $l_c = \lambda/2\alpha$, onde $\alpha = S/L$, L e S são a distância fonte-detector e a dimensão transversa da fonte, respectivamente (BORN & WOLF, 1999).

O método PBI é muito sensível à falta de coerência espacial da radiação que esta iluminando o objeto. Se o tamanho angular de uma fonte incoerente, comparado ao da amostra é demasiado for muito grande, o contraste de fase baseada na propagação é inviável, pois não ocorre a formação das franjas de interferência.

A resolução da técnica PBI está também relacionada com o processamento de imagem e com a espessura t da amostra. Este último contribui com uma amenização igual a $\sqrt{\lambda t}$, por exemplo, este valor é de $0,2\mu m$ para uma espessura de amostra igual a 1 mm e uma energia de 25 keV : portanto, este efeito pode ser negligenciado, dado que geralmente ele é menor do que o tamanho do pixel.

3.7. O problema da recuperação de fase (*The phase retrieval problem*)

O problema da recuperação de fase é um passo além do contraste de fase, no sentido de que agora se pretende medir ou recuperar uma dada distribuição de fases a partir de uma ou mais imagens, que são obtidas por um determinado sistema de imagens de contraste de fase.

Por conta disso, essas imagens de contraste de fase são vistas como imagens criptografadas ou código da distribuição de fase desejada $\Phi(x, y)$. O problema da

recuperação de fase pode, em seguida, ser formulado como o problema de decodificação de tais imagens para obter a fase $\Phi(x, y)$.

Nas subseções seguintes, duas abordagens diferentes para o problema inverso de recuperação fase são delineadas. O primeiro é baseado no algoritmo de transporte de intensidade (*transport of intensity, TIE*) (PAGANIN *et al.*, 2002), para dados de μ CT usando *single-distance* e objetos de material único, e o segundo é um algoritmo não-interativo de recuperação de fase baseado na aproximação de Born proposto por Gureyev, projetado para materiais de baixo Z e homogêneo (GUREYEV *et al.*, 2004b).

3.7.1. Algoritmo de transporte de intensidade (*transport of intensity, TIE*)

Este algoritmo permite a recuperação da fase de uma onda eletromagnética de uma única imagem de contraste de fase baseada na propagação de campo próximo (*near-field*).

Equação 3-40

$$\nabla_{\perp} \cdot (I(r_{\perp}, z) \nabla_{\perp} \Phi(r_{\perp}, z)) = - \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right) \frac{\partial I(r_{\perp}, z)}{\partial z}$$

Equação 3-41

$$I(r_{\perp}, z = 0) = I^{in} e^{-\mu T(r_{\perp})}$$

Equação 3-42

$$\Phi(r_{\perp}, z = 0) = - \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right) \delta T(r_{\perp})$$

onde $I(r_{\perp}, z)$ a intensidade e $\Phi(r_{\perp}, z)$ fase do feixe, o vetor posição r_{\perp} situa-se perpendicular ao eixo z . ∇_{\perp} é o operador gradiente no plano que contém r_{\perp} . $I(r_{\perp}, z = 0)$ e $\Phi(r_{\perp}, z = 0)$ são a intensidade e a fase da radiação acima do plano na superfície de saída, $z = 0$ do objeto, respectivamente. Substituindo as

Equação 3-41 e Equação 3-42 na

Equação 3-40, temos a espessura projetada:

Equação 3-43

$$T(r_{\perp}) = - \left(\frac{1}{\mu} \right) \log_e \left[\mathcal{F}^{-1} \left\{ \mu \frac{\mathcal{F}\{M^2 I(Mr_{\perp}, z = R_2)\}/I^{in}}{(R_2 \delta |k_{\perp}|^2)/(M + \mu)} \right\} \right]$$

onde R_1 é a distâncias fonte-amostra e R_2 a distância amostra-detector, $M = \frac{R_1 + R_2}{R_2}$ é a magnificação da imagem resultante da iluminação da fonte pontual, \mathcal{F}^{-1} a transformada inversa de Fourier e \mathcal{F} a transformada de Fourier em relação a r_{\perp} sendo que k_{\perp} é a coordenada de Fourier correspondente a r_{\perp} .

A Equação 3-43, apresenta a solução para a

Equação 3-40, de transporte de intensidade, para espessura projetada, $T(r_{\perp})$, de uma amostra homogênea, usando uma única imagem formada fora do foco. Esta

espessura projetada é fortemente relacionada com a intensidade e a fase da radiação na superfície de saída da amostra.

3.7.2. Algoritmo não-iterativo de recuperação de fase baseado na aproximação de Born

Esta aproximação utiliza um algoritmo convencional baseado em amostras que causam uma variação muito pequena na fase do feixe de radiação (*weak phase object approximation*). Esta aproximação requer uma variação muito menor que um (condição de Guigay) e uma absorção desprezível. Este algoritmo foi proposto por GUREYEV *et al.*, (2004b), para materiais homogêneos de baixo número atômico, depois isto foi desenvolvido para objetos quasi-homogêneo e aplicado a tomografia (CHEN, *et al.* 2011). As partes real e imaginária do índice de refração complexo de objetos quasi-homogêneos, são proporcionais um em relação ao outro.

Equação 3-44

$$\delta(x, y, z) = \varepsilon\beta(x, y, z)$$

Assume-se uma mudança de fase pequena $|\Phi(x + \lambda z\xi, y + \lambda z\eta) - \Phi(x, y)| \ll 1$ (GUIGAY, 1977), onde (ξ, η) são as frequência espaciais de Fourier, correspondente ao ponto (x, y) no espaço real e z é a distância amostra-objeto. De acordo com a aproximação de Born para a recuperação de fase para tomografia baseada na propagação, a distribuição de intensidade $I_{\theta,z}$ pode ser aproximada como mostrada na Equação 3-45 (GUREYEV *et al.*, 2004b):

Equação 3-45

$$\mathcal{F}[(I_{\theta,z}/I_{\theta,0} - 1)/2](\xi, \eta) = \hat{\gamma}_{\theta}\cos\chi + \hat{\Phi}_{\theta}\sen\chi$$

Onde $\hat{\gamma}_{\theta}$ e $\hat{\Phi}_{\theta}$ são as transformada de Fourier das funções de fase Φ_{θ} e da absorção γ_{θ} e $\chi = \pi\lambda z(\xi^2 + \eta^2)$. Para amostras pouco absorvedora $I_{\theta,0} \cong 1$. Inserindo a Equação 3-45 na Equação 3-44, obtém-se a função de fase para amostra para cada projeção:

Equação 3-46

$$\Phi_{\theta}(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\left\{\frac{\mathcal{F}[(I_{\theta,z} - 1)/2]}{\varepsilon^{-1}\cos\chi + \sen\chi}\right\}$$

Os dois métodos citados anteriormente seguem o mesmo padrão. Os passos deste padrão são descritos na no fluxograma a seguir (Figura 3-15), assumindo que o objeto é iluminado por uma onda plana.

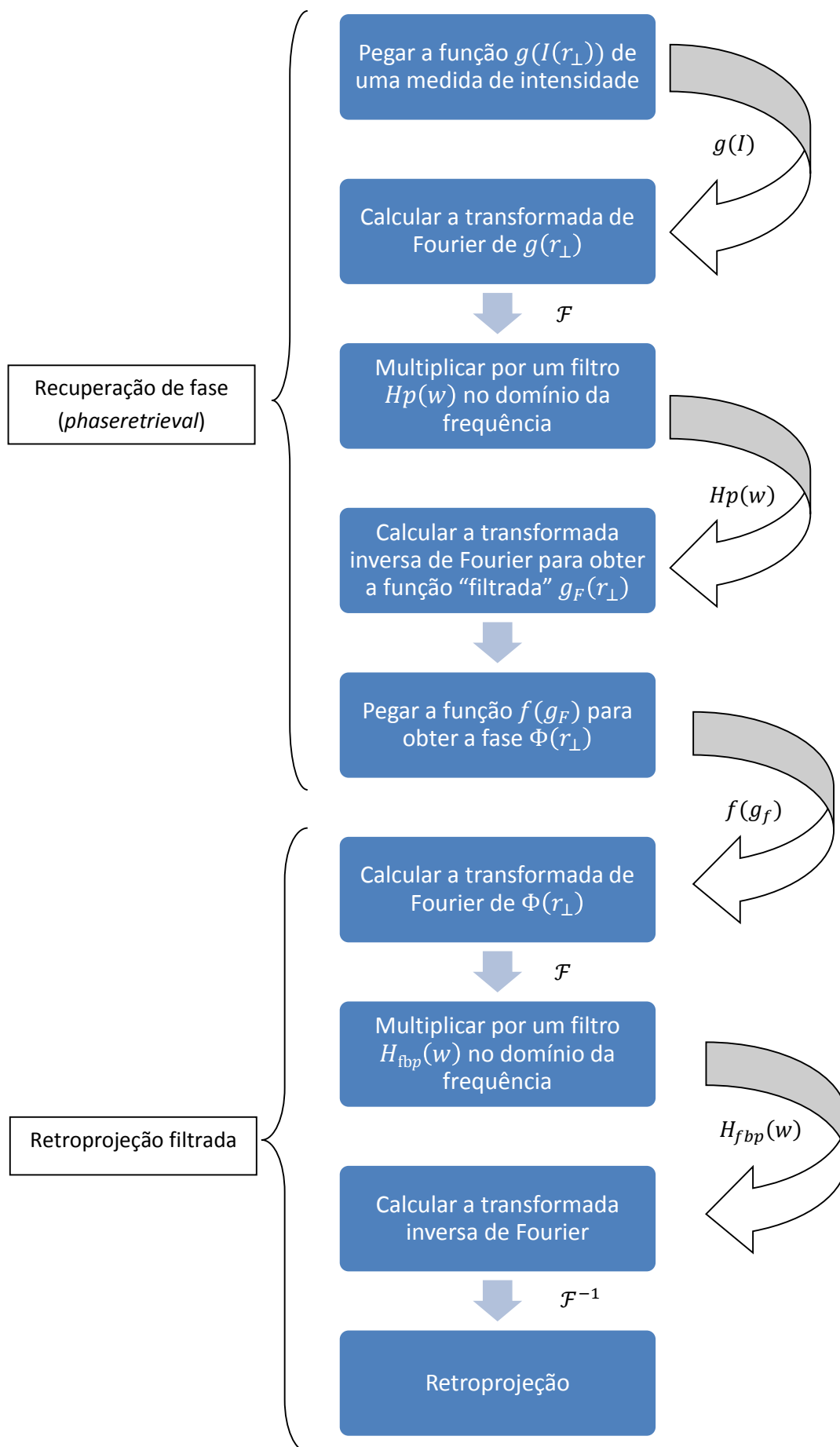


Figura 3-15 - O processo de recuperação fase seguido de reconstrução tomográfica

Como dado de entrada dos algoritmos, a intensidade $I(r_{\perp})$ no plano de imagem registrada como uma função da posição transversal $r_{\perp} = (x, y)$ no detector. Em primeiro lugar, uma função $g(I(r_{\perp}))$ é calculada. Esta função, que varia entre os diferentes métodos, é bastante simples e, por vezes, considerada como uma normalização. Em seguida, a quantidade de $g(r_{\perp})$ é filtrada no domínio da frequência. Intuitivamente, esta filtragem pode ser percebida como uma deconvolução de uma integral de difração (GUIGAY, 1977), ou como uma solução da transformada de Fourier de uma equação de onda. A filtragem é realizada primeiro tomando a transformada de Fourier de $g(I)$, multiplicando por uma função de filtro de $H_p(w)$, onde $w = (u, v)$ é a frequência espacial e tomando a transformada inversa de Fourier para obter a quantidade filtrada $g_F(r_{\perp})$. Mais uma vez, a função de filtro de $H_p(w)$, depende do método escolhido. Finalmente, uma função $f(g_F)$ é escolhida de modo a obter a distribuição de fases $\Phi(r_{\perp})$ num plano logo após o objeto, isto é, no plano de contato. A função $f(g_F)$ é bastante simples e muitas vezes uma identidade, $f(g_F) = g_F$. O procedimento pode ser escrito como apresentado na Equação 3-47

Equação 3-47

$$\Phi(r_{\perp}) = f(\mathcal{F}^{-1}\{H_p \cdot \mathcal{F}\{g(I)\}\})$$

onde \mathcal{F} representa a transformada bidimensional de Fourier.

A

Tabela 3-2, resume as propriedades de sete métodos para recuperação de fase.

Tabela 3-2 Métodos para a recuperação de fase.

Método	$g(I)$	$H_p(u, v)$	$f(g_F)$	Condições	
Bronnikov	$\frac{I}{I_0} - 1$	$[2\pi\lambda d w ^2]^{-1}$	g_F	$\mu = 0$	
Bronnikov modificado	$\frac{I}{I_0} - 1$	$[2\pi\lambda d w ^2 + \alpha]^{-1}$	g_F	$\mu \approx 0$ Solucionar TIE	
Dualidade atenuação-fase	$\frac{I}{I_0}$	$\left[2\pi \frac{r_e \lambda^2 d}{\sigma KN} w ^2 + 1\right]^{-1}$	$\frac{r_e \lambda}{\sigma KN} \ln g_F$	$\mu \propto \delta$	
Material simples	$\frac{I}{I_0}$	$\left[4\pi^2 d \frac{\delta}{\mu} w ^2 + 1\right]^{-1}$	$-\frac{1}{\mu} \ln g_F$	$\mu \propto \delta$	
Dois materiais	$\frac{I e^{\mu_2 A(r_1)}}{I_0}$	$\left[4\pi^2 d \frac{\delta_1 - \delta_2}{\mu_1 - \mu_2} w ^2 + 1\right]^{-1}$	$-\frac{1}{\mu_1 - \mu_2} \ln g_F$	Solucionar TIE	
Método de Fourier, padrão Born	a	$\frac{1}{2} \left(\frac{I}{I_0} - 1\right)$	$[\text{sen}(\pi\lambda d w ^2)]^{-1}$	g_F	a) $\mu = 0$ b) $\mu \propto \delta$
	b		$[\gamma \cos(\pi\lambda d w ^2) + \text{sen}(\pi\lambda d w ^2)]^{-1}$		
Método de Fourier, padrão Rytov	a	$\frac{1}{2} \ln \frac{I}{I_0}$	$[\text{sen}(\pi\lambda d w ^2)]^{-1}$	g_F	a) $\mu = 0$ b) $\mu \propto \delta$
	b		$[\gamma \cos(\pi\lambda d w ^2) + \text{sen}(\pi\lambda d w ^2)]^{-1}$		

3.8. *Rhodnius prolixus*

Pertencentes à subfamília *Triatominae*, *R. prolixus* (Figura 3-16), *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* são os principais insetos vetores do *Trypanosoma cruzi* no Continente Americano (FISTEIN ; CHOWDHURY, 1969).



Figura 3-16 - *Rhodnius prolixus* (5º estágio).

O *Trypanosoma cruzi*, após intensa multiplicação no intestino médio do inseto como epimastigotas, sofre transformação para tripomastigota metacíclico, o qual pode ser transmitido para um novo hospedeiro vertebrado juntamente com as fezes durante o repasto sanguíneo (Figura 3-17) (GARCIA *et al*, 2007).

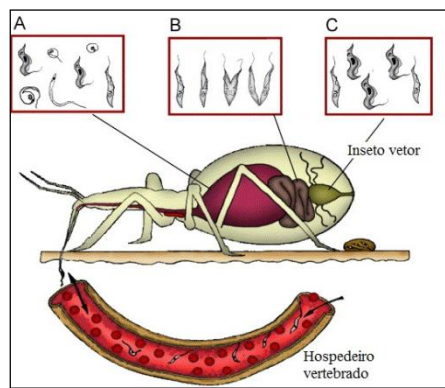


Figura 3-17 - Esquema do ciclo biológico do parasita *Trypanosoma cruzi* com o inseto vetor *Rhodnius prolixus*.

O inseto alimentado com sangue infectado com a forma tripomastigota os quais se transformam em (B) população de parasitas crescendo. No reto, epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas (C) os quais são eliminados com as fezes e a urina (GARCIA *et al*, 2007).epimastigotas e alguns spheromastigotes no estômago (A). No intestino, epimastigotas multiplicadas.

Rhodnius prolixus é uma espécie amplamente estudada e vem ganhando destaque na ciência ao longo dos anos por ser também vetor do *Trypanosoma rangeli* (BARRETT *et al.*, 2003; MAYA *et al.*, 2007; MELLO *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2003), este não considerado patogênico ao homem. Esta espécie tem sido usada como modelo de estudo por vários motivos. Primeiramente, pela facilidade de manipulação e criação em larga escala. O hábito alimentar descontínuo dos triatomíneos, de uma maneira geral, tem como vantagem, o fato de que uma única alimentação sanguínea por estágio é capaz de deflagrar sincronicamente eventos fisiológicos relacionados ao seu desenvolvimento, o que culmina com a muda (ecdise) para o próximo estágio. Outra vantagem do uso do *R. prolixus*, é sua disposição à alimentação pela utilização de um aparato artificial, ao qual é adicionado sangue desfibrinado ou contendo anticoagulante. Este comportamento permite, em curto período de tempo, o tratamento oral dos insetos com diferentes drogas e microorganismos, inclusive tripanossomatídeos, pela simples adição ao sangue alimentar. Seu ciclo de vida, no laboratório, necessita, em média, de 6 meses para completar de ovo a adulto (GARCIA *et al.*, 2007), sendo que a longevidade desta espécie favorece os experimentos em laboratório (GARCIA *et al.*, 1975; 1984). Outras características que tornam esta espécie interessante, é o fato que 5º estágio, após o repasto, aumenta seu peso corporal em até 12 vezes favorecendo a farta produção de urina, bem como a obtenção da hemolinfa, além da facilidade de visualização dos órgãos durante a dissecação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microtomografias

4.1.1. SYRMEP

As mediadas de microtomografias foram feitas na linha SYRMEP (SYnchrotronRadiation for MEDicalPhysics) do laboratório de luz síncrotron ELETTRA, localizado na província de Trieste na Itália.

A linha de luz SYRMEP é uma das 24 linhas do ELETTRA. A divergência horizontal do feixe é de 7 mrad. Esta linha provê, a uma distância de 23 m da fonte, um feixe de raios X monocromático com área de seção máxima de $140 \times 4 \text{ mm}^2$ a 20 keV. O monocromador é baseado em um sistema de duplo cristal de Si(111) funcionando na configuração de Bragg. O conjunto de cristais é equipado com controladores de movimentos de alta precisão para realizar alinhamentos angulares precisos do segundo cristal em relação ao primeiro. O feixe de saída é paralelo ao incidente com um deslocamento vertical de 20 mm. A faixa de energia útil é de 8,5 – 35 keV ($\Delta\lambda/\lambda \cong 10^{-3}$). O fluxo típico medido na posição da amostra a 17 keV é de aproximadamente $1,6 \times 10^8$ fótons/ $\text{mm}^2 \cdot \text{s}$ com uma corrente de elétron de 300 mA quando o ELETTRA está operando a 2,0 GeV, e $5,9 \times 10^8$ fótons/ $\text{mm}^2 \cdot \text{s}$ com 140 mA a 2,4 GeV (ABRAMI *et al.*, 2005). Todas as medidas foram realizadas com o ELETTRA operando a 2,0 GeV.

A Figura 4-1 representa o esquema funcional da linha de luz SYRMEP: a radiação é emitida pelos elétrons que circulam no anel quando sua trajetória é curvada por um campo magnético. A radiação assim emitida, pela tangente do anel, é policromática e a seleção da componente de energia desejada é definida pela difração sobre a superfície do cristal de silício sobre o plano cristalográfico (111). Para manter constante a direção de propagação dessa luz é escolhido um monocromador de dupla reflexão. A linha é completada por um sistema de fendas que definem as dimensões do feixe e por uma câmara de ionização que serve para medir a intensidade da radiação incidente sobre a amostra. O feixe é fixo e a aquisição das imagens é possível pelo movimento do objeto em frente ao feixe laminar.

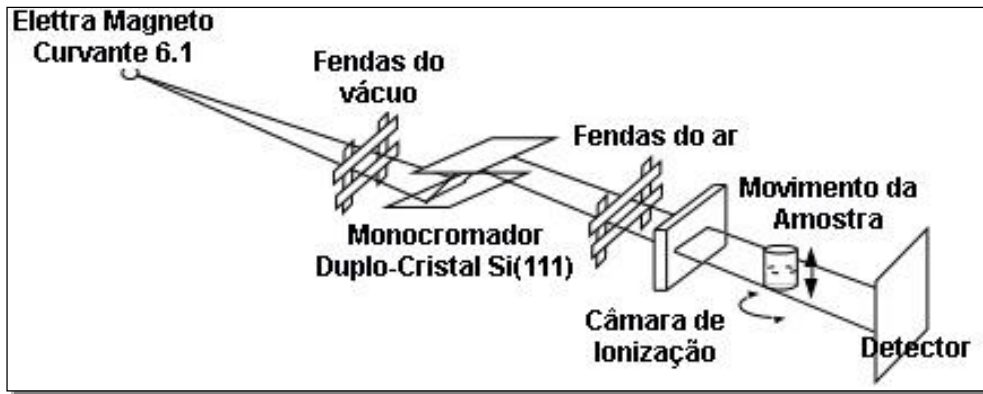


Figura 4-1 – Esquema funcional da linha SYRMEP.

A estação experimental está situada a aproximadamente 23 m da fonte. A câmara de ionização (Figura 4-2) colocada antes da mesa posicionadora de amostra é usada para determinar a exposição e, conseqüentemente, a dose depositada na amostra. A mesa posicionadora possui dois motores para realizar movimentos micrométricos de translação vertical e horizontal que permitem o posicionamento da amostra em relação ao feixe estacionário (TZAPHLIDOU, 2005).

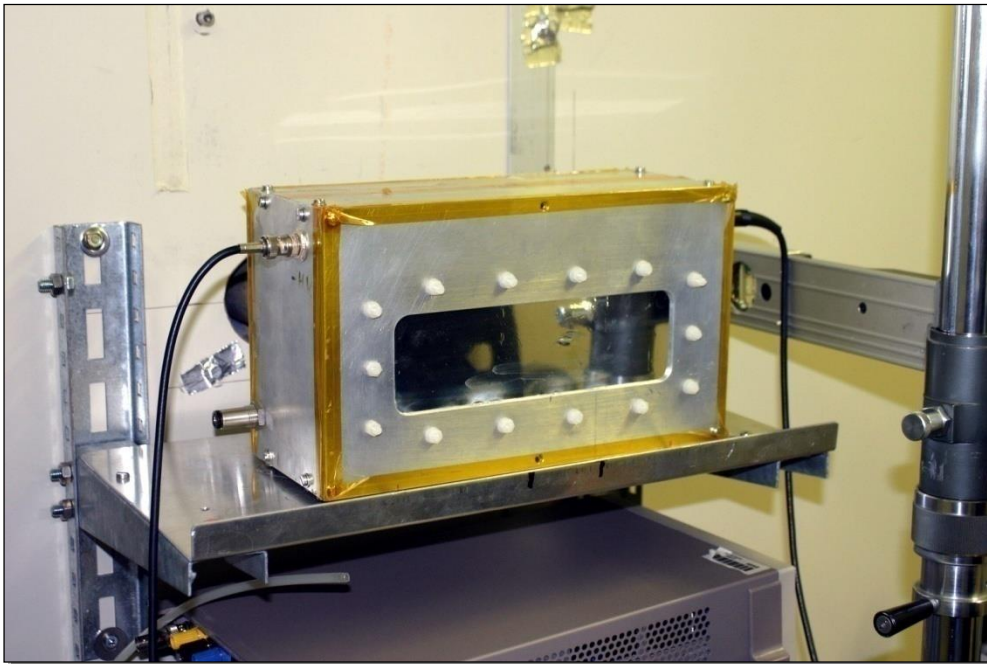


Figura 4-2 – Câmara de ionização.

Neste sistema de posicionamento da amostra, um suporte rotacional com resolução de $0,001^\circ$ (Figura 4-3) permite a realização das tomografias, sendo que o detector fica estacionário em frente ao feixe, enquanto o objeto gira em passos discretos em frente a ele. O sistema de detecção usado foi uma câmera CCD Hystar de 16-bits

(Figura 4-4), com $4008 \times 2672 \text{ pixels}^2$, tamanho de *pixel* de $4,5 \times 4,5 \mu\text{m}^2$. Este sistema pode ser posicionado a diferentes distâncias da amostra podendo variar de 0,1 a 1,0 m de forma a possibilitar a realização de imagens tanto por transmissão quanto por contraste de fase (Figura 4-5) (POLACCI *et al.*, 2006; TESEI *et al.*, 2005).

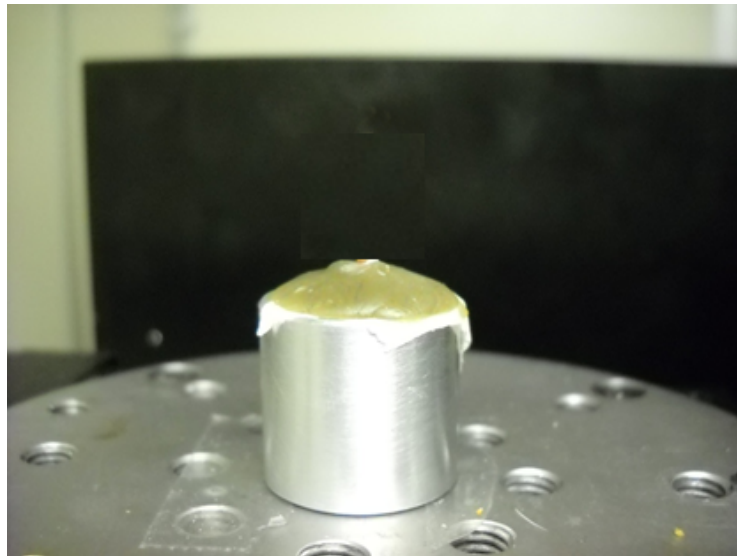


Figura 4-3 – Suporte rotacional.

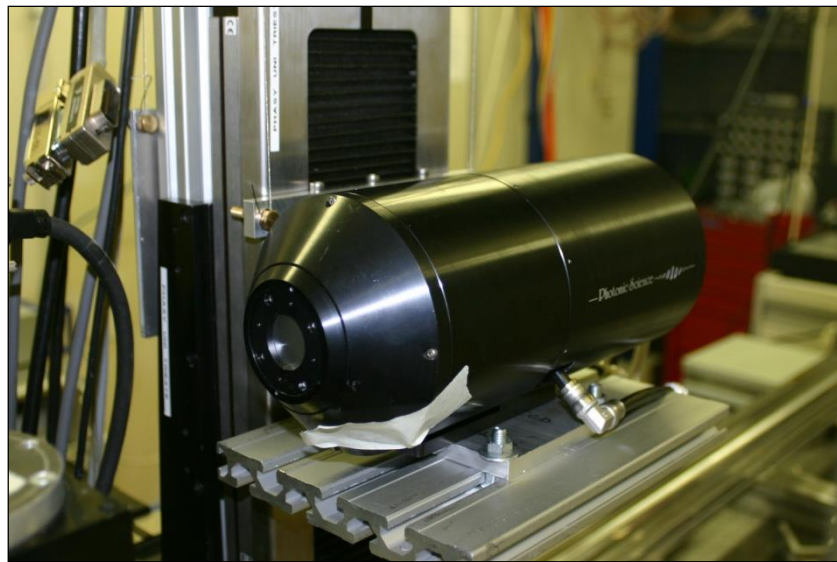


Figura 4-4 – Câmera CCD 16-bits utilizada na aquisição das imagens.

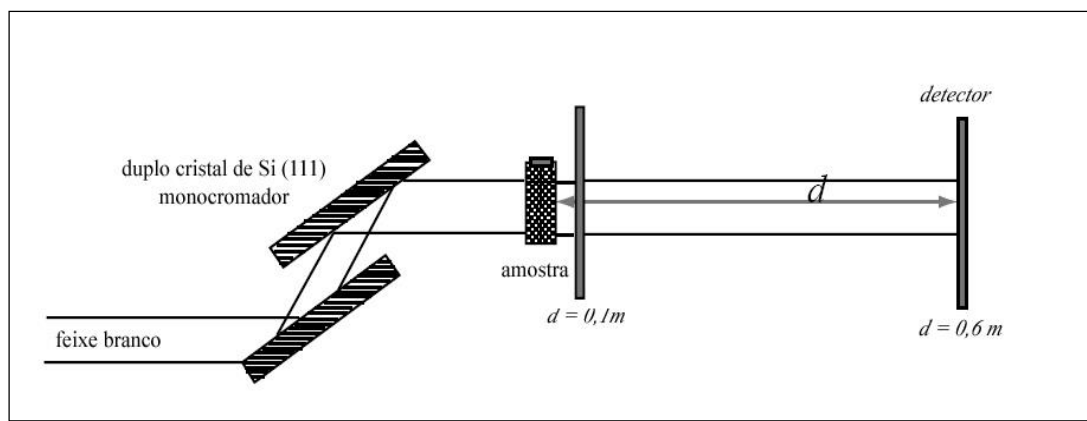


Figura 4-5 – *Setup* experimental usado para obtenção de imagens por transmissão e contraste de fase na linha do SYRMEP.

Seleção dos Parâmetros da Linha de Luz

Antes de começar as medidas tomográficas é necessário escolher os parâmetros experimentais: tamanho do feixe laminar, energia do feixe e distância amostra-detector. O sistema de controle da linha (*Beamline Control System*) – *mini BCS* – permite total aquisição de dados e controle remoto do tamanho do feixe e da energia escolhida (Figura 4-6a).

O feixe laminar entra da sala experimental a um distância de cerca de 23 m da fonte com uma seção de choque máxima disponível de $140 \times 4 \text{ mm}^2$ e é definido por um sistema de fendas micrométricas de tungstênio. Os sistemas de fendas são constituídos de quatro lâminas independentes chamadas *Left*, *Right*, *Up* e *Down* (Figura 4-6a). O tamanho do feixe é definido pelas dimensões do sistema de fendas do vácuo e do ar que o delimitam antes de atingir a amostra. Para a realização de todas as tomografias o tamanho do feixe foi igual a $40 \times 4 \text{ mm}^2$.

A energia do feixe pode ser escolhida dentro da faixa de 8,5 a 35 keV (com resolução em energia de 0,2%) através do posicionamento remoto do duplo-cristal monocromador. O ângulo de Bragg dos dois cristais de Si(111) e o posicionamento relativo do segundo cristal em relação ao primeiro são escolhidos de modo a selecionar a energia do feixe. Os motores Berger controlam tanto o movimento dos sistemas de fendas de vácuo e de ar quanto o ângulo de Bragg do duplo-cristal monocromador. Os valores de energia em keV estão relacionados a valores para os motores Berger e AML. Desta forma, definindo-se a energia, os motores são automaticamente acionados para os valores correspondentes (Figura 4-6b).

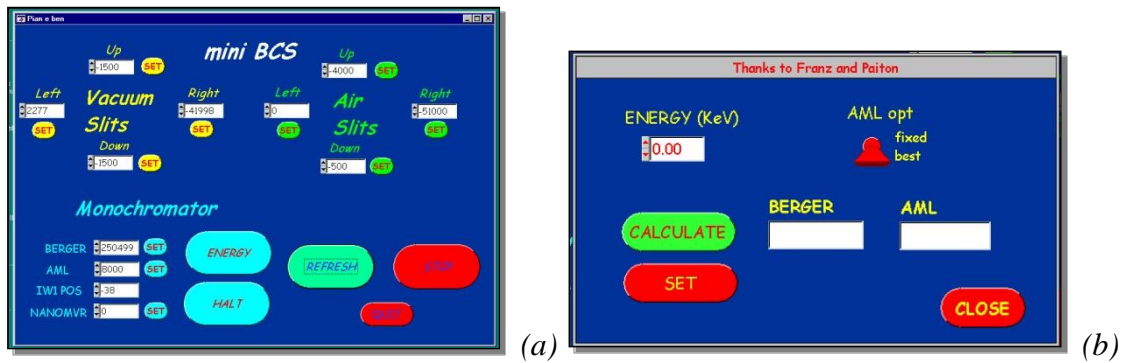


Figura 4-6 – (a) Interface do sistema de controla da linha mini-BCS; (b) Submenu para cálculo automático da energia do feixe

O fluxo deve ser maximizado através da suave rotação do segundo cristal no feixe de modo a encontrar o pico de máxima intensidade da *rocking curve* do cristal. Esse movimento é feito através do motor Berger escolhendo-se valores no campo NANOMVR na Figura 4-6a. Os valores de fluxo lidos pela câmara de ionização montada na sala experimental podem ser visualizados no monitor na sala de controle (Figura 4-7), sendo que altos valores de corrente correspondem a altos valores de fluxo de raios X. A energia escolhida para realização de todas as tomografias foi de 15 keV (Berger = 5319 e AML = 211025). Esse valor foi escolhido de modo a maximizar a relação sinal-ruído da câmara CCD observando-se a condição de razoável transmissão do feixe através da amostra sem desconsiderar que os efeitos de fase são maiores quando a energia do feixe é menor.

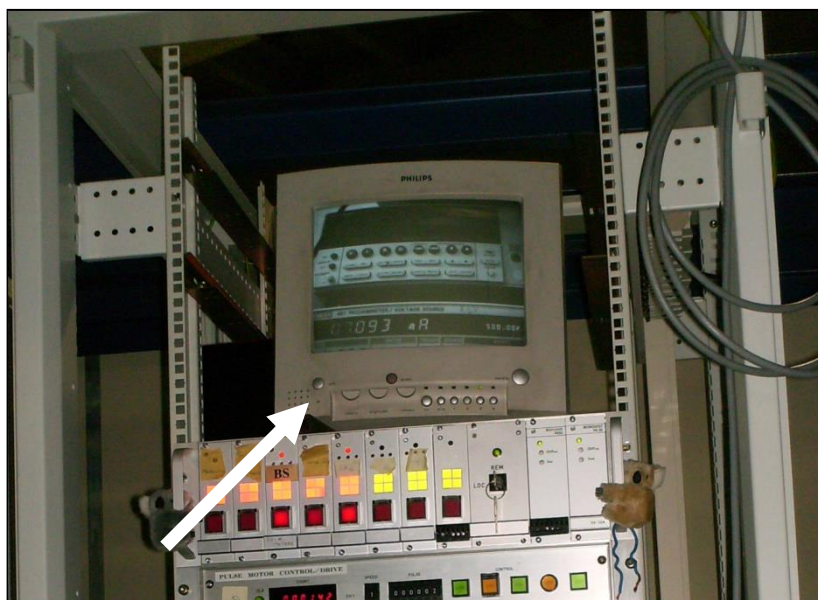


Figura 4-7 – Monitor indicando o fluxo do feixe de raios X lido pela câmara de ionização

Para obtenção das imagens o detector foi posicionado manualmente a 0,1 m da amostra movendo-se o detector no trilho indicado na Figura 4-8.

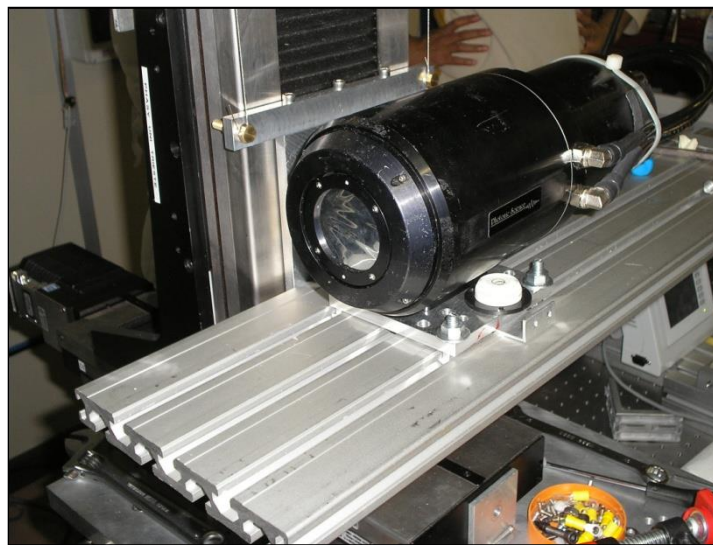


Figura 4-8 – Câmera CCD posicionada no trilho para seleção da distância amostra-detector

As amostras foram centralizadas no suporte de modo a utilizar a totalidade do campo de vista da câmera CCD. O posicionamento da amostra e do detector é feito pelos motores *Newport* da linha e realizado remotamente através da interface *Newport*(Figura 4-9). Para fazer esse alinhamento uma amostra padrão em forma de agulha é usada.

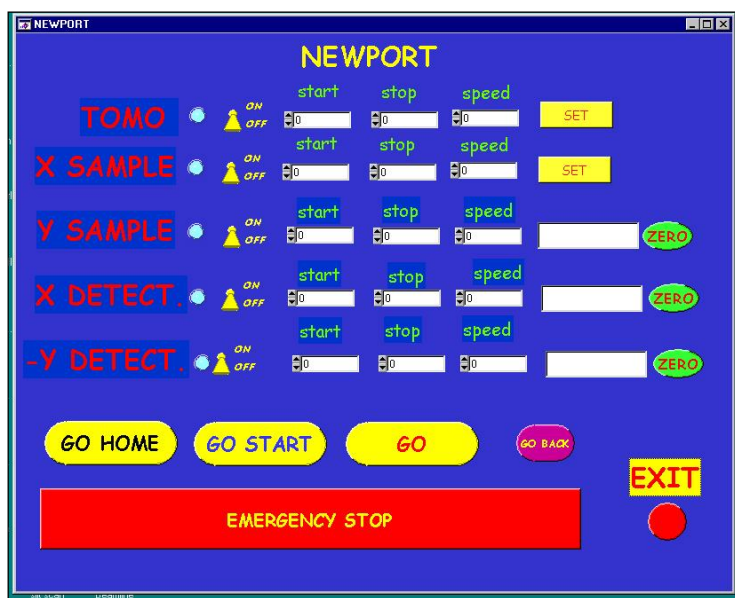


Figura 4-9–Interface do programa Newport para o alinhamento do centro da amostra e do detector

Aquisição das Tomografias

A amostra é rotacionada dentro do feixe monocromático incidente em um intervalo angular entre 0 e 180 graus. Para cada passo angular uma radiografia planar é gravada pela câmera CCD. Todo o controle dos parâmetros da câmera CCD para aquisição das imagens e a sincronização com os motores *Newport* da linha são realizados pelo programa *Image Pro Plus v.5.1*. Os parâmetros da câmera a serem definidos são: área de captura da imagem, tempo de exposição para cada aquisição e *binning* (Figura 4-10a e Figura 4-10b).

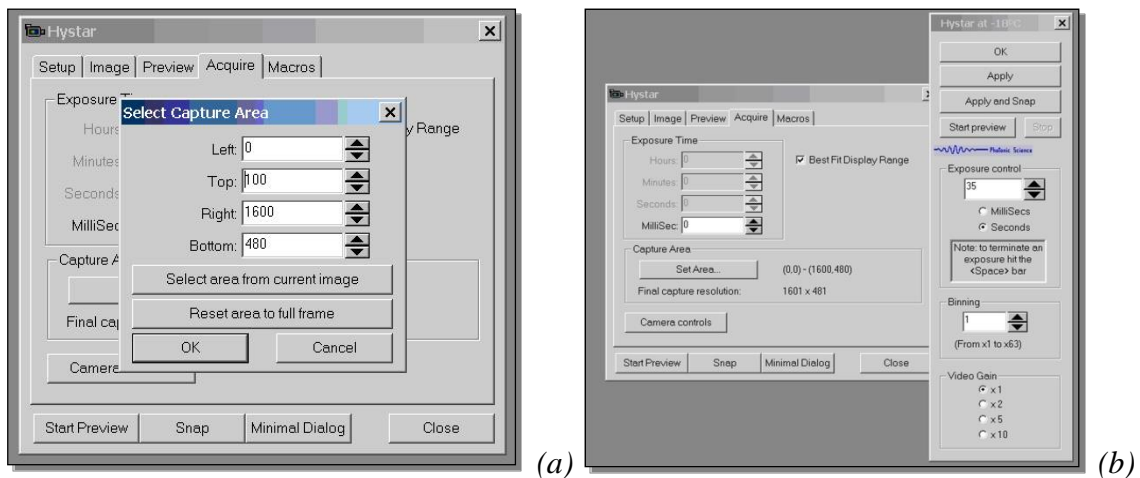


Figura 4-10 – Interface do programa Image Pro Plus: (a) Submenu para seleção da área de captura da imagem. (b) Submenu para seleção do tempo de aquisição e binning da imagem.

No submenu *Image* (Figura 4-11a) pode-se selecionar o número de imagens que se deseja obter: apenas uma imagem para o alinhamento da amostra e do detector ou uma série de imagens para a realização das medidas tomográficas. Uma macro permite fazer girar a amostra de um dado passo angular depois de cada aquisição (Figura 4-11b). Após cada aquisição, o arquivo é salvo na destinação definida.

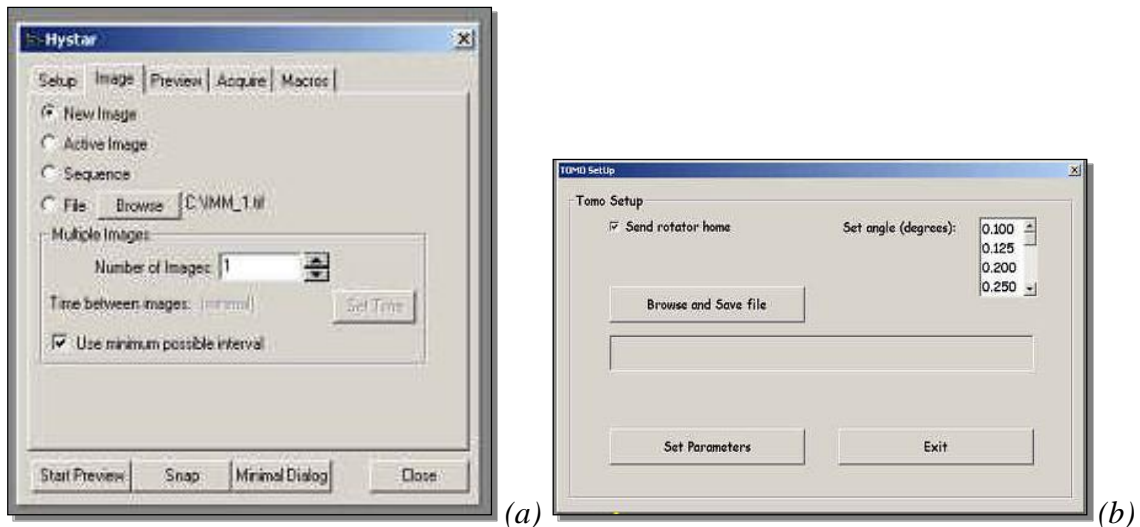


Figura 4-11 – (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas. (b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.

Para realização das tomografias foram obtidas 900 imagens ou projeções, ou seja, com passo angular igual de $0,2^\circ$. O tempo de aquisição para cada imagem foi de cerca de 2 segundos. O tempo de aquisição foi otimizado para cada amostra em função do decaimento do fluxo do feixe, mantendo-se fixa a intensidade medida no centro da amostra.

Todas as imagens obtidas serão normalizadas a partir da relação:

Equação 4-1

$$I_{\text{Normalizada}} = \frac{I_{\text{Amostra}} - I_{\text{Dark}}}{I_{\text{Flat}} - I_{\text{Dark}}}$$

Onde: I_{Amostra} é a imagem da amostra capturada pela câmera CCD após definidos todos os parâmetros experimentais;

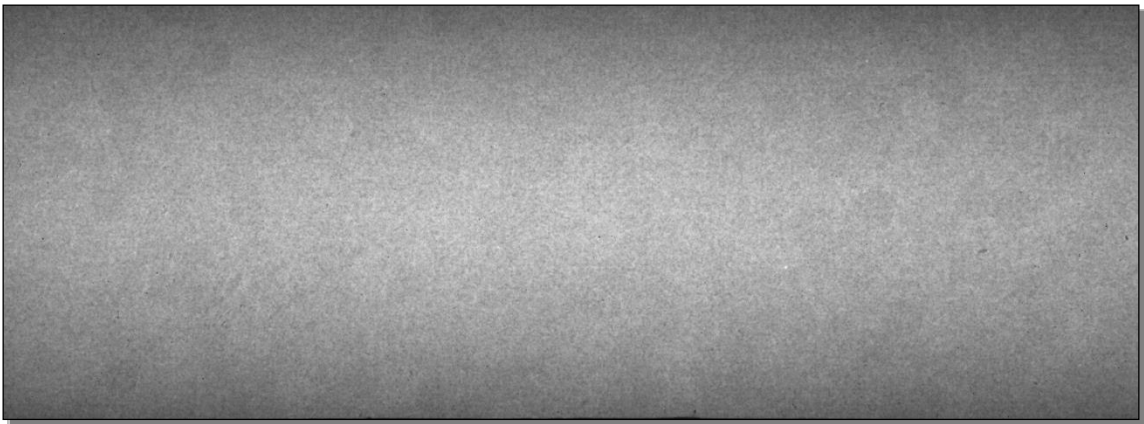
I_{Dark} é a imagem capturada pela câmera CCD com o *shutter* fechado (sem feixe);

I_{Flat} é a imagem capturada pela câmera CCD com o *shutter* aberto e sem a amostra na frente do feixe.

A Figura 4-12 mostra um exemplo de cada uma dessas imagens obtidas para uma amostra. I_{Dark} e I_{Flat} são imagens médias calculadas a partir de um conjunto de 5 imagens obtidas antes e depois da aquisição de todas as projeções.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4-12 – (a) Imagem da amostra. (b) Imagem flat. (c) Imagem dark. (d) Imagem normalizada

Reconstrução das Imagens

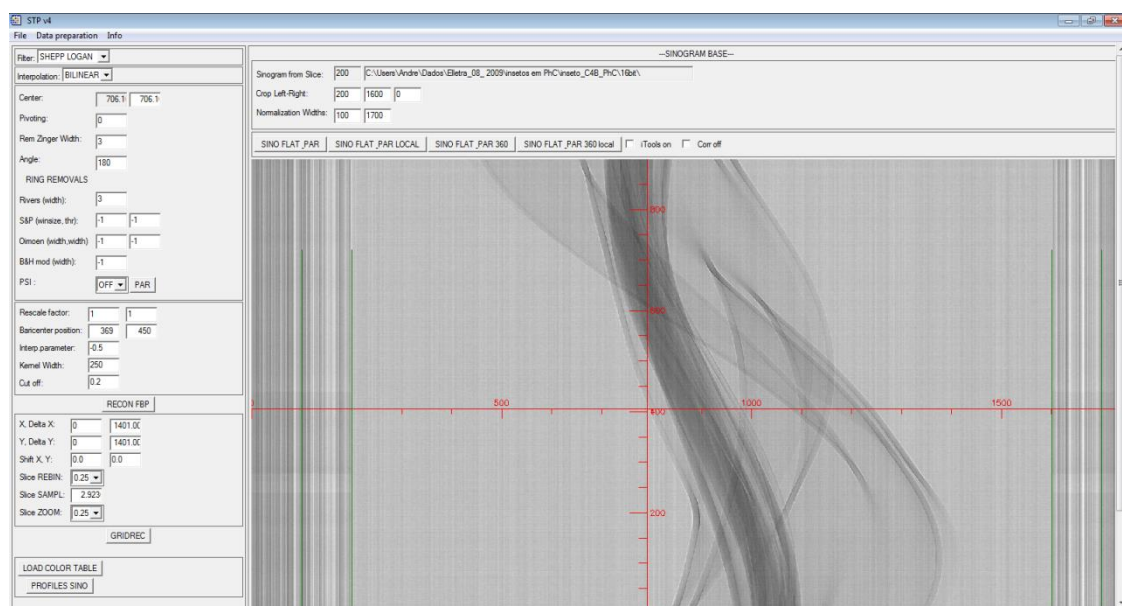
O procedimento de reconstrução das imagens foi desenvolvido pelo grupo SYRMEP no IDL (*Interactive Data Language*) que é um ambiente computacional completo para análise interativa e visualização de dados. O IDL integra uma poderosa linguagem com numerosas técnicas de análise matemática e visualização gráfica. O projeto IDL *SYRMEP_TOMO_PROJECT*, disponível na linha de luz, elabora as projeções através do seguinte procedimento de reconstrução usando retroprojeção filtrada:

- Mostrar uma única projeção normalizada. Para cada projeção um mapa de intensidades é gravado no plano xy do detector.
- Selecionar interativamente uma fatia da qual se deseja construir o sinograma (Figura 4-13a).
- Selecionar o filtro ao qual as fatias serão submetidos (*ramlak*, *shepp_logan*, *kernelwidth*, *rem ring*, *rem zinger*). O filtro *Shepp-Logan* foi usado para todas as imagens.
- Escolher na imagem do sinograma a largura da fatia a ser reconstruída definindo os limites esquerdo e direito (*CropLeftRight*) no sinograma de modo a selecionar a região que realmente contém os dados (Figura 4-13b).
- Otimizar o valor para o centro de rotação de modo a obter um sinograma melhor centrado em relação ao eixo de rotação minimizando assim, o aparecimento de artefatos nas fatias reconstruídos.

- Finalmente, depois de otimizados os parâmetros tomográficos, todos os sinogramas podem ser criados e as fatias podem ser reconstruídos. Todos as fatias foram convertidos de 16-bits para 8-bits para maior rapidez na reconstrução e tratamento das imagens. O tempo total para reconstrução das imagens 2D foi de cerca de 2 horas.
- As fatias reconstruídos são então tratados por um processo de “renderização” para a reconstrução 3D onde os slices2D são visualizados como uma pilha (*Stack*) (Figura 4-13c).



(a)



(b)

Figura 4-13 – (a) Janela do programa de reconstrução mostrando um exemplo de projeção e a escolha do slice na imagem. (b) Sinograma da fatia escolhida definindo os limites esquerdo e direito e o filtro usado.

Preparação das Amostras

Os insetos ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: *Reduviidae*) foram criadas e mantidos a uma temperatura de 28 ° C com umidade relativa entre 60% e 70%. As ninfas de 5º estágio foram alimentadas, como mostra a Figura 4-14 com sangue citratado humano ou sangue desfibrinado de coelho usando um aparelho artificial tal como anteriormente descrito por Garcia *et al.* (1984). Três dias após a alimentação, os insetos foram imobilizados a uma temperatura de 4 ° C por 10 min e fixados em uma mesa de isopor com alfinetes entomológicos. Os insetos foram cortados transversalmente na junção entre o protórax e o segmento mesotórax do corpo. As amostras foram fixadas e mantidas à temperatura ambiente em solução fixadora de glutaraldeído a 1%, sacarose 5% em tampão caco-dilato de sódio 0,1M, pH 7,4.

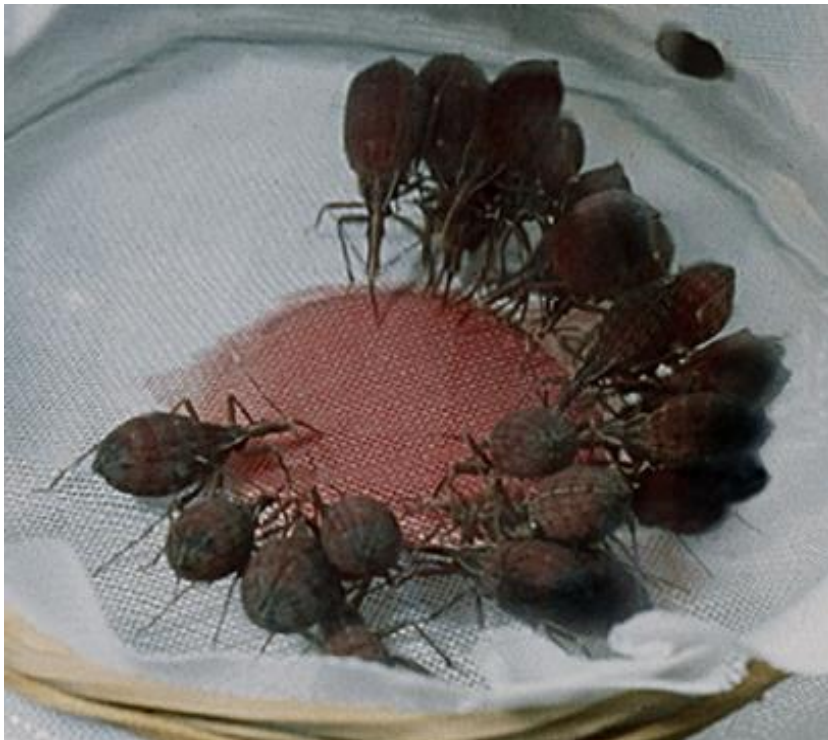


Figura 4-14- Alimentação do *Rhodnius prolixus*

Tratamento das projeções para a recuperação de fase

Para o tratamento das projeções das tomografias, foi usado o plugin *ANKAphase* (WEITKAMP *et al.*, 2011) do software ImageJ³ (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2010), que foi concebido para dar um acesso mais amplo da comunidade científica para a utilização da técnica de recuperação de fase para medidas que usam a técnica de tomografia de raios X por contraste de fase. Este algoritmo foi escolhido por simples e robusto e por operar em radiografias simples (WEITKAMP *et al.*, 2011).

Os dados de entrada para o *plugin ANKAphase*, são :

- *I_{Amostra}*- Projeções (imagens radiográficas da amostra capturadas pela câmera CCD)
- *I_{Dark}*- Imagem dark
- *I_{Flat}*- Imagem flat
- Beta (β)- índice de absorção
- Delta(δ)- parâmetros de decréscimo do índice de refração
- Distância amostra-detector
- Energia do feixe monocromático
- Tamanho do pixel da câmera CCD

³ImageJ – Disponível gratuitamente em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

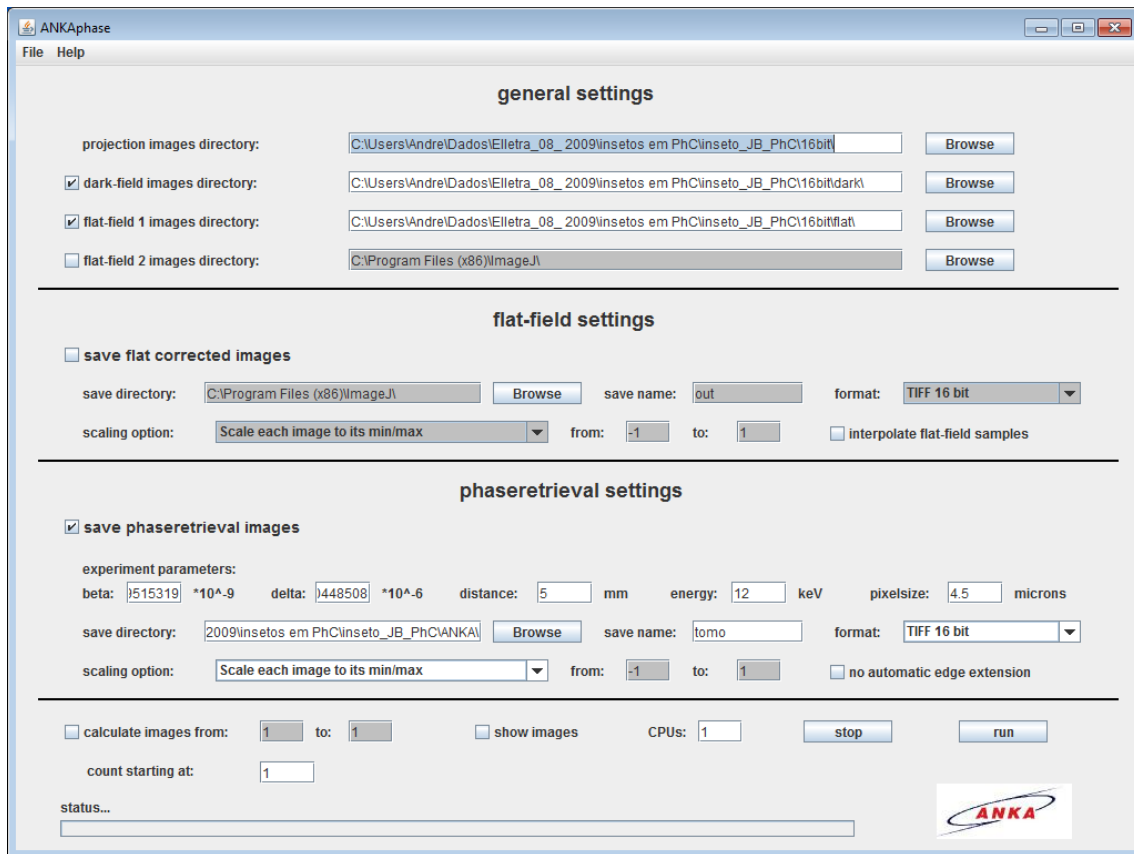


Figura 4-15 – Interface gráfica do *plugin* de recuperação de fase, ANKPhase

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Análise das estruturas internas e externas

A microtomografia computadorizada pode ser usada como uma técnica de imagem quantitativa e qualitativa, que permite visualização virtual de estruturas internas, em qualquer direção, sem a necessidade de demoradas e elaboradas dissecções (BETZ *et al.*, 2007). Desse modo, após a reconstrução 3D da imagem microtomográfica, a técnica permite gerar seções virtuais que podem ser estudadas em qualquer ângulo de interesse utilizando um software dedicado (ALMEIDA *et al.*, 2012a).

A aplicação da técnica SR-PhC- μ CT para a análise da anatomia *R. prolixus* demonstrou sua capacidade de visualizar detalhes da cabeça e do tórax do inseto. As imagens (Figura 5-1A, B e C) mostram diferentes vistas externas em 3D apresentando as características morfológicas de estruturas tais como, como gena, clipeo (ante e posclipeo), a parte ventral do crânio (gula) extremamente alongado (Figura 5-1A), bem como o lábio (probóscida) curvada para trás na posição de repouso com a sua labelle (Figura 5-1B e C).

Os olhos compostos situam-se entre gena e posgena pouco antes do posclipeo (Figura 5-1A e B), uma longa placa estridulatória, o mesoexterno, o protórax ventral e mesotórax foram também observados (Figura 5-1C). O lóbulo posterior da pronoto (Figura 5-1A) e a alavanca pleural anterior (Figura 5-1B) são facilmente distinguíveis das outras partes da cutícula do inseto.

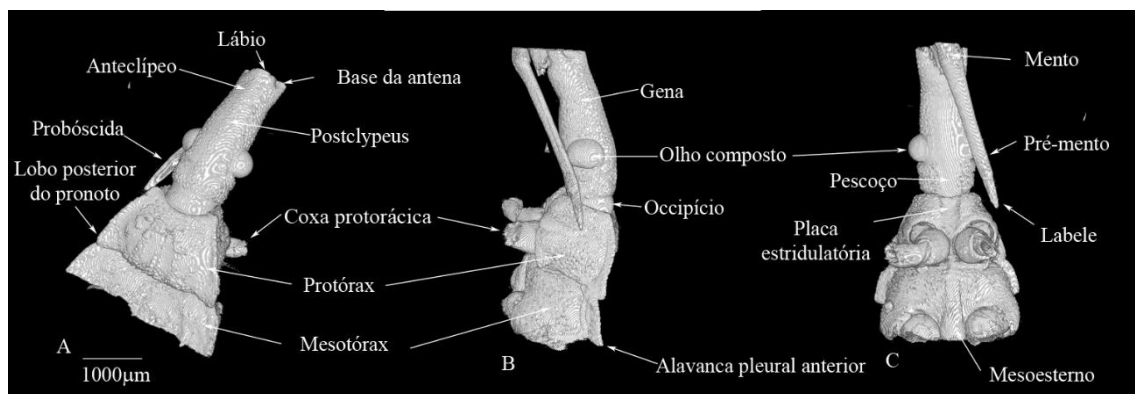


Figura 5-1-Visualização externa do *R. prolixus*. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2012a)

Da Figura 5-1 observa-se que a cabeça apresenta característica cuticular rugosa, é fortemente alongada, em forma de cunha, tendo sua maior largura na região ocular. Os olhos compostos são arredondados, salientes lateralmente na região média da cabeça. A

antena e as patas do inseto não são totalmente visualizadas porque foram cortadas na base de modo a impedir que a amostra não saísse do campo de visão do detector.

Estruturas anatômicas internas podem ser visualizadas utilizando cortes virtuais (2D) no volume reconstruído (3D), como pode ser visto na Figura 5-2. Além disso, as seções transversais virtuais permitem vistas detalhadas do sistema neuroendócrino: a estrutura frontal do cérebro e o seu gânglio protorácico e as inervações associadas (Figura 5-2B e C).

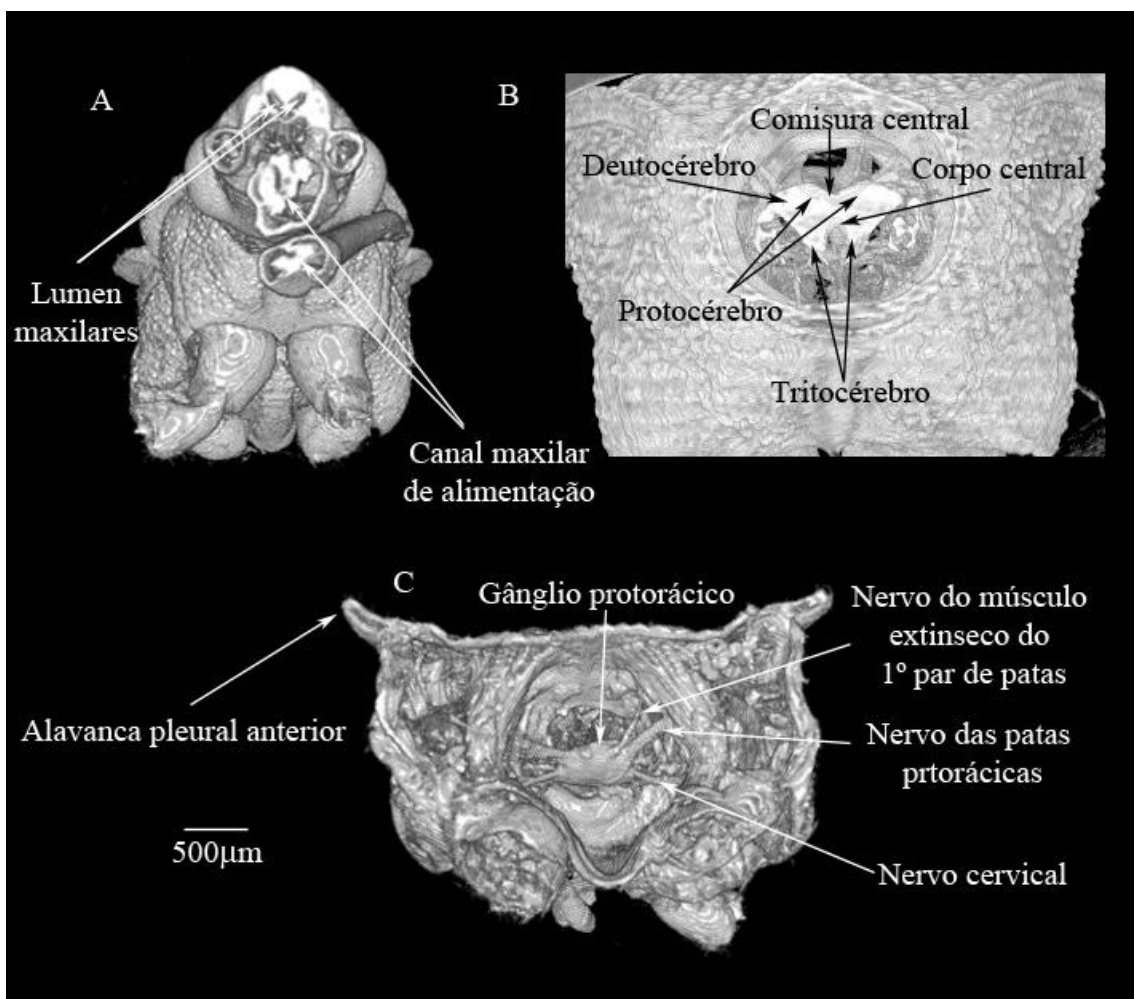


Figura 5-2 Volume reconstruído do *R. prolixus*. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012a)

Técnicas modernas, como a microscopia confocal, ressonância magnética e tomografia microfoco, fornecem métodos não-invasivos eficazes. No entanto, cada uma dessas ferramentas apresenta limitações, tais como: limitações quanto ao tamanho da amostra, limites de resolução e dificuldade para visualização de tecidos menos densos. A

técnica SR-PhC- μ CT nos permite visualizar a morfologia externa com precisão similar à obtida com uma imagem formada por um microscópio eletrônico de varredura, mas com a possibilidade de observar a amostra em qualquer orientação. Segundo SOCHA *et al.*, (2007), é possível visualizar detalhes que são difíceis de observar com precisão em um microscópio e também estas imagens de SR-PhC- μ CT são ideais para a visualização de estruturas internas com densidades próximas

O contraste entre os diferentes tecidos internos nas imagens de SR-PhC- μ CT foi suficiente para distinguir entre a estrutura cuticular e os tecidos moles como o músculo e o tecido nervoso. A observação de pequenos detalhes na amostra é facilmente acessível e observável, o que é particularmente interessante para os espécies de morfologia complexa (Figura 5-3). Além disso, as seções virtuais, horizontal e sagital (lateral) permitiram visualizações excelentes do cérebro e glândulas associadas (gânglios frontais e protorácica, *corpus allatum* e *corpora cardiaca*), bem como alguns nervos que emergem dos músculos do cérebro e protórax (Figura 5-3A e B).

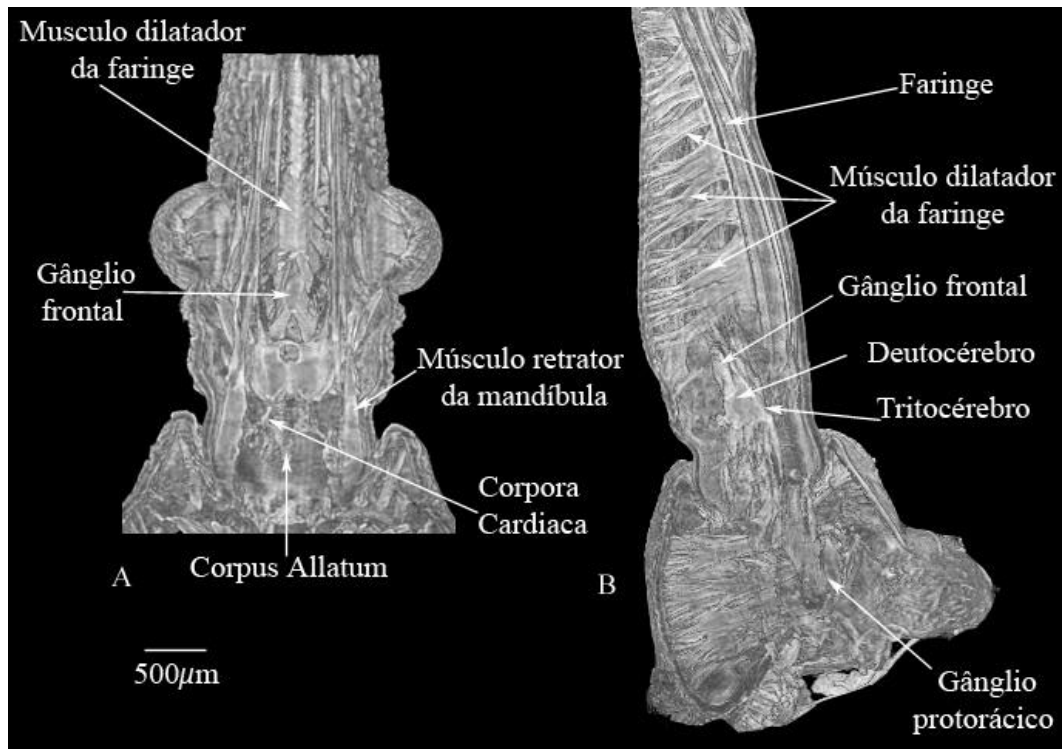


Figura 5-3 - Seção horizontal, virtual da cabeça do *R. prolixus* (a). Seção sagital virtual da cabeça do *R. prolixus* (b). (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012a)

5.2. Análise das estruturas internas e externas usando recuperação de fase

As imagens reconstruídas utilizando a técnica de recuperação de fase foram muito úteis para a documentação de características externas, mas especialmente para as estruturas internas, incluindo partes moles, tais como os músculos e os elementos do sistema nervoso central (Figura 5-4). As imagens resultantes exibem um contraste de área ao invés do efeito *halo* que permite uma visualização mais detalhada de diferentes estruturas (ALMEIDA *et al.*, 2012b). As estruturas internas foram identificadas comparando com estudos anatômicos sobre o sistema nervoso de *R. prolixus* conduzido por (RAMÍRES-PÉREZ, J., 1969), baseado em dissecções.

A Figura 5-4 mostra a vista ventral da cabeça, apresentando importantes estruturas internas: protocérebro, *corpus allatum* e *corpora cardiaca*. O protocérebro é a parte predominante do cérebro. Também pode ser notado que o cérebro é pequeno em relação ao tamanho da cabeça.

O deuto e tritocerebro são cobertos dorsalmente pelos grandes lobos protocerebrais (Figura 5-5). O deutocerebro é muito menor do que protocérebro.

Encontra-se lateralmente e ventralmente ao cérebro, abaixo do protocérebro. O tritocérebro também é muito pequeno e encontra-se medial à deutocérebro.

O músculo dilatador da faringe, o músculo retrator da mandíbula e o esôfago podem ser identificado na Figura 5-6. Pode-se notar que o gânglio frontal é ligado ao tritocérebro. A Figura 5-7 mostra uma vista dorsal da cabeça e do protórax mostrando o músculo retrator da maxila, as glândulas salivares, o esôfago, a glândula protorácica, o gânglio mesotorácico, o segmento anterior do estômago e os nervos que emergem do cérebro e os músculos protórax.

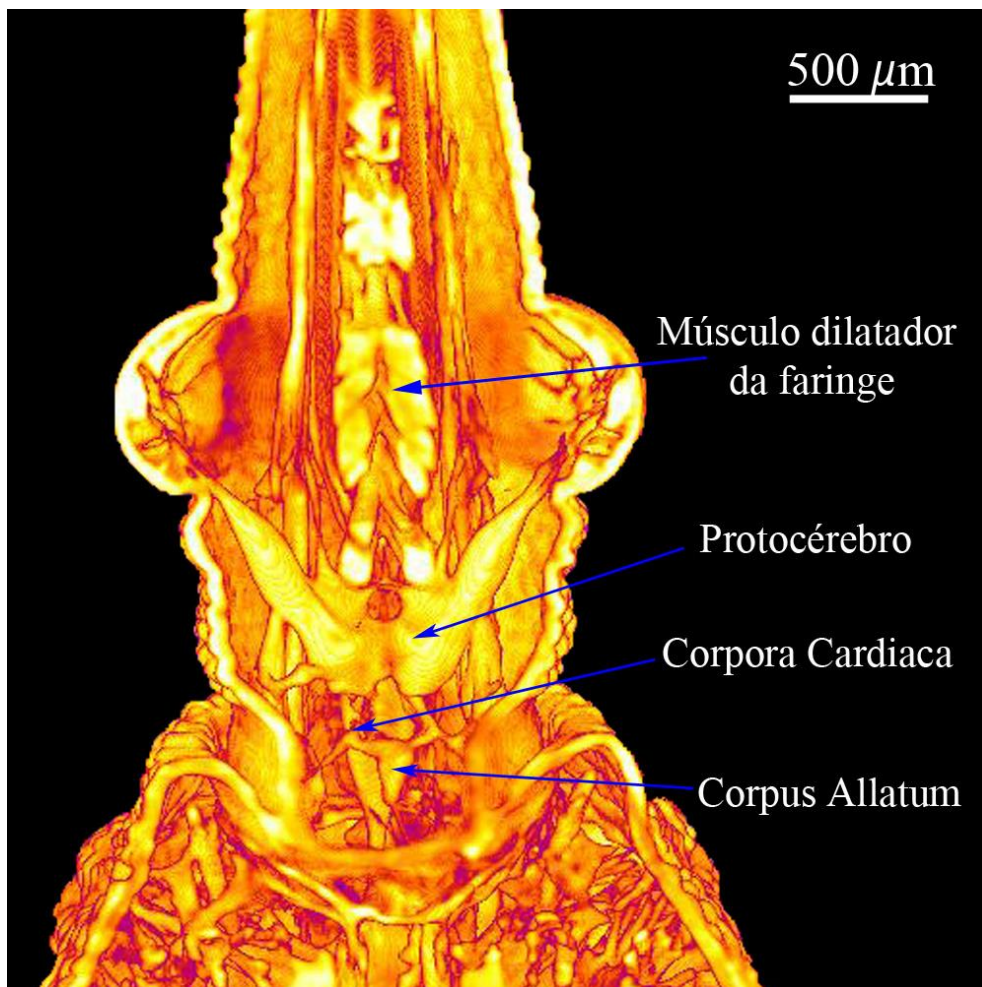


Figura 5-4 - - Seção horizontal, virtual da cabeça do *R. prolixus*, usando recuperação de fase. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b)

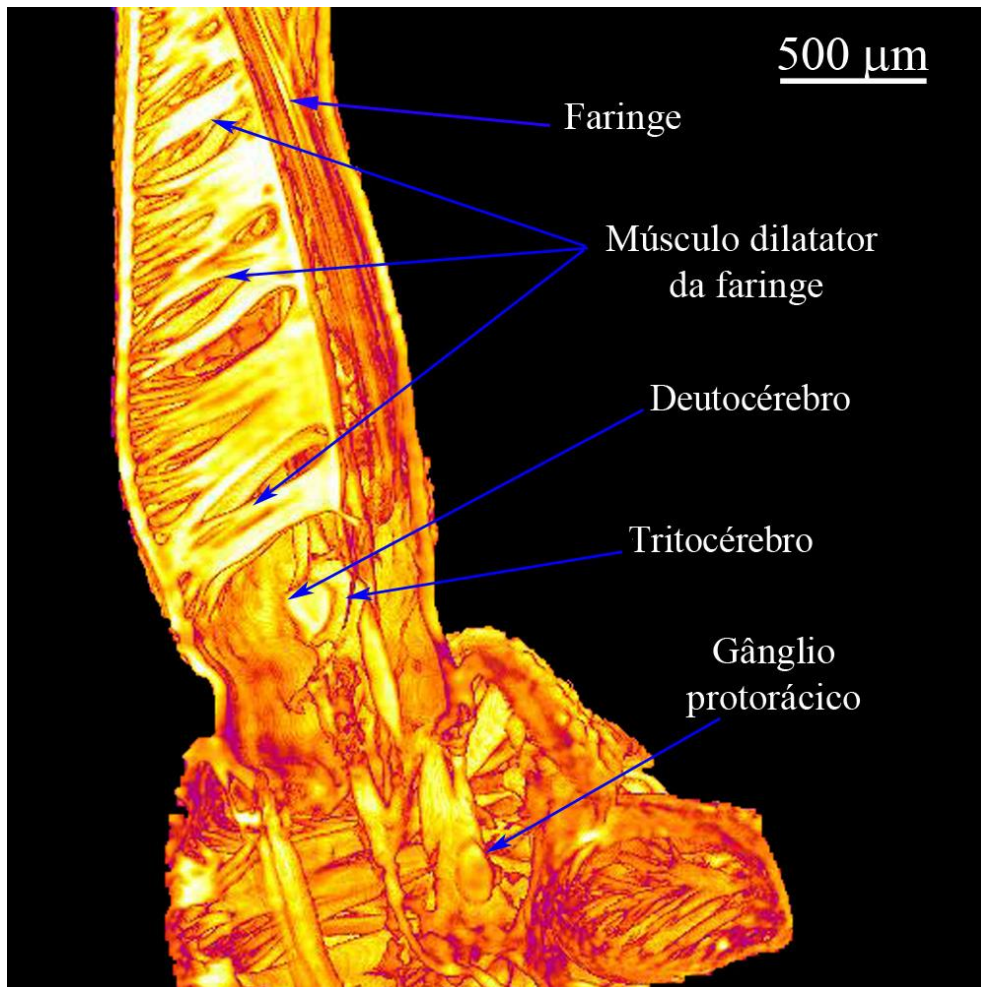


Figura 5-5-Seção sagital virtual da cabeça do *R. prolixus*, usando *recuperação de fase*. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b)

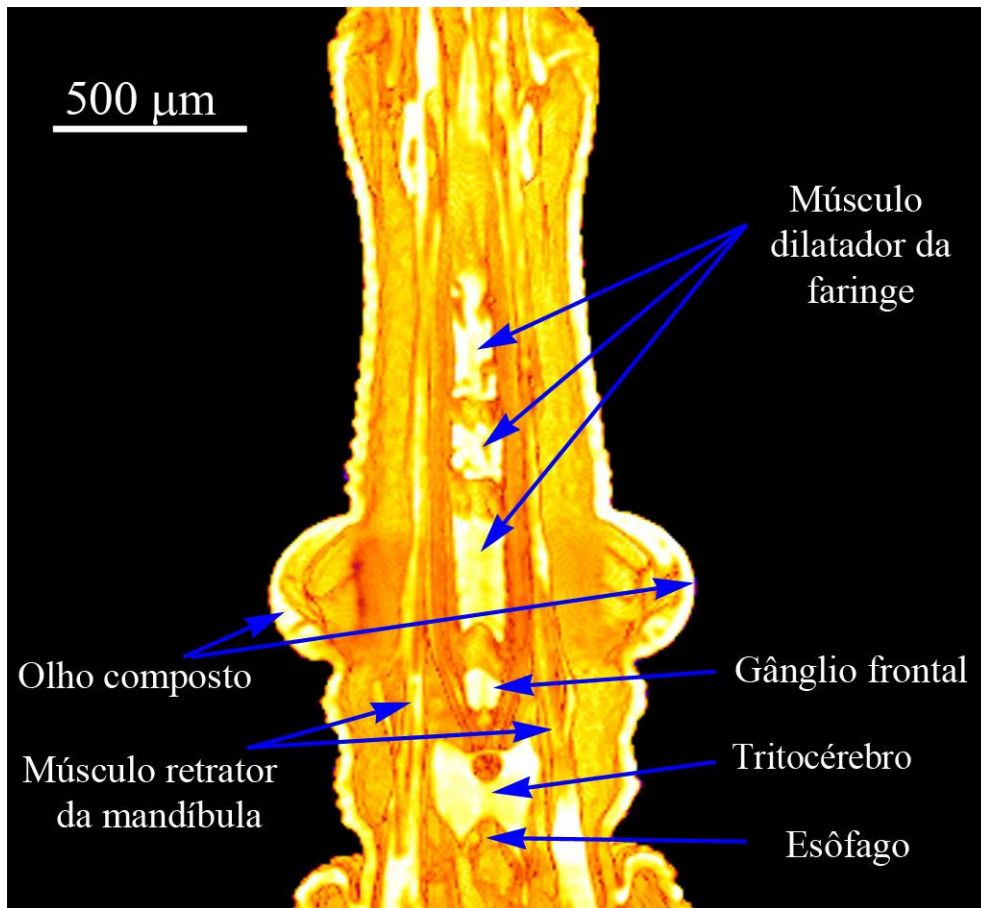


Figura 5-6 - Seção dorsal, virtual da cabeça do *R. prolixus*, usando *recuperação de fase*. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b)

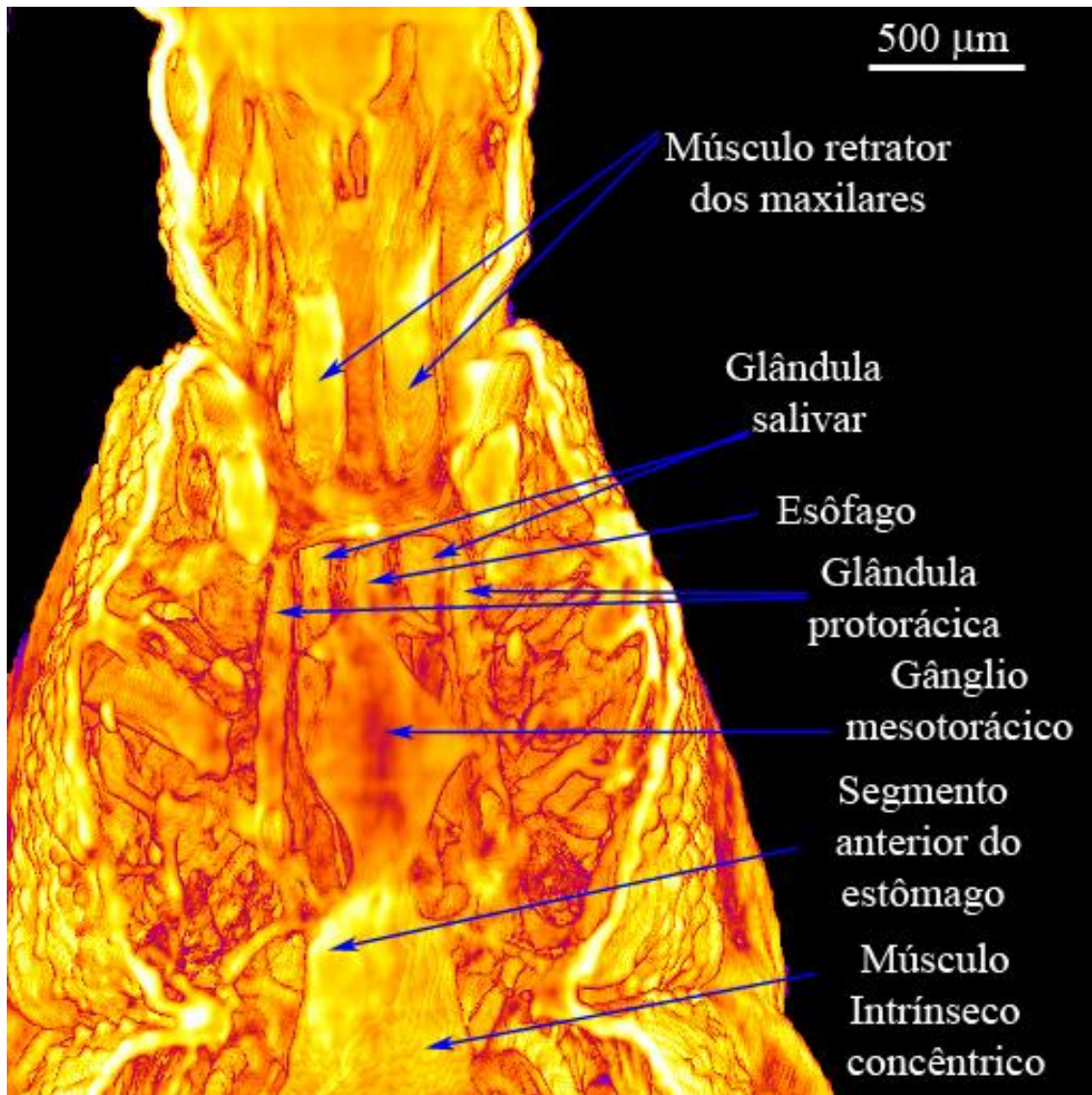


Figura 5-7 - Seção horizontal, virtual do protórax do *R.prolixus*, com recuperação de fase. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2012b)

5.3. Comparação das imagens obtidas com e sem recuperação de fase

O protocérebro e outras estruturas internas do *Rhodnius prolixus* foram identificadas nas figuras (Figura 5-8, Figura 5-9 e Figura 5-10), que mostram as imagens reconstruídas com (b) e sem (a) recuperação de fase. As imagens (Figura 5-8a, Figura 5-9a e Figura 5-10a) apresentam informações mais detalhadas e mais nítidas do contorno do *Rhodnius prolixus* do que nas figuras (Figura 5-8b, Figura 5-9b e Figura 5-10b) devido o realce da borda na reconstrução sem recuperação de fase. Por outro lado, nas figuras (Figura 5-8b, Figura 5-9b e Figura 5-10b) as diferentes partes da amostra são mais uniformes do que nas imagens (Figura 5-8a, Figura 5-9a e Figura 5-10a) que estão mais

fiéis à forma real da amostra e, conseqüentemente, permitem uma abordagem mais intuitiva para estudos científicos.

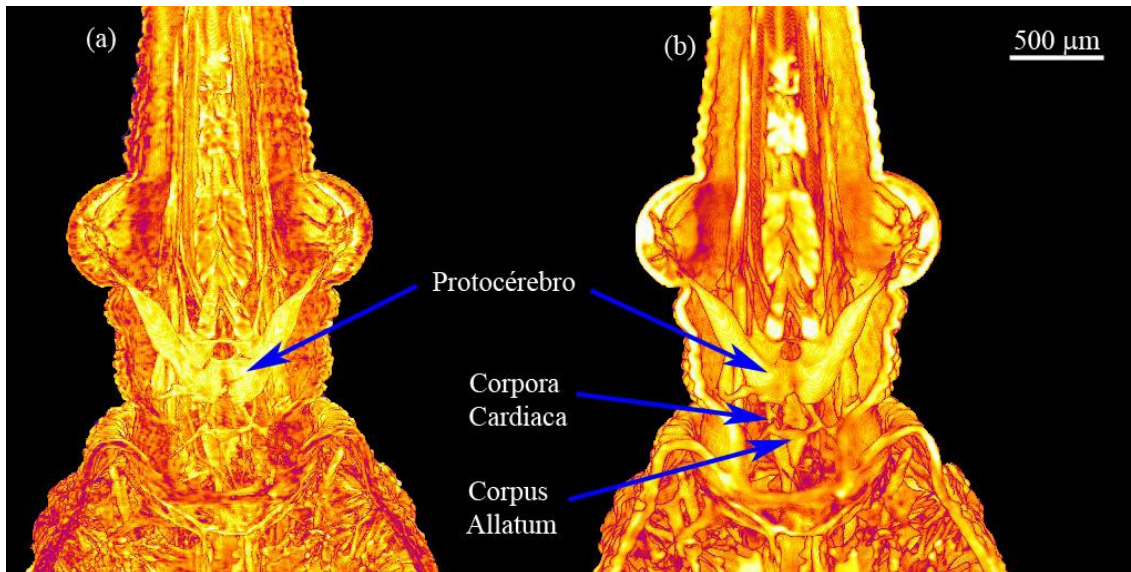


Figura 5-8 Seção horizontal, virtual da cabeça do *R. prolixus*. (a) Sem recuperação de fase e (b) com recuperação de fase. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2014)

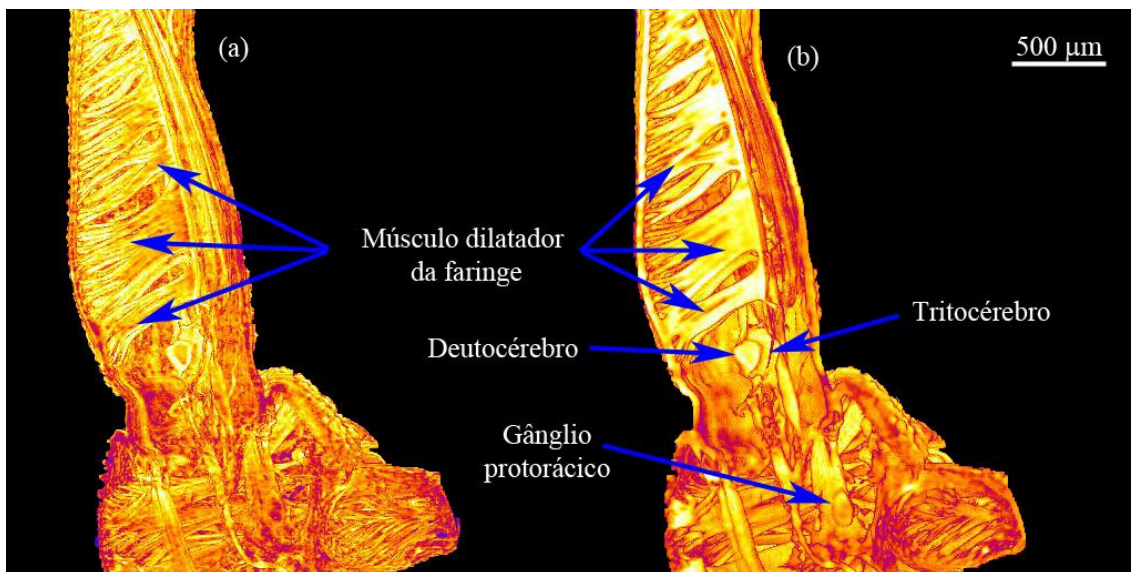


Figura 5-9 Seção sagital virtual da cabeça do *R. prolixus*. (a) Sem recuperação de fase e (b) com recuperação de fase. (Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2014)

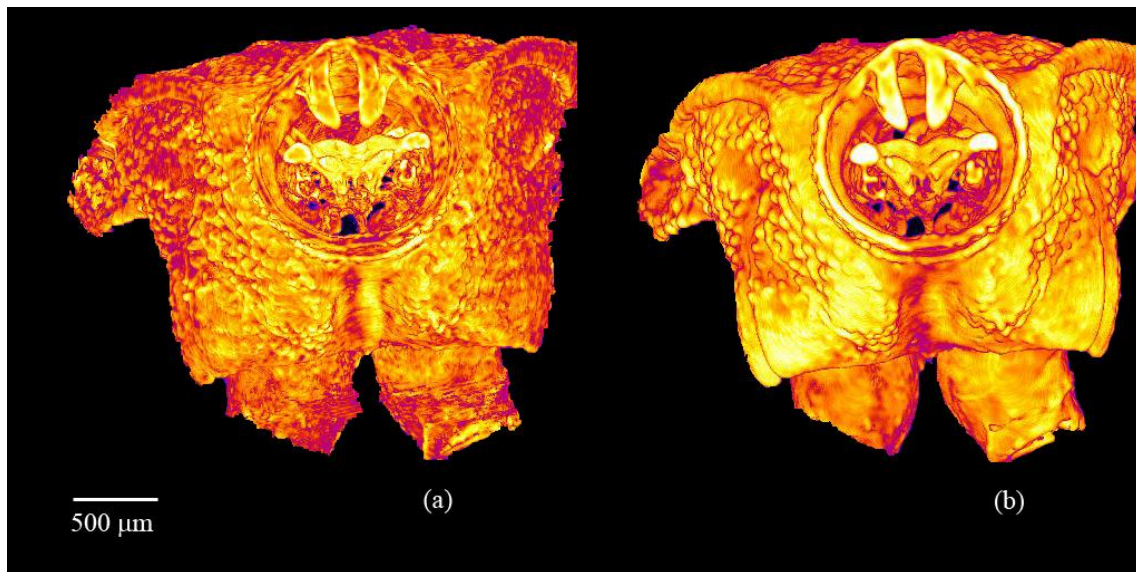


Figura 5-10 Volume reconstruído do *R. prolixus*, visualização anteposterior. (a) Sem recuperação de fase e (b) com recuperação de fase.

6. CONCLUSÃO

Os métodos de imagem têm desempenhado um papel importante como ferramentas de pesquisa em medicina e biologia. Compreender a morfologia de estruturas anatômicas é de suma importância para aplicações biomédicas. Para animais pequenos, métodos clássicos, tais como histologia, proporcionam uma riqueza de dados, mas tais técnicas podem ser problemáticas devido à manipulação das amostras.

O uso da técnica de microtomografia por contraste de fase usando luz síncrotron (SR-PhC- μ CT), tornou possível o acesso a informações sobre a sintopia dos órgãos e estruturas do *Rhodnius prolixus* de uma forma não-invasiva, fornecendo dados precisos e conservando informações relativas à sua função e desenvolvimento. Esta técnica não-invasiva e não-destrutiva, permite observar estruturas e órgãos preservando sua plasticidade e desenvolvimento original.

Este trabalho é a conclusão de uma série de estudos que usaram a SR-PhC- μ CT para o estudo da morfologia do *R. prolixus*. No primeiro estudo (ALMEIDA *et al.*, 2012a) a visualização de diversas características detalhadas foi possível graças aos efeitos do realce das bordas (efeito *halo*), típicos da técnica de contraste de fase. No segundo (ALMEIDA *et al.*, 2012b), o mesmo conjunto de dados foram revistos com a aplicação de um algoritmo de recuperação de fase (*ANKAPhase*). No último (ALMEIDA *et al.*, 2014), uma comparação das imagens obtidas com os dois métodos de reconstrução foi realizada. A comparação mostrou uma complementaridade das duas abordagens, que enfatizam detalhes (sem recuperação de fase) ou a estrutura geral (com recuperação de fase) da amostra.

Esta técnica abre uma janela de oportunidades para estudar modelos de interação utilizando insetos vetores e espécies de parasitas. Assim, a SR-PhC- μ CT mostrou ser uma técnica muito apropriada para superar o problema da geração de conjunto de dados 3D oriundos de informações 2D, típico de técnicas baseadas em microscopia, o que deve ajudar a responder a questões importantes relativas à anatomia, desenvolvimento, plasticidade e estrutura do inseto.

O uso de técnicas não-invasivas para estudar a fisiologia de vetores de doenças endêmicas importantes é uma abordagem tão inovadora, que agora nos permite realizar

novas estratégias para a compreensão de forma e função em um animal vivo durante a observação em tempo real, sem dissecções e outras condições de estresse.

No caso do *Rhodnius prolixus*, a técnica de SR-PhC- μ CT pode ser usada especialmente para identificação dos aspectos fisiológicos dos sistemas neuroendócrino, digestivo e reprodutivo que seriam fatores chave para controlar e reduzir tanto a reprodução da população dos insetos como também a sua susceptibilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMI, A., ARFELLI, F., BARROSO, R. C., *et al.*, 2005. "Medical applications of synchrotron radiation at the SYRMEP beamline of ELETTRA". *Nucl. Instrum. Meth. A* 548, 221–227.
- ARFELLI, F., 2000, "Synchrotron Light and Imaging Systems for Medical Radiology", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 454, pp. 11-25.
- ALMEIDA, A. P., SOARES, J., MENESES, A. A. M *et al.*, 2012a. "Phase contrast X-Ray synchrotron imaging for assessing external and internal morphology of *Rhodnius prolixus*". *Applied Radiation and Isotopes* 70, 1340–1343
- ALMEIDA, A. P., BRAZ, D., NOGUEIRA, L. P., *et al.*, 2012b. "Application of the SR-PhC- μ CT technique with phase retrieval for the characterization of internal and external structures of *Rhodnius prolixus*", *Journal of Instrumentation* 8, C07004
- ALMEIDA, A. P., BRAZ, D., NOGUEIRA, L. P., *et al.*, 2014. "Phase contrast X-ray microtomography of the *Rhodnius prolixus* head: Comparison of direct reconstruction and phase retrieval approach", *Radiation Physics and Chemistry* 95, 243–246
- ALS-NIELSEN J, MCMORROW D, 2001. *Elements of Modern X-Ray Physics* (Chichester: Wiley)
- ARHATARI, B. D., MANCUSO, A. P., PEELE, A. G., *et al.*, 2004. "Phase contrast radiography: Image modeling and optimization", *Rev. Sci. Instrum.* 75 (12), 5271-5276.
- BARRETT, P M., BURCHMORE, R. J., STICH, A., *et al.* "The trypanosomiasis, Review Article" *The Lancet*. v. 362, p. 1469-1480. 2003.
- BARROSO, R.C., 1997, *Tomografia Computadorizada Seletiva Usando Efeitos de Interferência em Difração de Raios X*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- BETZ, O., WEGST, U., WEIDE, D., *et al.*, 2007. "Imaging applications of synchrotron X-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. I. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure". *J. Microsc.* 227, 51–71.
- BEUTEL, R.G., GE, S., HO, T., HÖRNSCHEMEYER, T., 2008. "On the head morphology of *Tetraphalerus*, the phylogeny of Archostemata and the basal branching events in Coleoptera". *Cladistics* 24, 270–298.
- BONSE, U., HART, M., 1965 "An x-ray interferometer," *Appl. Phys. Lett.* 6, 155–156.
- BORN, WOLF, 1999. "Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light", *Cambridge University Press* 7th ed. , Cambridge, United Kingdom.
- BURVALL, A., LUNDSTRÖM, U., TAKMAN, P. A. C., *et al.*, 2011 "Phase retrieval in X-ray phase-contrast imaging suitable for tomography", *optics express* 19, (11), 10359-10376
- CASTILHO, R.B., 2006, *Fotoionização de Produtos Naturais Voláteis Utilizando Luz Síncrotron e Técnicas de Tempo de Vôo*. Tese de D.Sc., COOPE/UF RJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- CHAPMAN, D., THOMLINSON, W., JOHNSTON, R. E., *et al.*, 1997. "Diffraction enhanced X-ray imaging", *Phys. Med. Biol.* 42, 2015–2025.
- CHEN, R. C., RIGON, L., LONGO, R., 2011. "Quantitative 3D refractive index decrement reconstruction using single-distance phase-contrast tomography data", *J. Phys. D*, 44, 495401.
- CLOETENS, P., BARRETT, R., BARUCHEL, J., *et al.*, 1996. "Phase objects in synchrotron radiation hard X-ray imaging" *J. Phys. D: Appl. Phys.* 29, 133–146.
- DAVID, C., NÖHAMMER, B., SOLAK, H. H., *et al.* , 2002, "Differential X ray phase contrast imaging using a shearing interferometer." *Appl. Phys. Lett.* 81, 3287–3289.
- DAVIS, T. J., GAO, D., GUREYEV, T. E., *et al.*, "Phase-contrast imaging of weakly absorbing materials using hard X-rays", *Nature* 373, 595–598 (1995).

- EBERHARD, M.J.B., LANG, D., METSCHERET, B., *et al.*, 2010. "Structure and sensory physiology of the legs colopodial organs in Mantophasmatodea and their role in vibrational communication". *Arthropod. Struct. Dev.* 39, 230–241.
- FISTEIN, B.; CHOWDHURY, M.N.H., 1969. "The uptake of *Trypanosoma cruzi* by *Rhodnius prolixus* and its later excretion". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* v. 63, p. 883-884.
- FITZGERALD R. "Phase-sensitive X-ray imaging". *Phys. Today*, 2000, 53(7): 23-26.
- GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P., FORSTER, H., *et al.*, 1984. "Feeding and molt inhibition by azadirachtins A, B and 7-acetylazadirachtin A in *Rhodnius prolixus* nymphs Z". *Naturforsch* 29, 1155–1158.
- GARCIA, E.S., RATCLIFFE, N. A., WHITTENET, M. M., *et al.*, 2007. "Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions". *J. Insect Physiol.* 23, 11–21.
- GLUSKER, J.P. LEWIS, M., ROSSI, M.; "Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists"; VCH: New York, 1994.
- GOMES, S. A. O., FEDER, D., GARCIA, E. S., *et al.*, "Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*". *Journal of Insect Physiology.* v. 49, p. 829-837. 2003
- GUIGAY, J. P., 1977. "Fourier transform analysis of Fresnel diffraction patterns and in-line holograms". *Optik*, 49(1):121–125.
- GUREYEV, T. E., 2003. "Composite techniques for phase retrieval in the Fresnel region", *Opt. Commun.* 220 (1-3), 49- 58.
- GUREYEV, T., E, POGANY A, PAGANIN, D., M., *et al.* "Linear algorithms for phase retrieval in the Fresnel region". *Opt. Commun.*, 2004a, 231(1-6): 53-70.
- GUREYEV, T., E., DAVIS, T. J., POGANY A., *et al.* "Optical phase retrieval by use of first Born-and Rytov-type approximations". *Appl. Opt.*, 2004b, 43(12): 2418-2430.

- GUREYEV, T. E., NESTERETS, Y. I., STEVENSON, A. W., *et al.*, 2008. "Some simple rules for contrast, signal-to-noise and resolution in in-line X-ray phase-contrast imaging", *Opt. Express* 16(5), 3223-41.
- HEETHOFF, M., NORTON, R. A., 2009. "New use for synchrotron X ray microtomography: three-dimensional biomechanical modeling of chelicerate mouthparts and calculation of theoretical bite forces". *Invertebr. Biol.* 128, 332–339.
- HENKE, B. L., GULLIKSON, E. M., DAVIS, J. C., 1993. "X ray interactions: photoabsorption, scattering, transmission and reflection at E=50 – 30000 eV, Z= 1 – 92". *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, 54, 181 – 342.
- HÖNNICKE, M. G., CUSATIS, C., RIGON, L., *et al.*, 2010. External and internal structure of weevils (Insecta: Coleoptera) investigated with phase-contrast X-ray imaging. *Nucl. Instrum. Meth. A* 620, 589–593.
- HÖRNSCHEMEYER, T., BEUTEL, R. G., PASOP, F., 2002. "Head structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) inferred from X-ray tomography". *J. Morph.* 252, 298–314.
- HÖRNSCHEMEYER, T., GOEBBELS, J., WEIDEMANN, G., *et al.*, 2006. "The head of *Ascioplagamimeta* (Coleoptera: Archostemata) and the phylogeny of Archostemata". *Eur. J. Entomol.* 103, 409–423.
- HOUNSFIELD G. "Computerized transversal axial scanning (tomography): Part I. description of system". *Brit. J. Radiol.*, 1973, 46: 1016-1022.
- INGAL, V. N., BELIAEVSKAYA, E. A., "X-ray plane-wave topography observation of the phase contrast from a non-crystalline object," *J. Phys. D: Appl. Phys.* 28, 2314–2317 (1995).
- JACKSON, J. D., 1999, *Classical Electrodynamics*. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons Inc.
- JAKUBEKA, J., GRANJA, C., DAMMER, J., *et al.*, 2007. "Phase contrast enhanced high resolution X-ray imaging and tomography of soft tissue". *Nucl. Instrum. Meth. A* 571, 69–72.

- JENSEN, T. H., BÖTTIGER A, BECH, M., *et al.*, 2011. "X-ray phase-contrast tomography of porcine fat and rind". *Meat Science* 88, 379–383
- KIM, B. H., KIM, H. K., LEE, S. J., 2011. "Experimental analysis of the blood-sucking mechanism of female mosquitoes". *J. Exp. Biol.* 214,1163–1169.
- KOTRE, C. J., BIRCH, I. P., 1999. "Phase contrast enhancement of x-ray mammography: a design study", *Phys. Med. Biol.* 44 2853–66.
- LANGER, M., CLOETENS P., GUIGAY, J.P., *et al.*, 2008, "Quantitative comparison of direct phase retrieval algorithms in in-line phase tomography" *Med. Phys.* 35 (10) 1877-1882.
- LEWIS, R. A., 2004. "Medical phase contrast x-ray imaging: current status and future prospects." *Phys. Med. Biol.* 49
- MARGARITONDO, G., 1995, "A Primer in Synchrotron Radiation: Everything You Wanted to Know About SEX (Synchrotron Emission of X-Rays) But Were Afraid to Ask", *Journal of Synchrotron Radiation*, v. 2, pp. 148-154.
- MAYA, J. D., CASSELS, B. K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P., *et al.*, 2007 "Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosomacruzi and their interaction with the mammalian host., *Comparative Biochemistry and Physiology. Molecular & Integrative Physiology Part A.* v. 146, p. 601-620.
- MAYO, S. C., MILLER, P. R., WILKINS, S. W., *et al.*, 2002. "Quantitative X-ray projection microscopy: phase-contrast and multi-spectral imaging", *J. Microsc.* 207 (2), 79-96 (2002).
- MELLO, C.B., NIGAM, Y., GARCIA, E. S., *et al.*, 1999. "Studies on a Haemolymph Lectin Isolated from *Rhodnius prolixus* and Its Interaction with Trypanosoma rangeli". *Experimental Parasitology.* v. 91, p. 289-296.
- MONTANARI, F., 2003. SYRMEP TOMO Project, tutorial.
- MOMOSE, A., 2005. "Recent advances in X-ray phase imaging", *Jpn. J. Appl. Phys.* 44, 6355–6367.
- NATIONAL INSTITUTE AND HEALTH, 2010. ImageJ, <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>.

- NUGENT, K. A., GUREYEV, T. E., COOKSON, D. F., *et al.*, 1996. "Quantitative phase imaging using hard X-rays", *Phys. Rev. Lett.* 77, 2961–2964.
- NUGENT, K. A., 2010. "Coherent methods in the X-ray sciences", *Adv. Phys.* 59, 1–99.
- OLIVEIRA, L.F., 2002, *Tomografia Computadorizada Tridimensional por Transmissão de Raios X na Análise e Caracterização de Objetos Volumétricos*. Tese de D.Sc., COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PAGANIN, D. M., MAYO, S. C., GUREYEV, T. E., *et al.*, 2002. "Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object". *J. Microsc.*, 206:33–40.
- POGANY, A., GAO, D., WILKINS, S.W., 1997. "Contrast and resolution in imaging with a microfocus X-ray source", *Rev. Sci. Instrum.*, 68(7):2774–82.
- POLACCI, M., BAKER, D.R., MANCINI, L., *et al.*, 2006, "Three-Dimensional Investigation of Volcanic Textures by X-Ray Microtomography and Implications for Conduit Processes", *Geophysical Research Letters*, v. 33, pp. L13312.
- PFEIFFER, F., WEITKAMP, T., BUNK, O., *et al.*, 2006. "Phase retrieval and differential phase-contrast imaging with low-brilliance X-ray sources," *Nat. Phys.* 2, 258–261.
- RAMÍRES-PÉREZ, J., 1969 *Estudio sobre la anatomía de Rhodnius prolixus*. *Rev. Venez Sanid. Assist Soc.* 34 11-98
- SNIGIREV, A., SNIGIREVA, I., KOHN, V., *et al.*, 1995. "On the possibilities of X-ray phase contrast microimaging by coherent high-energy synchrotron radiation" *Rev. Sci. Instrum.* 66, 5486–5492.
- SOCHA, J.J., WESTNEAT, M. W., HARRISON, J. F., *et al.*, 2007. "Real-time phase-contrast X-ray imaging: a new technique for the study of animal form and function". *BMC Biol.* 5, 6.
- TESEI, L., CASSELER, F., DREOSSI, D., *et al.*, 2005, "Contrast-Enhanced X-Ray Microtomography of the Bone Structure Adjacent to Oral Implants", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 548, pp. 257-263.

- TUOHIMAA, T., OTENDAL, M., HERTZ, H. M., 2007. "Phase-contrast X-ray imaging with a liquid-metal-jet-anode micro- focus source", *App. Phys. Lett.* 91, 074104.
- TZAPHLIDOU, M., SPELLER, R., ROYLE, G., *et al.*, 2005, "High Resolution Ca/P Maps of Bone Architecture in 3D Synchrotron Radiation Microtomographic Images", *Applied Radiation and Isotopes*, v. 62, pp. 569-575.
- WEIDE, D., BETZ, O., 2009. "Head morphology of selected Staphylinoida (Coleoptera: Staphyliniformia) with an evaluation of possible groundplan features in Staphylinidae". *J.Morphol.* 270,1503–1523.
- WEITKAMP, T., HAAS, D., WEGRZYNEK, D., *et al.*, 2011. "ANKAphase: software for single-distance phase retrieval from inline X-ray phase-contrast radiographs". *J. Synchrotron Rad.* 18, 617-629.
- WESTNEAT, M. W., SOCHA, J. J., LEE, W. K., 2008. "Advances in biological structure, function, and physiology using synchrotron X-ray imaging". *Annu. Rev. Physiol.* 70, 119–142.
- WILKINS S. W., GUREYEV T. E., GAO D., *et al.*, 1996 "Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays". *Nature* 384, 335–338.
- WU X.Z., LIU H., YAN A., 2005 "X-ray phase-attenuation duality and phase retrieval". *Optics letters*, 30(4): 379-381.
- WU X.Z., LIU H., YAN A., 2008 "Phase-contrast X-ray tomography: Contrast mechanism and roles of phase retrieval". *Eur. J.Radiol.*, 68(3): S8-S12.
- XIAO, T. Q., BERGAMASCHI, A., DREOSSI D, *et al.*, 2004 "Effect of spatial coherence on application of in-line phase contrast imaging to synchrotron radiation mammography". *Nucl. Instrum. Meth. A*, 548(1-2): 155-162.
- ZHANG, K., LI, D., ZHU, P., *et al.*, 2010. "3D visualization of the microstructure of *Quediabeesoni* Cameron using micro-CT". *Anal. Bioanal. Chem.* 397,2143–2148.
- KAK, A.C., SLANEY, M., 1987, *Principles of Computerized Tomographic Imaging*

ANEXO



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Applied Radiation and Isotopes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apradiso

Phase contrast X-ray synchrotron imaging for assessing external and internal morphology of *Rhodnius prolixus*

André P. de Almeida^{a,b,*}, José Soares^a, Anderson A.M. Meneses^{c,g}, Simone C. Cardoso^d, Delson Braz^b, Eloi S. Garcia^e, Marcelo S. Gonzalez^f, Patricia Azambuja^e, Regina C. Barroso^a

^a Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, Brazil

^b Nuclear Engineering Program, COPPE, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^c Radiological Sciences Laboratory, State University of Rio de Janeiro, Brazil

^d Physics Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratory of Biochemistry and Physiology of Insects, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Brazil

^f Department of General Biology, Federal University Fluminense, Brazil

^g Federal University of Western Pará, Brazil

ARTICLE INFO

Available online 25 November 2011

Keywords:

Synchrotron X-ray imaging
Phase contrast
Microtomography
Rhodnius prolixus
Chagas' disease

ABSTRACT

PhC-SR- μ CT is a nondestructive technique that allows the microanatomical investigations and 3D images reconstructions. This technique is performed in blood sucker, *Rhodnius prolixus*—one of the most important insect vectors of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease in Latin America—was able to provide excellent information about the microanatomy of the thorax and head allowing a new tool for further studies of development and physiology of triatomine by a non-invasive method of observation.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Conventional X-ray computed tomography (CT) is based on the difference in radiation absorption by different tissues. At the same time, a wide range of samples used in biology and medicine demonstrate very weak absorption contrast, nevertheless producing significant phase shifts in the X-ray beam. Enhanced contrast X-ray imaging can be achieved by exploiting the real part of the refraction index, which is responsible for the phase contrast. Imaging of soft tissue demands high sensitivity and contrast-enhancing techniques in order to facilitate reliably detection among the structures and patterns of small size and of similar element compositions (Jakubeka et al., 2007). The main requirement is a high quality source with high spatial coherence, which can be provided by microfocus X-ray tubes or by high brilliance and low emittance third generation synchrotron radiation sources. High coherency of the beam provided by third generation of the synchrotron radiation allows phase contrast imaging in the very simple experimental setup (Snigirev et al., 1995; Wilkins et al., 1996).

The development of synchrotron X-ray sources and phase contrast imaging techniques have resulted in major advances in both the microscopic imaging of preserved specimens and the

real time X-ray video of the internal processes of living organisms (Cloetens et al., 1996). Recently, a review on real time phase-contrast X-ray imaging was given by Socha et al. (2007) but even after Westneat et al. (2008) published an excellent review on synchrotron X-ray imaging and outlined the many uses for anatomical imaging of living organisms.

Application of X-ray microtomography (μ CT) on insects is quite recent (Hörnschemeyer et al., 2002, 2006; Beutel et al., 2008; Eberhard et al., 2010; Zhang et al., 2010) and its transposition to use phase contrast synchrotron X-ray microtomography (SR-PhC- μ CT) is even more recent (Betz et al., 2007; Jakubeka et al., 2007; Westneat et al., 2008; Heethoff and Norton, 2009; Weide and Betz, 2009; Hönnicke et al., 2010; Kim et al., 2011). A detailed knowledge of insect's anatomical structures is crucial for a better understanding of their function and evolution. Traditionally, in both morphology and anatomy, the internal structures of whole organisms or parts of them are accessed by dissecting or performing fixed tissues to histological serial sections. The main limitation of the two most frequently used techniques (stereomicroscope and SEM) is the fact that they allow only the acquisition of 2D images or of partial 3D data. Microtomographic scanning of specimens allows acquisition of real volumetric 3D data that can be then used for 3D rendering and virtual manipulation of the sample in dedicated software (Pouecha et al., 2010).

In this work we used SR-PhC- μ CT to study the microanatomy of *Rhodnius prolixus* which is one of the most important insect

* Corresponding author at: Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: apalmeid@gmail.com (A.P. de Almeida).

vectors of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease in Latin America (Garcia et al., 2007). Chagas' disease (Chagas, 1909, 1911), also called American trypanosomiasis, is a human tropical disease, which is endemic in large areas of South and Central America. Among the parasitic diseases, Chagas' disease is ranked as one of the most important in Latin America in terms of social and economic impact, affecting about 18 million people, with about 100 million people living in what are considered to be high risk zones, and approximately 300,000 new cases occurring every year with around 21,000 deaths annually (Schofield, 1994; Moncayo, 2003; WHO, 2002).

Although *R. prolixus* is one of the most well-know model in terms of both physiology and vector-parasite interactions studies, little is known about the structures of its internal organs and how some morphophysiological aspects of mainly the retrocerebral complex in different time of the life cycle are related to the development and reproduction of this insect vector. We investigate the potential and advantages of SR-PhC- μ CT with emphasis given to the 3D digital reconstruction of head and thorax structures in order to get preliminary information about density and plasticity of the neuroendocrine tissues, which is responsible for the development and reproduction of the insect.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae) were reared and maintained at 28 °C and between 60% and 70% relative humidity in a BOD incubator. Fifth-instar nymphs were fed on human blood using a membrane apparatus as previously described by Garcia et al. (1984). Three days after blood meal, insects were immobilized at 4 °C for 10 min and bounded on a polystyrene table with entomological pins and transversally cut at the junction between prothorax and mesothorax segments of body. The anterior fragments were fixed and maintained at room temperature in a solution containing 1% glutaraldehyde and 5% sucrose in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2 until using (not more than one month).

2.2. SYRMEP beamline

The experiments were carried out at the third generation synchrotron radiation source of the ELETTRA synchrotron radiation facility at the SYRMEP (SYnchrotron Radiation on MEDical Physics) beamline. The beamline provides a monochromatic laminar-section X-ray with a maximum area of about $160 \times 5 \text{ mm}^2$ at 20 keV, at a distance of about 23 m from the source. The system consists of a Si (111) crystal working at Bragg configuration. The useful energy range is 8–35 keV. The intrinsic energy resolution of the

monochromator is about 10^{-3} . Typical flux measured at the sample position at 17 keV is about $1.6 \times 10^8 \text{ photons/mm}^2 \text{ s}$ with a stored electron beam of 300 mA as ELETTRA operates at 2 GeV (Abrami et al., 2005). A custom-built ionization chamber is placed upstream to the sample to determine the exposure on the sample. A micrometric vertical and horizontal translation stage allows the positioning and the scanning of the sample with respect to the stationary beam and a rotational stage allows CT acquisition with a resolution of 0.001° .

The detector system is comprised of a 12/16-bit CCD camera, with 4008×2672 pixels², $4.5 \mu\text{m}$ pixel size CCD camera with a field of view of $18 \times 12 \text{ mm}^2$, coupled to an intensifier screen with no magnification (1:1). The CCD camera can move along the sample-detector axis, in order to set the desired sample-to-detector distance d . According to the choice of the sample-to-detector distance, one may distinguish between the absorption and phase sensitive regimes.

The detection system was positioned at 10 cm away from the sample position so that phase contrast technique could be performed. The tomographs were performed on a range from 0 to 180° , in steps of 0.2° , resulting in 900 projections. The 2D radiographies are normalized by using flat (images without the samples) and dark (background) images. This procedure allows one to take into account incident beam non-uniformities and to correct fixed noise due to the efficiency of the detector elements. Tomographic raw images were reconstructed using an imaging processing software (SYRMEP TOMO PROJECT) developed in the SYRMEP laboratory (Montanari, 2003) which uses Interactive Data Language (IDL). The reconstruction was performed using filtered back projection with Shepp Logan filter.

3. Results and discussions

μ CT can be used as a qualitative imaging technique which permits to section tissues in their natural state virtually, in any direction, with sub micrometer resolution and without time-consuming elaborate dissections (Betz et al., 2007). μ CT approach allows observing and rotating the virtual reconstruction of the specimen. It is then easy to orient it and to generate any interesting viewing angle in dedicated software (in the present case, ImageJ). The application of SR-PhC- μ CT to insect anatomy demonstrated the ability to visualize fine details of the head and thorax of *R. prolixus* showing a 3D model external view of representative morphological characteristics of the genus, as both the clypeus (ante- and postclypeus) a ventral part of the cranium (i.e. gula) extremely elongated (Fig. 1a) as well as the labium (i.e. proboscis) curved backwards in the resting position with its labella (Fig. 1b and c). The labrum is short and has two successive parts (Fig. 1a and b). The composed eyes are located

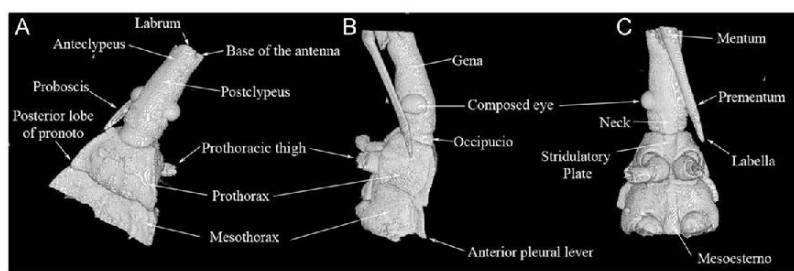


Fig. 1. Volume-rendered PhC- μ CT images showing external aspect of head and thorax of *R. prolixus*: dorsal (A), lateral (B) and ventral (C) views. Bar=1000 μm .

between gena and postgena just before the postclypeous (Fig. 1a and b) and long stridulatory plate and mesoexterno at ventral protorax and mesothorax were seen, respectively (Fig. 1c). Even the posterior lobe of pronoto and the anterior pleural lever (Fig. 1a and b) are easily distinguishable from the other parts of the insect cuticle (Fig. 1a and b).

μ CT images were well suited for anatomical analysis visualized by moving back and forth with the 2D image stacks or by cutting into the reconstructed 3D volume as can be seen in Fig. 2. Virtual sections show the bunch of stylets formed by lateral three-angled channels which are massive, except the circular hole which composes the body cavity and the longer maxillary food channel. Both the maxillae together form two lumens located just dorsal to the central and much smaller ventral salivary channel (Fig. 2a). Also, transverse virtual sections allow deep views of neuroendocrine system from both anteroposterior and posteroanterior sides, exhibiting the frontal structure of brain (with tritocerebrum, deutocerebrum and pars intercerebralis located in the median protocerebrum) and prothoracic ganglion with their associated innervations, respectively (Fig. 2b and c).

Modern techniques such as confocal microscopy, MRI, and tabletop X-ray μ CT provide effective non-invasive methods, but each of these tools has limitations including sample size constraints, resolution limits, and difficulty visualizing less dense tissue. Synchrotron X-ray phase-contrast imaging is ideal for visualizing well defined internal structures that have different mass densities (Socha et al., 2007). The contrast between the different internal tissues in SR-PhC- μ CT images was also sufficient to distinguish between cuticular structure and soft tissues such as muscle and nerve tissue. The observation of tiny details is easier and each part of the specimen is easily accessible and observable, which is particularly interesting for complex morphology specimens (Fig. 3). Moreover, both horizontal and sagittal (lateral) virtual sections permit excellent visualizations of the brain and associate glands (i.e. frontal and prothoracic ganglions,

corpus allatum and *corpora cardiaca*) as well as some nerves which emerge from the brain and prothorax muscles (Fig. 3a and b).

4. Conclusions

Imaging methods have played a major role as research tools in medicine and biology. Understanding the morphology of anatomical structures is a cornerstone of biomedical applications. For small animals, classical methods such as histology have provided a wealth of data, but such techniques can be problematic due to destruction of the samples mainly when the dissection has to be done with insect. More importantly, fixation and physical slicing can cause deformation of anatomy, a critical limitation when precise three-dimensional data are required.

The use of SR-PhC- μ CT has made possible access information on organs syntopy and structure of *R. prolixus* without invading or disrupting them, so supplying precise and conserved data concerning their function and development. This non-invasive, non-destructive technique provided a way to observe structures and organs preserving their original plasticity and development. To our experiments, after once cutting transversally *R. prolixus*, using glutaraldehyde as fixative to preserve both the structure and syntopy of the thorax and head, the structure and syntopy of the tissues analyzed resembles previous description with *R. prolixus* nymphs (Ramírez-Pérez, 1969; Wenk et al., 2010).

In this perspective, here we present the first results of the high-resolution non-invasive investigation of the external structure and anatomy of one of triatomine insect vectors of Chagas' disease agent. This technique opens a window of opportunity to study models of interaction using insect vectors and parasites species. Thus, phase contrast synchrotron X-ray microtomography proved to be a very suitable technique to overcome the problem of generating 3D dataset from 2D data, typical of microscopy-based techniques, which should help to answer important questions

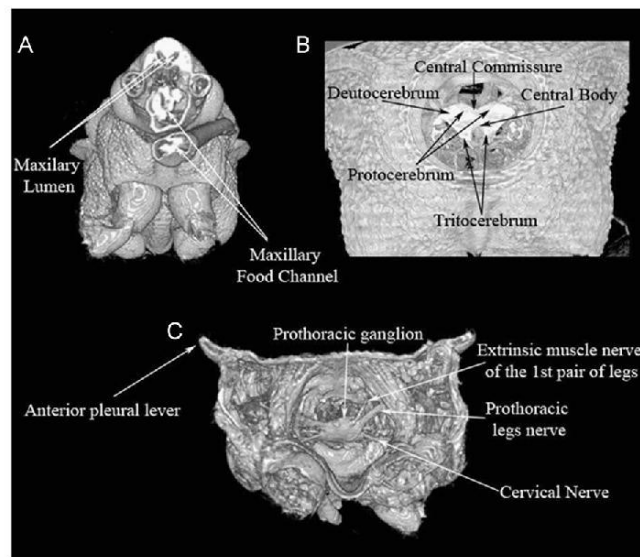


Fig. 2. 3D rendering of the head of *R. prolixus*: anteroposterior (A, B) and posteroanterior (C) views. Bar=500 μ m.

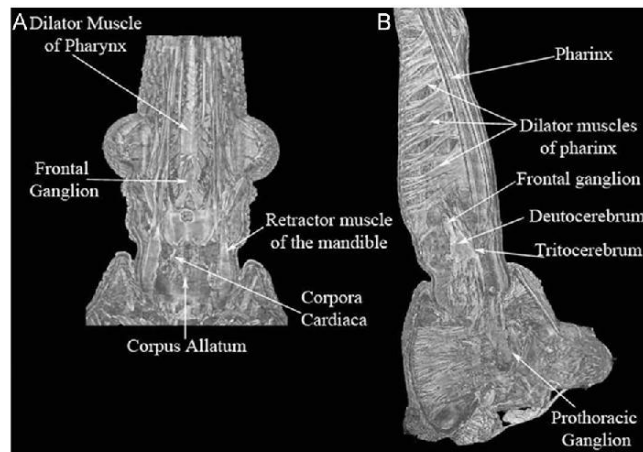


Fig. 3. Virtual sections through the head of *R. prolixus*: horizontal (A) and sagittal (B) sectional planes. Bar=500 μ m.

concerning anatomy, development, structure and plasticity of insect in general.

Acknowledgments

We warmly thank Giuliana Tromba and Nicola Sodini from the SYRMEP beamline for their invaluable help during the experiment. The authors thanks to the Brazilian agencies CNPq and FAPERJ for partial financial support. This work was partially done during a visit (R.C.B.) within the Associate Scheme of the *Abdus Salam* International Center for Theoretical Physics (ICTP).

References

- Abrami, A., Arfelli, F., Barroso, R.C., et al., 2005. Medical applications of synchrotron radiation at the SYRMEP beamline of ELETTRA. *Nucl. Instrum. Meth. A* 548, 221–227.
- Betz, O., Wegst, U., Weide, D., et al., 2007. Imaging applications of synchrotron X-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. I. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure. *J. Microsc.* 227, 51–71.
- Beutel, R.G., Ge, S., Ho, T., Hömschemeyer, T., 2008. On the head morphology of *Tetrapterus*, the phylogeny of Archostemata and the basal branching events in Coleoptera. *Cladistics* 24, 270–298.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen.n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218.
- Chagas, C., 1911. Nova entidade mórbida do homem; resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3, 219–275.
- Cloetens, P., Barrett, R., Baruchel, J., et al., 1996. Phase objects in synchrotron radiation hard x-ray imaging. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 29, 133–146.
- Eberhard, M.J.B., Lang, D., Metscher, B., et al., 2010. Structure and sensory physiology of the legs of mantophasmatodea and their role in vibrational communication. *Arthropod. Struct. Dev.* 39, 230–241.
- García, E.S., Azambuja, P., Forster, H., Rembold, H., 1984. Feeding and molt inhibition by azadirachtins A, B and 7-acetylazadirachtin A in *Rhodnius prolixus* nymphs. *Z. Naturforsch.* 29, 1155–1158.
- García, E.S., Ratcliffe, N.A., Whittener, M.M., et al., 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* 23, 11–21.
- Heethoff, M., Norton, R.A., 2009. New use for synchrotron X-ray microtomography: three-dimensional biomechanical modeling of chelicerate mouthparts and calculation of theoretical bite forces. *Invertebr. Biol.* 128, 332–339.
- Hönnicke, M.G., Cusatis, C., Rigon, L., et al., 2010. External and internal structure of weevils (Insecta: Coleoptera) investigated with phase-contrast X-ray imaging. *Nucl. Instrum. Meth. A* 620, 589–593.
- Hömschemeyer, T., Beutel, R.G., Pasop, F., 2002. Head structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) inferred from X-ray tomography. *J. Morph.* 252, 298–314.
- Hömschemeyer, T., Goebels, J., Weidemann, G., et al., 2006. The head of *Asciopaga mimeta* (Coleoptera: Archostemata) and the phylogeny of Archostemata. *Eur. J. Entomol.* 103, 409–423.
- Jakubek, J., Granja, C., Dammer, J., et al., 2007. Phase contrast enhanced high resolution X-ray imaging and tomography of soft tissue. *Nucl. Instrum. Meth. A* 571, 69–72.
- Kim, B.H., Kim, H.K., Lee, S.J., 2011. Experimental analysis of the blood-sucking mechanism of female mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 214, 1163–1169.
- Moncayo, A., 2003. Chagas' disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 577–591.
- Montanari, F., 2003. SYRMEP TOMO Project, tutorial.
- Pouchea, J., Mazin, J.-M., Tafforeau, P., 2010. High quality 3D imaging of vertebrate microremains using X-ray synchrotron phase contrast microtomography. *C. R. Palevol* 9, 389–395.
- Ramírez-Pérez, J., 1969. Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Venez. Sanid. Asist. Soc.* 34, 11–98.
- Schofield, C.J., 1994. Triatominae: Biology and Control. Eurocommunica Publications, West Sussex UK 76 pp.
- Snigirev, A., Snigireva, I., Kohn, V., et al., 1995. On the possibilities of X-ray phase contrast micro imaging by coherent high-energy synchrotron radiation. *Rev. Sci. Instr.* 66, 5486–5492.
- Socha, J.J., Westneat, M.W., Harrison, J.F., et al., 2007. Real-time phase-contrast x-ray imaging: a new technique for the study of animal form and function. *BMC Biol.* 5, 6.
- Weide, D., Betz, O., 2009. Head morphology of selected Staphylinidae (Coleoptera: Staphyliniformia) with an evaluation of possible groundplan features in Staphylinidae. *J. Morphol.* 270, 1503–1523.
- Wenk, P., Lucic, S., Betz, O., 2010. Functional anatomy of the hypopharynx and the salivary pump in the feeding apparatus of the assassin bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae, Heteroptera). *Zoomorphology* 129, 225–234.
- Westneat, M.W., Socha, J.J., Lee, W.-K., 2008. Advances in biological structure, function, and physiology using synchrotron X-ray imaging. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 119–142.
- World Health Organization, 2002. Control of Chagas Disease. Second Report of the WHO expert committee. World Health Organization, Geneva.
- Wilkins, S.W., Gureyev, T.E., Gao, D., et al., 1996. Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays. *Nature* 384, 335–338.
- Zhang, K., Li, D., Zhu, P., et al., 2010. 3D visualization of the microstructure of *Quedius beesoni* Cameron using micro-CT. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2143–2148.

Application of the SR-PhC- μ CT technique with phase retrieval for the characterization of internal and external structures of *Rhodnius prolixus*

This article has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text article.

2013 JINST 8 C07004

(<http://iopscience.iop.org/1748-0221/8/07/C07004>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 152.92.163.121

The article was downloaded on 16/09/2013 at 19:26

Please note that [terms and conditions apply](#).

7th MEDICAL APPLICATIONS OF SYNCHROTRON RADIATION WORKSHOP (MASR 2012)
SHANGHAI SYNCHROTRON RADIATION FACILITY (SSRF),
17–20 OCTOBER, 2012

Application of the SR-PhC- μ CT technique with phase retrieval for the characterization of internal and external structures of *Rhodnius prolixus*

A.P. Almeida,^{a,b,1} D. Braz,^a L.P. Nogueira,^b M.V. Colaço,^b J. Soares,^b S.C. Cardoso,^c
E.S. Garcia,^d P. Azambuja,^d M.S. Gonzalez,^e S. Mohammadi,^{f,g} G. Tromba^g and
R.C. Barroso^b

^aCOPPE/Federal University of Rio de Janeiro,
P.O. Box 68509, 21945-970, Rio de Janeiro, Brazil

^bMedical Physics Laboratory/Physics Institute/State University of Rio de Janeiro,
Rua São Francisco Xavier, 524 3007F, Rio de Janeiro, Brazil

^cPhysics Institute/Federal University of Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brazil

^dLaboratory of Biochemistry and Physiology of Insects/Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ,
Rio de Janeiro, Brazil

^eDepartment of General Biology/Federal University Fluminense,
24220-008, Niterói, Brazil

^fDepartment of Physics, University of Trieste,
Via A. Valerio 2, 34127, Trieste, Italy

^gElettra - Sincrotrone Trieste ScpA,
Strada Statale S.S. 14 km 163.5, 34012 Basovizza, Trieste, Italy

E-mail: apalmeid@gmail.com

¹Corresponding author.

ABSTRACT: The present work is the second one of a two- part publication on the use of Synchrotron Radiation Phase Contrast microtomography (SR-PhC- μ CT) for the study of *Rhodnius prolixus* morphology. In previous paper the visualization of various detailed features were highlighted thanks to the edge enhancement effects typical of the phase contrast technique, but the contrast between foreground and background remained poor. In this study the same data set have been re-visited with application of a single distance phase retrieval algorithm. The resulting slices showed very high quality images that enable a better visualization of important muscles and neurohemal organs of the central nervous system within the head of *Rhodnius prolixus*.

KEYWORDS: Image reconstruction in medical imaging; Computerized Tomography (CT) and Computed Radiography (CR); Medical-image reconstruction methods and algorithms, computer-aided so

2013 JINST 8 C07004

Contents

1	Introduction	1
2	Materials and methods	2
2.1	Sample preparation	2
2.2	Synchrotron radiation computed microtomography (SR- μ CT)	3
2.3	Phase retrieval treatment	3
3	Results and discussions	4
4	Conclusions	7

1 Introduction

Throughout the history of biology, advances in the visualization of biological structures and organic processes have transformed our understanding of anatomy, physiology, and evolution. Absorption was, for a long time, the only contrast mechanism that could be used for the imaging and reconstruction of 3D structures. Imaging of soft tissue demands high sensitivity and contrast-enhancing techniques in order to reliably detect and resolve structures and patterns of small size and of similar element composition. For these purposes, conventional X-ray computed tomography (CT) is limited by the low absorption contrast in soft tissue [1]. The advent of X-ray phase-contrast techniques [2, 3] in the mid-1990s greatly changed this because phase-contrast techniques are sensitive to the distortions in the transmitted X-ray wave front. As a result, even samples with low absorption differences can be clearly visualized, allowing the recent advances in X-ray imaging for small biological samples.

The reconstruction of phase contrast microtomography (PhC- μ CT) is related to the three-dimensional Laplacian of the refractive index distribution, which usually presents the typical edge enhancement features, and can be used for qualitative analysis [4]. However, a quantitative relationship between the phase shift induced by the sample and the contrast recorded at the imaging plane does exist. Such phase contrast radiographs can be used to pose an inverse problem to retrieve the phase shift induced by the sample. Moreover, phase retrieval of radiographs can be coupled to X-ray microtomography (μ CT) reconstruction algorithm. The phase shift induced by the sample is first retrieved for each projection angle image, and then fed into a CT reconstruction algorithm to yield a three-dimensional reconstruction of the refractive index which can be used for quantitative analysis. The two most commonly used single distance phase retrieval algorithms have been proposed by Paganin et al. [5] and Gureyev et al. [6].

Application of μ CT for the study of insects is quite recent [7–10] and its transposition to the Synchrotron Radiation phase contrast microtomography (SR-PhC- μ CT) is even more recent [11–14]. A detailed knowledge of insect’s anatomical structures is crucial for a better understanding of their function and evolution. We focused our attention on the internal structure of

the head of the blood-sucking hemipteran, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease, endemic in Central and South America. In hematophagous insects, feeding is a key process that triggers a series of physiological stimuli, which, in the case of *Rhodnius prolixus*, are closely related to the transmission of the Chagas disease. *Rhodnius prolixus*, ingests large blood meals and then undergoes a profound diuresis which is under neurohormonal control [15]. The parasite, *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, multiplies and differentiates in the intestinal tract of *R. prolixus*. *T. cruzi* often infects humans when it is passed out of the insect in the primary urine after the blood meal.

Feeding triggers a long-term neuroendocrine response, which results in growth, molting, and reproduction [16]. Mulye and Davey [17] observed that the feeding stimulus in *R. prolixus* is transmitted to the brain by a humoral factor, which possibly is released from the thoracic neurosecretory cells with axons in the abdominal nerves present in the fused thoraco-abdominal ganglionic mass. These hormones are present in neurohemal sites (as *corpora allata* and *corpora cardiaca*) and in the abdominal nerves and are released into the hemolymph after the start of feeding [18]. Thus, the neuroendocrine system has an important role in the development of the trypanosome in insects.

The anatomy of the nervous system of *Rhodnius prolixus* has been studied by means of dissections and histology [19–21]. Subsequently, authors combined this method with electron microscope techniques: scanning electron microscope (SEM) observations; SEM combined with X-ray microanalysis; and transmission electron microscope (TEM) investigations [22–25]. More recently, the application SR-PhC- μ CT [11] allows incomparable possibilities for the visualization of various detailed features that could be distinguished owing to the typical edge enhancement effects. This technique and especially the possibility of virtual dissection allows the relative locations of the morphological structures that are observable with a precision that is difficult to obtain for an actual dissection.

In this work, the 3D morphological structures of the head of *Rhodnius prolixus* were visualized using phase retrieval from in-line phase contrast radiographs. The 2D radiographic projection frames were processed with phase retrieval software (ImageJ plugin *ANKAphase*) [26] based on the single-distance phase-retrieval method developed by D. Paganin et al. [5].

2 Materials and methods

2.1 Sample preparation

Fifth instar nymphs of *R. prolixus* (n=5) were taken from colony in the Laboratory of Biochemistry and Physiology of Insects, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil, maintained at 28°C and between 60% and 70% relative humidity. The insects were fed on rabbit blood using a membrane apparatus previously described [27]. Three days after blood meal, insects were immobilized at 4°C for 10 min and bounded on a polystyrene table with entomological pins and transversally cut at the junction between prothorax and mesothorax segments of body. The anterior fragments were fixed and maintained at room temperature in a solution containing 1% glutaraldehyde and 5% sucrose in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2 until using (not more than one month).

For the X-ray microtomography (μ CT) investigation the head and prothorax were dried to avoid shrinking artifacts caused by water loss during the tomography procedure, which might affect fresh samples exposed to the dry atmosphere in the experimental hutch. All specimens were imaged.

2.2 Synchrotron radiation computed microtomography (SR- μ CT)

The experiments were carried out at the SYRMEP (Synchrotron Radiation on Medical Physics) beamline of the ELETTRA synchrotron radiation facility (Trieste, Italy). The beamline provides a monochromatic laminar-section X-ray with a maximum area of about $160 \times 5 \text{ mm}^2$ at 20 keV, at a distance of about 23 m from the source. The monochromator is based on a double Si(111) crystal system working at Bragg configuration. The useful energy range is 8–35 keV. The intrinsic energy resolution of the monochromator is about 10^{-3} [28]. A custom-built ionization chamber is placed upstream to the sample to determine the exposure at the sample position. High accuracy translation stages allow the positioning and the scanning of the sample with respect to the stationary beam and a rotational stage allows CT acquisition with a resolution of 0.001° .

The detector system is comprised of a 12/16-bit CCD camera, with 4008×2672 pixels², $4.5 \mu\text{m}$ pixel size with a field of view of $18 \times 12 \text{ mm}^2$, coupled to an intensifier screen with no magnification (1:1). The CCD camera can move along the sample-detector axis, in order to set the desired SDD. According to the choice of the SDD, one may distinguish between the absorption and the different phase sensitive regimes.

For this study the detector was positioned at 5 cm from the sample so that the phase contrast effects produced edge enhancement of the sample details without altering the sample morphology visualization. The projections were acquired over a total rotation of 180° , through steps of 0.2° , resulting in 900 projections. The projection radiographs were normalized by using flat and dark images. This procedure allows to take into account incident beam non-uniformities and to correct fixed noise due to the efficiency of the detector elements. Tomographic slices were reconstructed using the conventional filtered backprojection algorithm with Shepp Logan filter using the SYRMEP TOMO PROJECT (STP) software developed by the SYRMEP team [29] which uses Interactive Data Language (IDL). The reconstruction was performed using filtered back projection with Shepp Logan filter.

2.3 Phase retrieval treatment

ANKAphase software is written in Java [30]. It can be run as a plugin to the widely used scientific image processing program ImageJ [31] or as a stand-alone application. The graphical user interface is based on the Java packet Swing to ensure platform independence. All calculations are performed in double precision floating-point arithmetic (8 bytes per pixel). In this work, the output files contain single-precision float data.

A standard procedure for processing a set of projections with *ANKAphase* consists of entering the required paths as well as the experimental parameters and activating the flat-field and the phase-retrieval option. Among the experimental parameters to be specified by the user, the decrement of X-ray refractive index, δ , and the absorption coefficient, β , are often the most difficult to obtain because they require some knowledge, at least approximate, about the sample composition, and access to tabulated values. The tables containing the composition of these compounds can also be directly consulted on the World Wide Web [32]. For the phase reconstruction, water (H_2O) with a density of 1.0 gcm^{-3} was assumed to be the dominating material in order to determine δ and β .

Figure 1a and 1b show two phase-retrieved bidimensional images recorded at two different orientations of the specimen. In these images it can be seen the plastic used in to preserve the

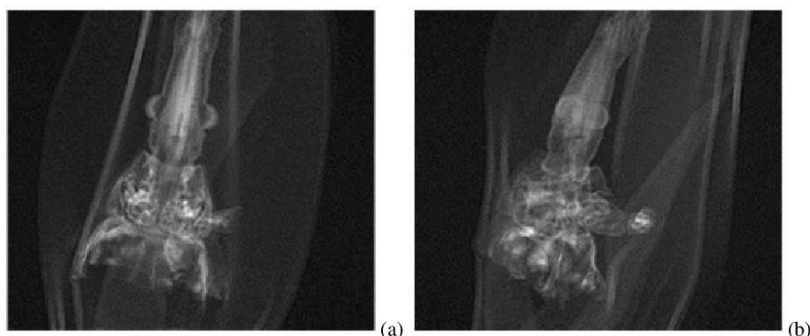


Figure 1. Phase-retrieved radiographs recorded in the tomography scan after flat-field normalization: (a) projection 1 (0°) and (b) projection 500 (100°).

sample during the experiment. The segmentation algorithm based on Energy Minimization via GraphCuts (EMvGC) with Artificial Neural Networks (EMANNs) was applied for correcting misclassifications due to intensity variation of phase contrast, which virtually extracts the information of interest. Further details about the algorithm can be found in [33].

3 Results and discussions

The SR-PhC- μ CT technique allows us to visualize the external morphology with accuracy similar to that obtained with a scanning electron microscope at low magnification but with the possibility of also observing the sample in any orientation. Furthermore, it is possible to visualize external details that are difficult to observe accurately with visible light microscopy. Figure 2 shows a virtual thin sections through the head of a selected sample which could be used both for the inspection of planar sections and for 3D reconstructions of the entire head. A typical volume rendering of a complete tomographic data set is shown in figure 3.

It can be noticed that head is strongly elongate, wedge-shaped, with maximum width at ocular region. The head capsule presents rugose cuticular features. Compound eyes are nearly round, protruding laterally in middle region of head. The same cuticular structure can be observed in prothorax. The antennae and legs of the insect were cut at their base, so that they fit into the field of view. Legs muscles, which are entirely enclosed within the cuticular leg capsule, can also be observed. These external features of *Rhodnius prolixus* match with published studies utilizing the resources of scanning electron microscopy [34]. Morphological evaluation has taxonomic importance, thereby contributing for differentiating between insect populations existing within the same areas, a fact that justifies this study.

The same data set previously taken [11] have been re-visited for phase reconstruction with *ANKAphase* in order to extract more anatomical details. The transmission radiographs have been pre-processed applying the phase-retrieval algorithm and then tomographic reconstruction is performed on the obtained phase projection maps using the conventional filtered backprojection al-

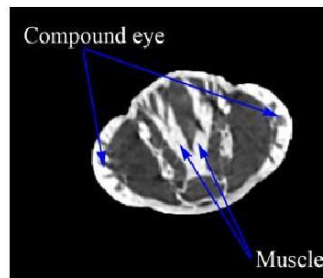


Figure 2. Virtual section through the head after processing with ANKAphase. Musculature and compound eyes are identified.

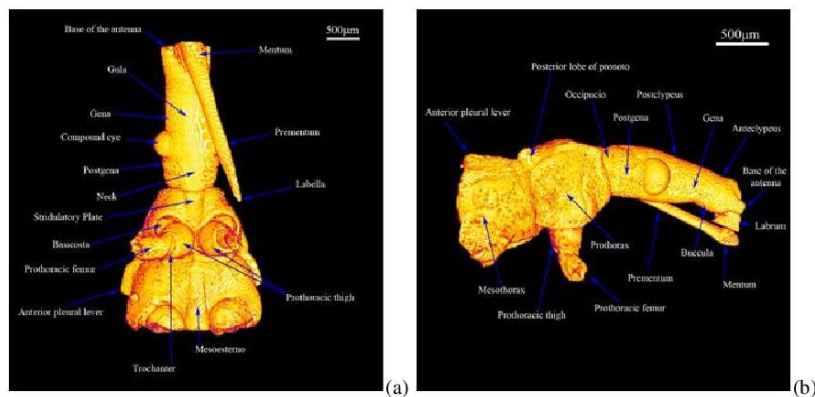


Figure 3. Volume rendering of a phase-retrieved tomographic data set showing the external details of head and prothorax of *Rhodnius prolixus*: (a) ventral and (b) lateral views.

gorithm. As expected [26], the resulting slices exhibit an “area contrast” rather than an “edge-enhancing contrast” than enables a better visualization of the different details and structures. The μ -CT images reconstructed with ANKAphase was very useful for the documentation of external features (figures 3a and 3b), but especially for internal structures including soft parts such as muscles and elements of the central nervous system (figure 4). Internal structures were identified comparing with anatomical studies on nervous system of *R. prolixus* conducted by [21] based on dissections.

Figure 4a shows the ventral view of the head with transparency, showing important internal structures: *protocerebrum*, *corpus allatum* and *corpora cardiaca*. The *protocerebrum* is the predominant part of brain. The form of the brain is determined by the tubular head and highly developed muscles of pharyngeal pump (figure 4a). It can be also noticed that brain is small in relation to head size connecting compound eyes.

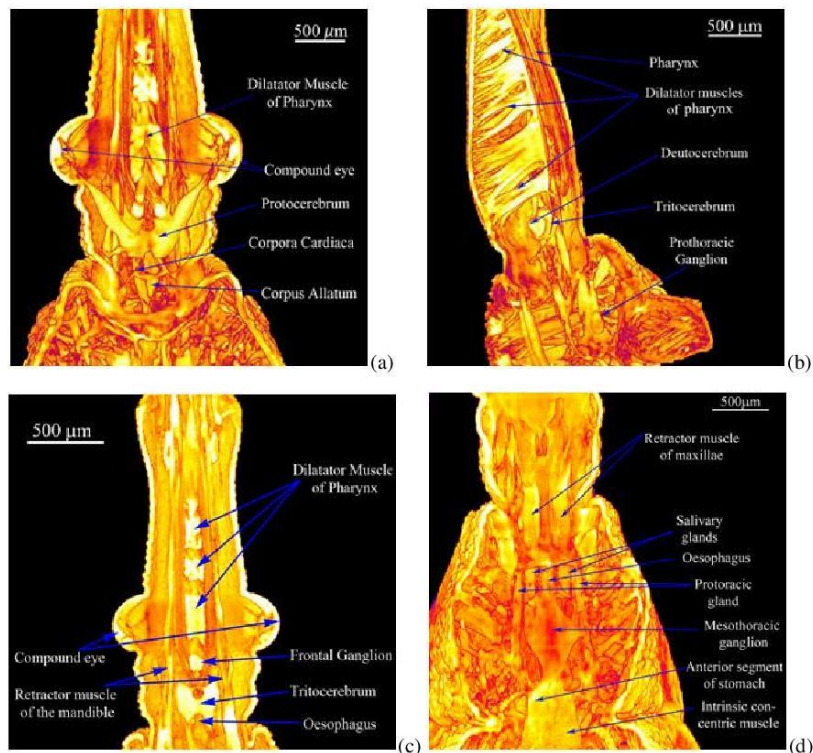


Figure 4. Virtual sections: (a) ventral, (b) sagittal, (c) dorsal planes through the head and (d) dorsal view through the prothorax.

The *deuto-* and *tritocerebrum* are covered dorsally by the large protocerebral lobes (figure 4b). The *deutocerebrum* is much smaller than *protocerebrum*. It lies laterally and ventrally to the brain, below the *protocerebrum*. The *tritocerebrum* is also very small. It lies medial to the *deutocerebrum*.

Dilator muscles of pharynx, retractor muscle of mandible, oesophagus can be identified in figure 4c. It can be noted that the frontal ganglion is connected to the tritocerebrum and lies anterior to the brain.

Figure 4d shows a dorsal view of the head and prothorax showing retractor muscle of maxillae, salivary glands, oesophagus, protoracic gland, mesothoracic ganglion, anterior segment of stomach and nerves which emerge from the brain and prothorax muscles.

4 Conclusions

Actually, the internal structure of the head of *Rhodnius prolixus* is well known from histological methods, but classical anatomical techniques are costly in terms of time and effort and usually involve the destruction of the specimen under study. The SR-PhC- μ CT technique enables an incomparable visualization of internal structures. In the investigated specimens, these observations were critical to give a relevant analysis of the complete structure and anatomy of *Rhodnius prolixus*, especially if a time-consuming sample preparation method can be avoided, i.e., without destroying of the samples mainly when the dissection has to be done.

The present contribution is the second one of a two- part publication on the application of SR-PhC- μ CT in *Rhodnius prolixus* morphology. The technique applied in this study is very useful for the documentation of external features (figure 3), but especially for internal structures including soft parts such as muscles and important elements of the central nervous system (figure 4). Its goal is to introduce phase-retrieval process to a broader community of functional morphologists to investigate the morphology and dynamics of the nervous system of *Rhodnius prolixus*

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) for financial support. This work was supported by ICTP-ELETTRA Users Programme. We acknowledge the SYRMEP group, particularly Nicola Sodini and Diego Dreossi for their help during images acquisition and reconstruction.

References

- [1] W.A. Kalender, *X-ray computed tomography*, *Phys. Med. Biol.* **51** (2006) R29.
- [2] R. Fitzgerald, *Phase-sensitive x-ray imaging*, *Phys. Today* **53** (2000) 23.
- [3] A.V. Bronnikov, *Theory of quantitative phase-contrast computed tomography*, *J. Opt. Soc. Am. A* **19** (2002) 473.
- [4] P. Cloetens R. Barrett, J. Baruchel, J.P. Guigay and M. Schlenker, *Phase objects in synchrotron radiation hard x-ray imaging*, *J. Phys. D* **29** (1996) 133.
- [5] D. Paganin, S.C. Mayo, T.E. Gureyev, P.R. Miller and S.W. Wilkins, *Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object*, *J. Microsc.* **206** (2002) 33.
- [6] T.E. Gureyev, T.J. Davis, A. Pogany, S.C. Mayo and S.W. Wilkins, *Optical phase retrieval by use of first Born-and Rytov-type approximations*, *Appl. Opt.* **43** (2004) 2418.
- [7] T. Hörnschemeyer, R.G. Beutel and F. Pasop, *Head structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) inferred from X-ray tomography*, *J. Morph.* **252** (2002) 298.
- [8] T. Hörnschemeyer, J. Goebbel, G. Weidemann, C. Faber and A. Haase, *The head morphology of *Ascioplaga mimeta* (Coleoptera: Archostemata) and the phylogeny of Archostemata*, *Eur. J. Entomol.* **103** (2006) 409.

- [9] R.G. Beutel, S. Ge and T. Hörschemeyer, *On the head morphology of Tetrapterus, the phylogeny of Archostemata and the basal branching events in Coleoptera*, *Cladistics* **24** (2008) 270.
- [10] K. Zhang et al., *3D visualization of the microstructure of Quedioides beesoni Cameron using micro-CT*, *Anal. Bioanal. Chem.* **397** (2010) 2143.
- [11] A.P. Almeida et al., *Phase contrast X-Ray synchrotron imaging for assessing external and internal morphology of Rhodnius prolixus*, *Appl. Rad. Isot.* **70** (2012) 1340.
- [12] G.D. Edgecombe et al., *A scolopocryptopid centipede (Chilopoda: Scolopendromorpha) from Mexican amber: synchrotron microtomography and phylogenetic placement using a combined morphological and molecular data set*, *Zool. J. Linnean Soc.* **166** (2012) 768.
- [13] B.H. Kim, E.S. Seo, J.H. Lim and S.J. Lee, *Synchrotron X-ray microscopic computed tomography of the pump system of a female mosquito*, *Microsc. Res. Tec.* **75** (2012) 1051.
- [14] M. Perreau and P. Tafforeau, *Virtual dissection using phase-contrast X-ray synchrotron microtomography: reducing the gap between fossils and extant species*, *Syst. Entomol.* **36** (2011) 573.
- [15] S.H.P. Maddrell, *Excretion in the blood-sucking bug, Rhodnius prolixus Stål. I. The control of diuresis*, *J. Exp. Biol.* **40** (1963) 247.
- [16] S. Ons, F. Richter, H. Urlaub and R.R. Pomar, *The neuro-peptidome of Rhodnius prolixus brain*, *Proteomics* **9** (2009) 788.
- [17] H. Mulye and K.G. Davey, *The feeding stimulus in Rhodnius prolixus is transmitted to the brain by humoral factor*, *J. Exp. Biol.* **198** (1995) 1087.
- [18] V.B. Wigglesworth, *The functions of the corpus allatum in Rhodnius prolixus (Hemiptera)*, *J. Exp. Biol.* **25** (1948) 1.
- [19] V.B. Wigglesworth, *The histology of the nervous system of an insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera) I: The peripheral nervous system*, *Quart. J. Micr. Sci.* **100** (1959) 285.
- [20] V.B. Wigglesworth, *The histology of the nervous system of an insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera) I: The central ganglia*, *Quart. J. Micr. Sci.* **100** (1959) 299.
- [21] J. Ramírez Pérez, *Estudio sobre la anatomía de Rhodnius prolixus*, *Rev. Venez. Sanid. Assist. Soc.* **34** (1969) 10.
- [22] M.S. Gonzalez et al., *Influence of Brain and Azadirachtin on Trypanosoma cruzi Development in the Vector, Rhodnius prolixus*, *Exp. Parasitol.* **92** (1999) 100.
- [23] C.G.H. Steel and C.P. Morris, *Evidence from X-ray microanalysis of sulphur-rich protein in insect neurosecretion: A new approach to the estimation of neurosecretory Activity*, *Gen. Comp. Endocrinol.* **26** (1975) 517.
- [24] J.A. da Rosa J.M.S. Barata, M. Cilense and F.M. Belda Neto, *Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of Triatoma circummaculata and Triatoma rubrovaria (Hemiptera, Reduviidae)*, *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **28** (1999) 363.
- [25] E.S. Garcia, N.A. Ratcliffe, M.M. Whitten, M.S. Gonzalez and P. Azambuja, *Exploring the role of insect host factors in the dynamics of Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus interactions*, *J. Insect Physiol.* **53** (2007) 11.
- [26] T. Weitkamp et al., *ANKAphase: software for single-distance phase retrieval from inline X-ray phase-contrast radiographs*, *J. Synchrotron Rad.* **18** (2011) 617.
- [27] E.S. Garcia, P. Azambuja, H. Forster and H. Rembold, *Feeding and molt inhibition by Azadirachtins A, B and 7-acetylazadirachtin A in Rhodnius prolixus nymphs*, *Z. Naturforsch* **29** (1984) 1155.

- [28] A. Abrami et al., *Medical applications of synchrotron radiation at the SYRMEP beamline of ELETTRA*, *Nucl. Instrum. Meth. A* **548** (2005) 221.
- [29] F. Montanari, SYRMEP Tomo Project tutorial (2003).
- [30] Java Consortium, The Java Web Site (2010), documentation available at <http://www.java.com/>.
- [31] National Institutes of Health (2010b). ImageJ, documentation available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- [32] National Institute of Standards & Technology. NIST Standard Reference Database 126 (2004), documentation available at <http://www.nist.gov/pml/data/xraycoef/>.
- [33] A.A.M. Meneses et al., *Automated segmentation of synchrotron radiation micro-computed tomography biomedical images using Graph Cuts and neural networks*, *Nucl. Instrum. Meth. A* **660** (2011) 121.
- [34] J.R. Santos-Mallet et al., *Morphological aspects of Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae from the Upper and Middle Negro River, amazon region of Brazil. I — Scanning electron microscopy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **100** (2005) 915.

2013 JINST 8 C07004



Contents lists available at ScienceDirect

Radiation Physics and Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/radphyschem

Phase contrast X-ray microtomography of the *Rhodnius prolixus* head: Comparison of direct reconstruction and phase retrieval approach



A.P. Almeida^{a,b,*}, D. Braz^a, L.P. Nogueira^b, M.V. Colaço^b, J. Soares^b, S.C. Cardoso^c, E.S. Garcia^d, P. Azambuja^d, M.S. Gonzalez^e, S. Mohammadi^{f,g}, G. Tromba^g, R.C. Barroso^b

^a COPPE/Federal University of Rio de Janeiro P.O. Box 68509, Rio de Janeiro 21945-970, Brazil

^b Physics Institute/State University of Rio de Janeiro, Brazil

^c Physics Institute/Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

^d Laboratory of Biochemistry and Physiology of Insects/Oswaldo Cruz Institute, Brazil

^e Department of General Biology/Federal University Fluminense, Brazil

^f Department of Physics, University of Trieste, Italy

^g Elettra-Sincrotrone Trieste ScpA, Italy

HIGHLIGHTS

- ▶ We used SR-PhC- μ CT.
- ▶ We compared slices of *R. prolixus*, with and without phase retrieval.
- ▶ The comparison suggests the complementary nature of the two approaches.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2012

Accepted 8 February 2013

Available online 16 February 2013

Keywords:

Phase retrieval

Phase contrast

Synchrotron radiation

Micro-computed tomography

Rhodnius prolixus

Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

We have used phase-contrast X-ray microtomography (PPC- μ CT) to study the head of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*, which is one of the most important insect vector of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease in Latin America. Images reconstructed from phase-retrieved projections processed by ANKA phase are compared to those obtained through direct tomographic reconstruction of the flat-field-corrected transmission radiographs. It should be noted that the relative locations of the important morphological internal structures are observable with a precision that is difficult to obtain without the phase retrieval approach.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Application of X-ray microtomography (μ CT) on insects is quite recent (Hörnschemeyer et al., 2002, 2006; Beutel et al., 2008; Eberhard et al., 2010; Zhang et al., 2010) and its transposition to use phase contrast synchrotron X-ray microtomography (SR-PPC- μ CT) is even more recent (Betz et al., 2007; Heethoff and Norton, 2009; Hönnicke et al., 2010; Kim et al., 2011; Almeida et al., 2012). A review on real time phase contrast X-ray imaging was given by Socha et al. (2007) but even after, Westneat et al. (2008) has published an excellent review on synchrotron X-ray imaging and outlined the many uses for anatomical imaging of living organisms.

The various methods of phase-contrast X-ray microtomography (PPC- μ CT) can be classified as either qualitative or quantitative. The former class, utilized by most practitioners of phase contrast imaging, is primarily interested in qualitative (e.g., morphological) characteristics of the phase-contrast image produced by a given sample in a given imaging system. The latter class of imaging, commonly termed phase retrieval or phase reconstruction, seeks to infer quantitative phase and amplitude information from a given set of phase contrast images. This information may subsequently be related to the quantitative structural properties of a sample with which the phase-retrieved wave field has interacted (Paganin et al., 2002).

In this work, the phase-amplitude retrieval approach from images obtained using PPC- μ CT was considered. The 2D radiographic projection frames were processed with ANKA phase software (Weitkamp et al., 2011) based on the single-distance phase-retrieval method developed by Paganin et al., 2002. ANKA phase

* Corresponding author at: COPPE/Federal University of Rio de Janeiro P.O. Box 68509, 21945-970, Brazil Tel.: +552194245276.

E-mail address: apalmeid@gmail.com (A.P. Almeida).

computer program is written in Java (Java Consortium, 2010) and can be run either as a stand-alone application or as a plugin to ImageJ (National Institutes of Health, 2010), a widely used scientific image-processing program. This is of particular interest for scientific fields where excellent volume renderings are required, for example in biology.

Our focus in this study is the hematophagous insect, *Rhodnius prolixus*, which can transmit Chagas disease after feeding on humans in Central and South America where the insects are endemic (Rabinovich and Himschoot, 1990). The parasite, *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, multiplies and differentiates in the intestinal tract of *R. prolixus*. *T. cruzi* often infects humans when it is passed out of the insect in the primary urine after the blood meal. In hematophagous insects, feeding triggers a long-term neuroendocrine response.

It is generally accepted that larvae of *Rhodnius prolixus* pass through a Head Critical Period (HCP) for ecdysis related to their feeding time (Wigglesworth, 1934). This period depends on a factor originating from the head, named prothoracicotropic hormone (PTTH)-ecdysone pathway, which interferes with *Trypanosoma cruzi* survival and development in its vectors (Fig. 1). Therefore, the neuroendocrine system has an important role in the transmission of the disease (Paluzzi et al., 2008). As a means to further understand the neuroendocrine system, preserved muscles and neurohemal sites within the head of *R. prolixus* were assessed by PPC- μ CT.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae) were reared and maintained at 28 °C and between 60% and 70% relative humidity. Fifth-instar nymphs were fed on rabbit blood using a membrane apparatus as previously described by Azambuja and Garcia (1997). Three days after blood meal, insects were immobilized at 4 °C for 10 min and bounded on a polystyrene table with entomological pins and transversally cut at the junction between prothorax and mesothorax segments of body. The anterior fragments were fixed and maintained at room temperature in a solution containing 1% glutaraldehyde and 5% sucrose in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 until using (not more than one month).

2.2. The SYRMEP beamline

The experiments were carried out at the third generation synchrotron radiation source of the ELETTRA synchrotron radiation facility at the SYRMEP (Synchrotron Radiation on Medical Physics) beamline. A complete description of the beamline can be found in Abrami et al. (2005). The detector system is comprised of

a 12/16-bit CCD camera (KODAK KAI-11000 CCD sensor), with 4008×2672 pixels², 4.5 mm pixel size CCD camera with a field of view of 18×12 mm², coupled to an intensifier screen with no magnification (1:1). The detection system was positioned at 10 cm away from the sample so that phase contrast technique could be performed. The projections were acquired on a range from 0 to 180°, in steps of 0.2°, resulting in 900 projections, with average acquisition time of 4 s per projection. The energy of the monochromatic beam was set to 12 keV.

The 2D radiographies are normalized by using flat and dark images in order to take into account incident beam non-uniformities and different efficiency of the detector elements, as well as to correct for fixed pattern noise. Tomographic raw images were reconstructed using an imaging processing software (SYRMEP_Tomo_Project) developed in the SYRMEP laboratory (Montanari, 2003) which uses Interactive Data Language (IDL). The reconstruction was performed using filtered back projection with Shepp Logan filter.

A standard procedure for processing a set of projections with ANKPhase requires, as user input, only the image file paths, the parameters of the experimental set-up (energy, distance, pixel size) and the estimated X-ray optical properties of the sample, δ (decrement of X-ray refractive index) and β (the absorption coefficient). Once the parameters are set, the full set of projection images can be processed.

3. Results and discussion

Until now, the internal structure of the head of *Rhodnius prolixus* is well known from histological methods. Previously, we studied the microanatomy of *Rhodnius prolixus* using SR-PPC- μ CT (Almeida et al., 2012). Here, reconstructed tomographic slices in the ventral (Fig. 2) and sagittal (Fig. 3) planes are shown using phase retrieval approach.

In Fig. 2b, not only is the *protocerebrum* clearly visible, but also important neurohemal sites: the *corpora cardiaca* and the *corpus allatum* (Wigglesworth, 1948). In both Fig. 3a and b, muscles of pharynx are also visible. Details of the striation in the muscle, which depend on their orientation relative to the virtual cutting plane, can be observed more clearly in Fig. 3a. It is expected because of the resulting slices with phase retrieval approach exhibit an “area contrast” rather than an “edge-enhancing contrast” than enables a better visualization of the different details and structures (Weitkamp et al., 2011).

In Fig. 3b it can be seen other structures such as the *deutocerebrum*, the *tritocerebrum* and the prothoracic ganglion, unattainable with previously used technique. Further, in Fig. 3b, it is possible to access information on organs syntopy, such as the *deutocerebrum* lies laterally and ventrally to the brain, bellow the *protocerebrum* and the *tritocerebrum* lies medial to the *deutocerebrum*.

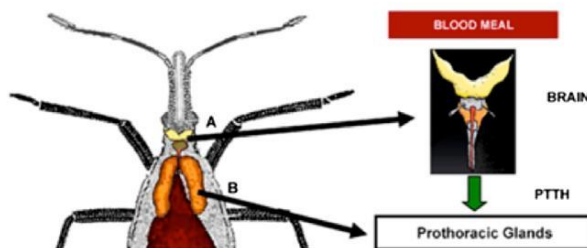


Fig. 1. A comprehensive scheme showing brain (protocerebrum) and the prothoracic glands of *Rhodnius prolixus*. Adapted from Garcia et al. (2007).

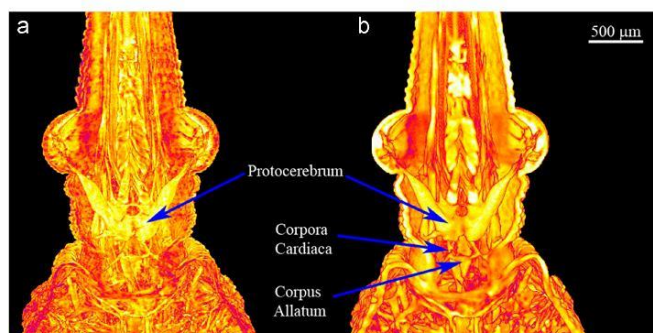


Fig. 2. Head of *Rhodnius prolixus* (ventral view). Images reconstructed from PPC- μ CT data obtained: (a) through direct tomographic reconstruction (i.e. without phase retrieval) and (b) from the retrieved phase maps.

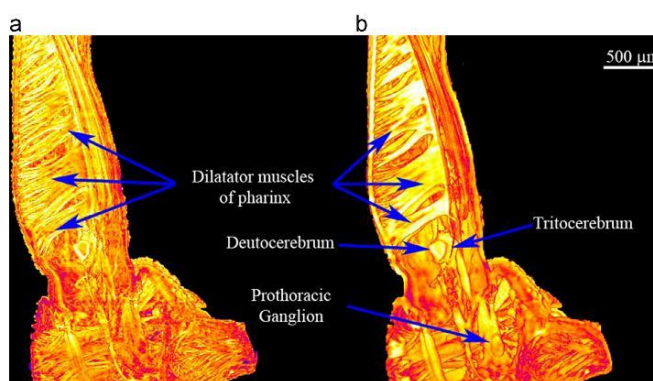


Fig. 3. Head of *Rhodnius prolixus* (sagittal view). Images reconstructed from PPC- μ CT data obtained: (a) through direct tomographic reconstruction (i.e. without phase retrieval) and (b) from the retrieved phase maps.

4. Conclusions

Imaging methods have played a major role as research tools in medicine and biology. Understanding the morphology of anatomical structures is a cornerstone of biomedical applications. For small animals, classical methods such as histology have provided a wealth of data, but such techniques can be problematic due to destruction of the samples mainly when the dissection has to be done with insect. More importantly, fixation and physical slicing can cause deformation of anatomy, a critical limitation when precise three-dimensional data are required.

The use of non-invasive techniques to study the physiology of vectors of important endemic diseases is a so innovative approach, which now allows us to perform new strategies to the understanding of shape and function in a living animal during real time observation without dissections and other stress conditions. Moreover, this approach permits to avoid artefacts induced for the most part of microscopic techniques normally used in biological studies. In the case of *Rhodnius prolixus*, the phase contrast micro-computed tomography can be specially used to identified physiological aspects of

neuroendocrine, digestive and reproductive systems which would be key factors to control and reduce both reproduction and population of the insects and also its susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease.

This comparison allows an expansion of the applications of non-invasive techniques of external structures and anatomy of one of triatomine insect vectors of Chagas disease agent. The comparison of images suggests the complementary nature of the two approaches, which emphasize details (without phase retrieval) or the overall structure (with phase retrieval) of the sample.

Acknowledgments

We warmly thank Nicola Sodini and Diego Dreossi from the SYRMEP beamline for their valuable help during the experiment. The authors also thank to the Brazilian agencies CNPq and FAPERJ for partial financial support. This work was partially done during a visit (R.C.B.) within the Associate Scheme of the Abdus Salam International Center for Theoretical Physics (ICTP).

References

- Abrami, A., et al., 2005. Medical applications of synchrotron radiation at the SYRMEP beamline of ELETTRA. *Nucl. Instrum. Meth. A* 548, 221–227.
- Almeida, A.P., et al., 2012. Phase contrast X-ray synchrotron imaging for assessing external and internal morphology of *Rhodnius prolixus*. *Appl. Radiat. Isot.* 70, 1340–1343.
- Azambuja, P., Garcia, E.S., 1997. Care and maintenance of triatomine colonies. In: Crampton, J.M., Beard, C.B., Louis, C. (Eds.), *Molecular Biology of Insect Disease Vectors*. Chapman & Hall, London, pp. 56–64.
- Betz, O., et al., 2007. Imaging applications of synchrotron X-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. I. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure. *J. Microsc.* 227, 51–71.
- Beutel, R.G., et al., 2008. On the head morphology of *Tetraphalerus*, the phylogeny of Archostemata and the basal branching events in Coleoptera. *Cladistics* 24, 270–298.
- Eberhard, M.J.B., et al., 2010. Structure and sensory physiology of the legs colopodial organs in Mantophasmatodea and their role in vibrational communication. *Arthropod. Struct. Dev.* 39, 230–241.
- Garcia, E.S., et al., 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* 23, 11–21.
- Heethoff, M., Norton, R.A., 2009. New use for synchrotron X-ray microtomography: three-dimensional biomechanical modeling of chelicerate mouthparts and calculation of theoretical bite forces. *Invertebr. Biol.* 128, 332–339.
- Hönnicke, M.G., et al., 2010. External and internal structure of weevils (Insecta: Coleoptera) investigated with phase-contrast X-ray imaging. *Nucl. Instrum. Meth. A* 620, 589–593.
- Hörschemeyer, T., et al., 2002. Head structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) inferred from X-ray tomography. *J. Morph.* 252, 298–314.
- Hörschemeyer, T., et al., 2006. The head of *Ascioplaga mimeta* (Coleoptera: Archostemata) and the phylogeny of Archostemata. *Eur. J. Entomol.* 103, 409–423.
- Java Consortium, 2010. The Java Web Site, <<http://www.java.com/>>.
- Kim, B.H., et al., 2011. Experimental analysis of the blood-sucking mechanism of female mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 214, 1163–1169.
- Montanari, F., 2003. SYRMEP TOMO Project, tutorial. National Institutes of Health, 2010. ImageJ, <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>.
- Paganin, D., et al., 2002. Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *J. Microsc.* 206, 33–40.
- Paluzzi, J.P., et al., 2008. Isolation, Cloning, and Expression Mapping of a Gene Encoding an Antidiuretic Hormone and Other CAPA-Related Peptides in the Disease Vector, *Rhodnius prolixus*. *Endocrinology* 149, 4638–4646.
- Rabinovich, J.E., Himschoot, P., 1990. A population-dynamics simulation-model of the main vectors of Chagas-disease transmission, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Ecol. Model.* 52, 249–266.
- Socha, J.J., et al., 2007. Real-time phase-contrast X-ray imaging: a new technique for the study of animal form and function. *BMC Biol.* 5, 6.
- Weitkamp, T., et al., 2011. ANKAphase: software for single-distance phase retrieval from inline X-ray phase-contrast radiographs. *J. Synchrotron. Rad.* 18, 617–629.
- Westneat, M.W., et al., 2008. Advances in biological structure, function, and physiology using synchrotron X-ray imaging. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 119–142.
- Wigglesworth, V.B., 1934. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Quart. J. Micr. Sci.* 77, 191–222.
- Wigglesworth, V.B., 1948. The functions of the corpus allatum in *Quedius beesoni* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 25, 1–15.
- Zhang, K., et al., 2010. 3D visualization of the microstructure of *Quedius beesoni* Cameron using micro-CT. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2143–2148.