



MICROTOMOGRAFIA USANDO RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR-MICROCT)
COMO TÉCNICA NÃO INVASIVA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS
EXTERNAS E INTERNAS DO *RHODNIUS PROLIXUS*

Gabriela Sena Souza

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Engenharia Nuclear.

Orientador(es): Delson Braz

Liebert Parreiras Nogueira

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2015

MICROTOMOGRAFIA USANDO RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR-MICROCT)
COMO TÉCNICA NÃO INVASIVA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS
EXTERNAS E INTERNAS DO *RHODNIUS PROLIXUS*

Gabriela Sena Souza

DISSERTAÇÃO 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 MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc.

Prof. Liebert Parreiras Nogueira, D.Sc.

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc.

Prof. Marcelo Gonzalez Salabert, D.Sc.

Prof. André Pereira de Almeida, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

FEVEREIRO DE 2015

Souza, Gabriela Sena

Microtomografia usando radiação síncrotron (SR-MICROCT) como técnica não invasiva para identificação de estruturas externas e internas do *Rhodnius prolixus*/ Gabriela Sena Souza. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XIII, 66 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Delson Braz

Liebert Parreiras Nogueira

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 53-58.

1. Tomografia computadorizada. 2. Contraste 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 pais, pelo carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a professora Regina Cély, por ter me recebido no laboratório de braços abertos e sempre incentivar o meu trabalho, me ensinando o gosto pela pesquisa.

Ao professor Delson pela orientação e pelas risadas nos momentos de muito estresse.

Ao professor Liebert, pela orientação, pela dedicação e por toda a ajuda nas dúvidas sobre tomografia.

Ao professor André, que me ensinou a reconstruir as tomografias.

Ao professor Marcelo e a professora Patricia, que me receberam muito bem na FIOCRUZ, ensinando biologia para uma física com muita paciência.

Aos meus pais, que me incentivaram e acreditaram em mim, sempre com carinho e atenção. Pela paciência nos momentos de estresse e por demonstrar tanto orgulho por todas as conquistas. Tudo isso não seria possível sem vocês.

Ao meu amorzinho, Eduardo, por todo apoio e carinho durante esse tempo. Por ser o melhor companheiro, amigo e namorado do mundo. <3

À minha família, vó Vitu, vó Néria, tia Rosi, tia Nerinha e Lulu, que sempre torceram por mim.

Aos meus amigos de laboratório: Arissa, Carla, Andrea, Isadora, Letícia, Rita, Camila, Fanny e Marcos, por toda ajuda, conversas e risadas que tornaram o trabalho muito mais divertido.

Aos meus amigos antigos da UERJ, Tol, Julia, Renata, Tumati, William e Codorna, que me fazem rir sempre e mesmo que estejam longe, tem um lugar guardado no meu coração.

Às minhas amigas, Taysa, Marcella e Roberta, que sempre estão do meu lado e que tornaram a graduação na UERJ inesquecível.

Aos amigos, Paula, Paula, Fernando, Gustavão, Thiago, Osama, Haimon, Dani, Glauca, Analu, Tchu, Gabi Gabi, Dina, Tiago, pelos passeios e "gordices" de sempre.

Às agências brasileiras, CNPQ, CAPES, FAPERJ pelo auxílio financeiro.

À FIOCRUZ e ao ELETTRA pelas amostras e medidas fornecidas para este trabalho.

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

MICROTOMOGRÁFIA USANDO RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR-MICROCT)
COMO TÉCNICA NÃO INVASIVA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS
EXTERNAS E INTERNAS DO *RHODNIUS PROLIXUS*

Gabriela Sena Souza

Fevereiro/2015

Orientadores: Delson Braz

Liebert Parreiras Nogueira

Programa: Engenharia Nuclear

Nos últimos anos os avanços na técnica de microtomografia evoluíram e possibilitaram uma melhora na resolução e no contraste desta técnica, contribuindo principalmente para o estudo de amostras biológicas e insetos. A microtomografia por contraste de fase e radiação síncrotron é uma técnica não destrutiva que possibilita um estudo avançado da sintopia dos insetos, como o *Rhodnius prolixus*, um dos mais importantes vetores do *Tripanossoma cruzi*, o agente etiológico da Doença de Chagas. Na América Latina, o controle do inseto vetor é o melhor método para prevenir essa doença, e um estudo detalhado do interior e exterior das estruturas do *Rhodnius prolixus*, pode ser essencial para entender sua evolução. Tradicionalmente, em biologia, as estruturas internas dos insetos são estudadas através da dissecação, e um estudo dessas estruturas utilizando microtomografia por contraste de fase e radiação síncrotron pode ser muito útil no estudo do controle da Doença de Chagas. Neste trabalho foi mostrada a capacidade da técnica de microtomografia por contraste de fase usando luz síncrotron para o estudo de estruturas internas do *Rhodnius prolixus*. Todas as imagens foram obtidas no novo setup da linha SYRMEP do ELETTRA (Trieste, Itália). As imagens foram obtidas com uma resolução de 2 μm e feixe policromático, e mostraram detalhes na estrutura e órgãos deste inseto nunca visualizados com microtomografia. Neste trabalho, mais uma vez a microtomografia se mostrou uma excelente ferramenta para o estudo do interior do *Rhodnius prolixus* e para a identificação de diferentes estruturas que até então só haviam sido obtidas com microscopia eletrônica através da dissecação.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

MICROTOMOGRAPHY USING SYNCHROTRON RADIATION, A NON-
INVASIVE TECHNIQUE FOR THE IDENTIFICATION OF INTERNAL AND
EXTERNAL STRUCTURES OF *RHODNIUS PROLIXUS*

Gabriela Sena Souza

February/2015

Advisors: Delson Braz

Liebert Parreiras Nogueira

Department: Nuclear Engineering

In the last years the advances in the microtomography technique evolved and allowed an improvement in the resolution and contrast, mainly in the study of insects and biological samples. The microtomography using phase contrast and synchrotron radiation is a non destructive technique that allowed a study of the sintopy of insects, such as *Rhodnius prolixus*, the most important insect vector of *Tripanossoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease. In Latin America, the control of the insect vector is the best method for the prevention of this disease, and a study of the interior and exterior structures of *Rhodnius prolixus* could be essential for understanding its evolution. In biology, the internal structures of the insects are studied using dissection techniques, and a detailed study using microtomography with phase contrast and synchrotron radiation could be helpful in the study of Chagas' disease. In this work it was shown the capability of phase contrast microtomography technique using synchrotron radiation for the study of internal and external structures of *Rhodnius prolixus*. All images were obtained in the new setup of SYRMEP beamline at ELETTRA (Trieste, Italy). The images were obtained with 2 μm resolution and a polychromatic beam, and showed details in the structure of this insects never seen before with microtomography. Microtomography proved to be an excellent tool for the study of the interior of *Rhodnius prolixus* and for the identification of different structures.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
I.1 OBJETIVO.....	2
I.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
I.2 JUSTIFICATIVA.....	3
CAPÍTULO II.....	4
II FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
II.1 RAIOS-X.....	4
II.1.1 RAIOS-X MONOCROMÁTICOS.....	4
II.1.2 RAIOS X POLICROMÁTICOS.....	6
II.1.3 BEAM HARDENING	6
II.2 RADIAÇÃO SÍNCROTRON.....	8
II.2.1 PRINCÍPIOS FÍSICOS DA LUZ SÍNCROTRON	9
II.3 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E MICROTOMOGRAFIA.....	10
II.3.1 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA RECONSTRUÇÃO	12
II.3.1.1 TEOREMA DA FATIA DE FOURIER	15
II.3.1.2 ALGORITMO DE RETROPROJEÇÃO FILTRADA	16
II.4 CONTRASTE DE FASE.....	18
II.4.1 PRINCÍPIOS FÍSICOS DO CONTRASTE DE FASE POR PROPAGAÇÃO	19
II.4.2 COERÊNCIA ESPACIAL E TEMPORAL.....	22
II.4.2.1 COERÊNCIA TEMPORAL.....	22
II.4.2.2 COERÊNCIA ESPACIAL	23
II.5 RESOLUÇÃO.....	23
II.5.1 RESAMPLING.....	24
II.6 RHODNIUS PROLIXUS	25

<i>II.6.1 QUITINA NO RHODNIUS PROLIXUS</i>	27
<i>CAPÍTULO III</i>	29
<i>III MATERIAIS E MÉTODOS</i>	29
<i>III.1 MICROTOMOGRAFIAS</i>	29
<i>III.1.1 SYRMEP</i>	29
<i>III.1.2 SELEÇÃO DOS PARÂMETROS DA LINHA DE LUZ</i>	31
<i>III.1.3 AQUISIÇÃO DAS TOMOGRAFIAS</i>	32
<i>III.1.4 RECONSTRUÇÃO DAS IMAGENS</i>	36
<i>III.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS</i>	39
<i>CAPÍTULO IV</i>	41
<i>IV RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	41
<i>IV.1 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS SLICES</i>	42
<i>IV.2 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS IMAGENS 3D</i>	44
<i>CAPÍTULO V</i>	51
<i>V CONCLUSÃO</i>	51
<i>REFERÊNCIAS</i>	53
<i>ANEXO A</i>	59

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 2-1: Feixe de raio-X se propagando através de um corte transversal do corpo humano (TANG et al, 2011)</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2-2: Espectros de energia do início, meio e fim quando raios-X atravessam uma amostra, exemplificando os efeitos do beam hardening. (RUSS, 2011)</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2-3: Elétron viajando numa direção v, interceptando um campo magnético H e consequentemente sofrendo uma força F (INGOLD, 2000).</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2-4: Anel principal do síncrotron, LINAC e síncrotron booster (INGOLD, 2000)</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2-5: A figura mostra um conjunto de projeções através de um objeto com um ângulo de observação ϕ formando a função P. (HERMAN, 1980).....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2-6: Objeto sendo representado por uma função bidimensional $f(x, y)$ e cada integral de linha pelos parâmetros (θ, t) (HERMAN, G. T., 1980).....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 2-7: Teorema da fatia de Fourier (HERMAN, 1980).....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2-8: Exemplo do funcionamento do contraste de fase por propagação (MAYO,2012).....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2-9: Partes real e imaginária, delta e beta, do índice de refração complexo da água. (ALMEIDA, 2013)</i>	<i>22</i>
<i>Figura 2-10: Representação de um pixel (RUSS J., 2011)</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2-11: Ampliação de uma imagem (RUSS, 2011).....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2-12: Exemplos de resampling (RUSS, 2011).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2-13: Rhodnius prolixus (GONZALEZ, 2013).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2-14: 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 epimastigotas e alguns spheromastigotes no estômago (A). No intestino, epimastigotas multiplicadas (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).</i>	<i>26</i>
<i>Figura 3-1: ELETTRA, Trieste, Itália</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3-2: Setup mostrando a câmara CCD, o porta-amostras e os filtros.</i>	<i>30</i>

<i>Figura 3-3: Porta-amostras e Rhodnius prolixus.</i>	31
<i>Figura 3-4: Interface do programa Newport para o alinhamento do centro da amostra e do detector</i>	32
<i>Figura 3-5: 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.</i>	33
<i>Figura 3-6: (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas. (b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.....</i>	34
<i>Figura 3-7: Imagem da amostra.</i>	35
<i>Figura 3-8: Imagem flat.</i>	35
<i>Figura 3-9: Imagem dark</i>	36
<i>Figura 3-10: Imagem normalizada.</i>	36
<i>Figura 3-11: Janela do programa de reconstrução mostrando um exemplo de projeção e a escolha da slice da imagem.</i>	38
<i>Figura 3-12: Sinograma da fatia escolhida definindo os limites esquerdo e direito.....</i>	38
<i>Figura 3-13: Os seis diferentes estádios do Rhodnius prolixus, com destaque para o quinto que é o utilizado neste trabalho.</i>	39
<i>Figura 3-14: Quinta ninfa de Rhodnius prolixus mostrando a região de corte entre o prototórax e mesotórax.....</i>	40
<i>Figura 4-1: Na figura foi possível identificar estruturas, como a onmatidia, os dutos da mandíbula, a faringe, o filamento axial e também o olho composto.....</i>	42
<i>Figura 4-2: (a)Inseto sacrificado 4 dias após a alimentação com a faringe muito pouco dilatada, (b)inseto sacrificado 10 dias após a alimentação com a faringe mais dilatada que o inseto de 4 dias e (c)inseto em jejum com a faringe muito mais dilatada que nas outras duas situações.....</i>	43
<i>Figura 4-3: Corte sagital da cabeça do Rhodnius prolixus onde são identificados o esôfago, a faringe, o duto salivar e os músculos.....</i>	45
<i>Figura 4-4: Corte sagital da cabeça do Rhodnius prolixus onde são identificados o esôfago, a faringe e os músculos.....</i>	46
<i>Figura 4-5: Corte transversal da cabeça do Rhodnius prolixus, onde podem ser identificados o olho composto e a traqueia.....</i>	47
<i>Figura 4-6: Corte longitudinal da cabeça do Rhodnius prolixus mostrando as calosidades, a faringe, a traqueia e o esôfago.</i>	48

Figura 4-7: Imagem tridimensional da cabeça do Rhodnius prolixus..... 49

Figura 4-8: Corte transversal da cabeça do Rhodnius prolixus mostrando a traqueia e o músculo retrator da mandibular. 50

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO

A microtomografia é uma técnica não invasiva que permite a visualização tridimensional de estruturas internas e externas de diferentes tipos de materiais. Esta técnica, a partir de diferentes densidades, permite que se obtenha uma imagem tridimensional de um determinado material que está sendo estudado. Ela se baseia no fato de que a intensidade do feixe decresce com a distância quando ele atravessa um material.

Tradicionalmente, a visualização das estruturas internas e externas de insetos é feita através da dissecação e do uso de um microscópio óptico e a microtomografia surgiu como uma ferramenta não invasiva para visualizar o interior dessas estruturas de uma forma tridimensional, possibilitando um estudo fisiológico de vários tipos de insetos (STEVENSON, 2003).

Na microtomografia, materiais com densidades muito parecidas, como tecidos biológicos e insetos, não são facilmente visualizados em função de serem igualmente absorvedores dos raios-X (EBERHARD, 2010). O uso do contraste de fase surgiu para diminuir este problema e diferenciar materiais com densidades muito próximas. Para que o contraste de fase seja realizado é essencial o uso da radiação síncrotron, já que ela fornece um feixe muito intenso, colimado e com alto grau de coerência espacial, o que não pode ser obtido com tubos de raios-X convencionais (GUREYEV et al, 2001).

O uso do contraste de fase e radiação síncrotron na microtomografia tem se mostrado uma ótima combinação para o estudo de materiais biológicos e insetos (BETZ et al., 2007; SOCHA et al, 2007; LAK, 2008; BEUTEL, 2008; ZHANG, 2010). Um estudo detalhado das estruturas internas e externas dos insetos permite que se entenda melhor o funcionamento dos seus sistemas e da sua sintopia (LANDIS E. N et al., 2010; MIZUTANI, 2012).

Um dos insetos que tem sido muito estudado através da microtomografia é o *Rhodnius prolixus* (ALMEIDA, A. P et al., 2012, 2014), que é um dos principais insetos vetores do *Tripanossoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas.

A Doença de Chagas é encontrada principalmente na América Latina e é transmitida pelas fezes dos seus insetos vetores. Aproximadamente de sete a oito milhões de pessoas no mundo estão infectadas por essa doença (WHO, 2013).

Não existe nenhuma vacina para prevenir a Doença de Chagas, portanto o controle do inseto vetor é o melhor método para preveni-la. Um estudo detalhado do interior e exterior do *Rhodnius prolixus* pode ser muito útil para se entender melhor sua evolução e conseqüentemente ajudar nas pesquisas que existem para combater essa doença.

Os primeiros trabalhos que realizaram microtomografia com contraste de fase e radiação síncrotron neste inseto (ALMEIDA, 2012, 2014), mostraram detalhes e órgãos importantes no estudo da sua evolução. Este trabalho é uma continuação dos primeiros que foram realizados com *Rhodnius prolixus* usando microtomografia. Nos primeiros trabalhos foi utilizada microtomografia com radiação síncrotron e contraste de fase com uma resolução de 4.5 μ m e com o uso de um feixe monocromático. Neste trabalho as medidas foram feitas com uma resolução de 2 μ m e utilizando um feixe policromático.

I.1 OBJETIVO

A aplicação da microtomografia por contraste de fase utilizando radiação síncrotron em amostras com densidades muito baixas é uma técnica muito recente e abre possibilidades para o estudo de modelos de interação utilizando insetos vetores e parasitas. O objetivo deste trabalho é comparar as imagens microtomográficas geradas com diferentes resoluções e com diferentes tipos de feixe, obtidas neste trabalho e nos trabalhos anteriores (ALMEIDA, 2012, 2013, 2014), de modo a avaliar o efeito dessas mudanças na identificação de estruturas externas e internas do *Rhodnius prolixus*.

I.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as estruturas internas e externas do *Rhodnius prolixus* usando microtomografia por contraste de fase usando radiação síncrotron, feixe policromático e uma resolução de 2 μ m.
- Identificar possíveis novas estruturas no *Rhodnius prolixus* através da técnica.

- Comparar as técnicas de microtomografia utilizadas neste trabalho com as técnicas de microtomografia utilizadas em trabalhos anteriores com o *Rhodnius prolixus*.

I.2 JUSTIFICATIVA

A microtomografia utilizando radiação síncrotron e contraste de fase vem se mostrando uma excelente técnica para identificação de estruturas internas e externas de insetos, incluindo o *Rhodnius prolixus*.

Os primeiros trabalhos envolvendo microtomografia com *Rhodnius prolixus* obtiveram ótimos resultados (ALMEIDA, 2012, 2013, 2014) e a partir destes resultados surgiu o interesse de testar esta técnica com este inseto em diferentes resoluções, com a intenção de chegar a resultados ainda melhores. Uma mudança na resolução e no tipo de feixe pode influenciar nos resultados finais das imagens de microtomografia, e diferentes testes podem ajudar a determinar que tipo de técnica pode ser usada para cada situação específica, já que cada estrutura pode ser melhor visualizada a partir da aplicação de diferentes técnicas. O uso do feixe policromático normalmente gera artefatos indesejáveis nas imagens, no entanto, em determinadas situações o uso deste tipo de feixe pode ser muito útil, e isso será mostrado através deste trabalho. Uma melhora na técnica de visualização do *Rhodnius prolixus*, permite que o estudo do interior deste inseto seja cada vez mais detalhado, possibilitando uma melhor compreensão do funcionamento das suas estruturas e auxiliando nos estudos para controle da Doença de Chagas.

CAPÍTULO II

II FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II.1 RAIOS-X

Quando elétrons de alta energia colidem com um eletrodo de metal (normalmente de tungstênio) dois tipos de interação ocorrem: os raios-X característicos e a radiação de freamento (Bremsstrahlung). Os raios-X característicos ocorrem quando elétrons com energia suficiente colidem com elétrons de camadas mais internas dos átomos do alvo, ejetando-os, e elétrons de níveis mais altos preenchem as vacâncias deixadas pelos elétrons ejetados. Esse tipo de raios-X são como uma assinatura de cada material e possuem um espectro de energia discreto. Bremsstrahlung é o tipo de interação produzida pela desaceleração de elétrons, quando estes são defletidos pelo campo eletromagnético dos átomos do material alvo, sendo a energia "perdida" pelo elétron em movimento convertida em raios-X Bremsstrahlung ou de freamento. Esses raios-X gerados através da radiação de freamento podem ter qualquer energia, até a energia máxima do elétron colidindo, dependendo da profundidade de interação do elétron em movimento e de sua energia cinética, logo seu espectro de energia é contínuo.

Desde que Röntgen descobriu os raios-X em 1895 até a chegada dos síncrotrons, os tubos de raios-X eram a forma mais comum de se obtê-los. Em termo da energia dos fótons, os raios-X podem ser classificados em policromáticos e monocromáticos (HOHEISEL et al., 2006).

II.1.1 RAIOS-X MONOCROMÁTICOS

Os raios-X monocromáticos são aqueles em que os fótons de raios-X emitidos possuem o mesmo comprimento de onda e a mesma energia. Quando um raio-X monocromático passa através de um objeto, existe uma relação entre o número de fótons colidindo na superfície do objeto e a distância a que os fótons vão penetrar no objeto. O número de fótons como função da posição dentro do objeto, $N(x)$, é apresentado na Equação 1.

$$N(x) = N_0 e^{-\mu x} \quad 1$$

onde N_0 representa o número de fótons que entram no objeto, e x é a distância entre a entrada e a região de medida de N (BRUNKE, 2008). A constante μ é conhecida como o coeficiente de atenuação linear, e este depende da composição do material, da sua densidade e da energia do raio-X. Quando os objetos não são homogêneos o μ pode ser considerado uma função espacial das coordenadas (x,y) . Então a Equação 1 fica da seguinte forma:

$$N_d = N_{in} e^{-\int \mu(x,y) ds} \quad 2$$

Onde N_{in} e N_d são o número total de fótons entrando e saindo do objeto, respectivamente, e ds é o elemento de comprimento onde é feita a integração ao longo do raio AB, que pode ser identificado na Figura 2-1.

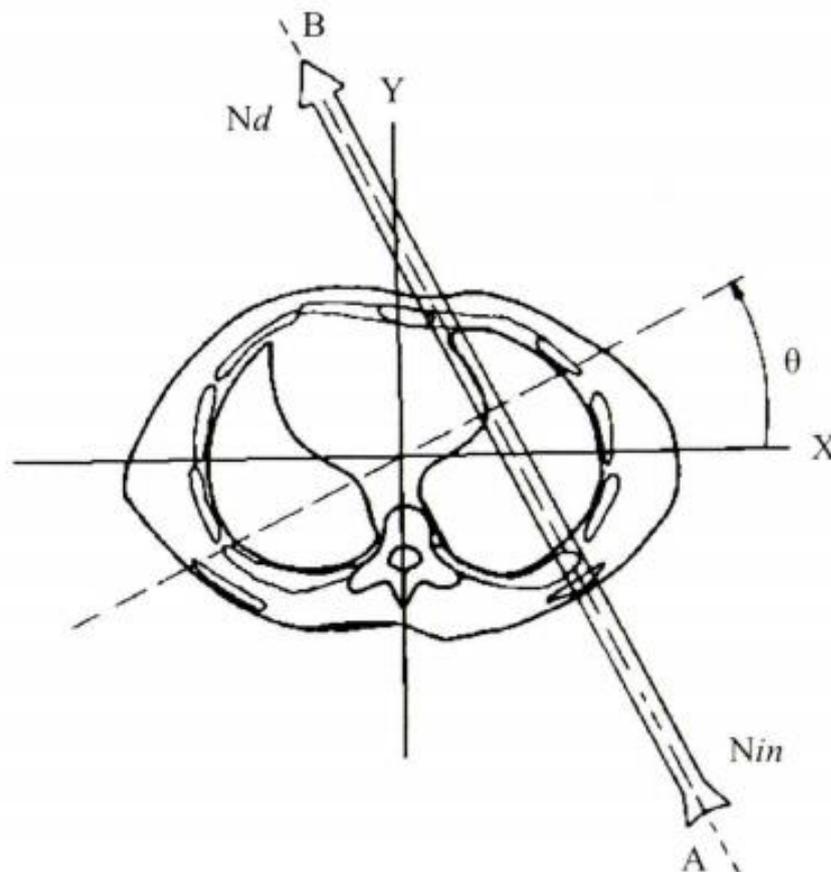


Figura 2-1: Feixe de raio-X se propagando através de um corte transversal do corpo humano (TANG et al, 2011)

II.1.2 RAIOS X POLICROMÁTICOS

Quando a energia de um feixe de raios-X não é monoenergética, a Equação 2 passa a ser representada por

$$S_{exit}(E) = \int S_{in}(E) \exp[-\int \mu(x, y, E) dS] dE \quad 1$$

onde $S_{in}(E)$ e $S_{exit}(E)$ representam a densidade do número fótons incidentes e que estão saindo, respectivamente. $S_{in}(E)dE$ representa o número total de fótons incidentes na faixa de energia de E até $E+dE$. Essa equação incorpora o fato de que o coeficiente de atenuação linear μ é também função da energia do fóton, e isso ocorre porque o feixe é policromático (WILKINS, 1996).

A intensidade de um feixe policromático antes (I_0) e depois (I) de atravessar uma amostra pode ser descrito pela seguinte equação

$$I = \int I_0(E) [\sum_i e^{-\mu_i(E)x_i}] dE \quad 2$$

O coeficiente de atenuação linear pode ser aproximado através da seguinte equação:

$$\mu(E) = \alpha_f(E)f_f + \alpha_c(E)f_c \quad 3$$

Onde $\alpha_f(E)$ e $\alpha_c(E)$ são constantes características do material e f_f e f_c são as energias que dependem do efeito fotoelétrico e do efeito Compton respectivamente.

Para um feixe policromático, o espectro de emissão é contínuo em energia, com energia máxima fixada pela diferença de potencial aplicada entre os eletrodos do tubo (GUREYEV et al, 2001).

A geração de imagens com uso de raios-X policromáticos é caracterizada pelo surgimento de artefatos nas imagens, causados pelo fenômeno conhecido como beam hardening que será explicado no próximo item.

II.1.3 BEAM HARDENING

Beam hardening ou endurecimento de feixe é o nome usado para descrever os efeitos que as baixas energias de um feixe policromático podem gerar numa imagem. O beam hardening não é um problema tão grande quando estão sendo geradas imagens

médicas e biológicas, já que a variação da composição e densidade deste tipo de amostra é muito baixa. Grande parte das estruturas é composta na maioria das vezes de água e carbono, com exceção dos ossos que possuem muito cálcio.

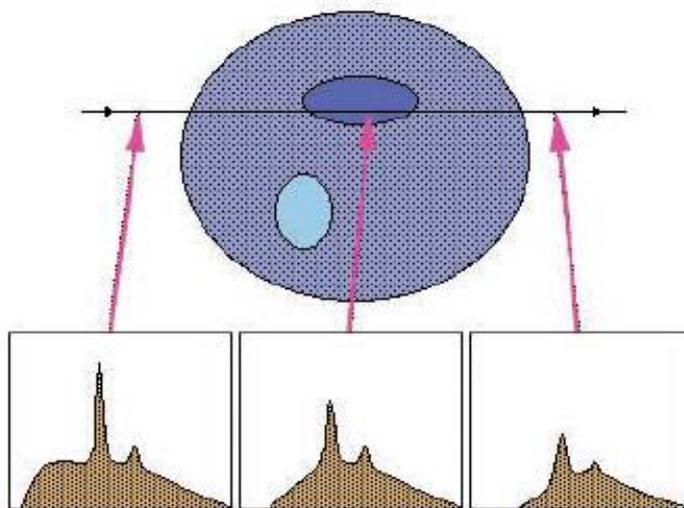


Figura 2-2: Espectros de energia do início, meio e fim quando raios-X atravessam uma amostra, exemplificando os efeitos do beam hardening. (RUSS, 2011)

A Figura 2-2 mostra um diagrama para exemplificar os efeitos do beam hardening. Nela, podem-se observar os espectros de energia do início, meio e fim, quando os raios-X atravessam a amostra. À medida que os raios-X de baixa energia são absorvidos, o coeficiente de atenuação da amostra varia (PAIVA, 2008).

Os efeitos do beam hardening podem prejudicar muito os resultados obtidos através de uma tomografia computadorizada.

O grande problema do efeito do beam hardening é que os algoritmos de reconstrução consideram que cada material no volume possui um único coeficiente de atenuação, independentemente da profundidade de interação, o que na prática não ocorre, já que a energia varia conforme a profundidade de interação. O que ocorre é uma distribuição de energia ao longo do caminho de interação do feixe, resultando em diversos coeficientes de atenuação ao longo deste caminho (RUSS, 2011).

Quando um feixe policromático passa através de um material, as energias mais baixas são absorvidas ou espalhadas, elevando a energia média dos raios-X. Como

consequência disso, as regiões do interior do material são atravessadas com raios-X de muito mais alta energia que as regiões das bordas, fazendo com que as bordas fiquem mais claras e o centro fique mais escuro.

Alguns softwares de reconstrução permitem que os efeitos do beam hardening sejam minimizados durante a reconstrução, diminuindo os efeitos na visualização das imagens em 3D (KETCHAM, 2014).

II.2 RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Quando elétrons (ou qualquer partícula carregada) são acelerados a uma velocidade próxima a velocidade da luz e são forçados a mudar sua direção através de um campo magnético, ocorre a emissão de radiação eletromagnética, na direção em que esses elétrons estão originalmente viajando. Essa radiação é chamada de radiação síncrotron ou luz síncrotron. Síncrotron é o nome dado a todo acelerador circular que usa campos elétricos para aceleração e ímãs de orientação.

A radiação síncrotron expande a uma ampla faixa que vai do infravermelho aos raios-X de alta energia. Ela é caracterizada por ter um alto brilho – muitas ordens de magnitude mais brilhante que fontes convencionais – e possui uma luz altamente polarizada e colimada (RACK, 2011).

Quando os síncrotrons surgiram, eles foram utilizados para estudar o núcleo das partículas, e não para gerar luz. Contudo, hoje em dia, enquanto alguns ainda usam síncrotron para experimentos de alta energia, como no grande colisor de hádrons (LHC), existem mais de 50 fontes de luz síncrotron no mundo dedicadas para gerar luz síncrotron e explorar suas qualidades. Essas máquinas atendem uma grande área de aplicações, desde matéria condensada até o estudo de estruturas biológicas (WESTNEAT, 2008).

A teoria clássica do eletromagnetismo de Maxwell (primeiramente documentada em 1873) explica que partículas carregadas movendo através de um campo magnético geram radiação eletromagnética. A teoria de Einstein da relatividade especial explica as características completas da luz síncrotron gerada por elétrons viajando num caminho circular com velocidades relativísticas.

A luz síncrotron é a melhor fonte artificial de raios-X, permitindo um estudo detalhado de estruturas moleculares e estruturas biológicas.

II.2.1 PRINCÍPIOS FÍSICOS DA LUZ SÍNCROTRON

Primeiramente, para entender o funcionamento da luz síncrotron, é necessário compreender os *building blocks* dos síncrotrons, que são os dipolos magnéticos que produzem um campo magnético vertical, \mathbf{H} , no vão entre os polos, como mostra a Figura 2-3.

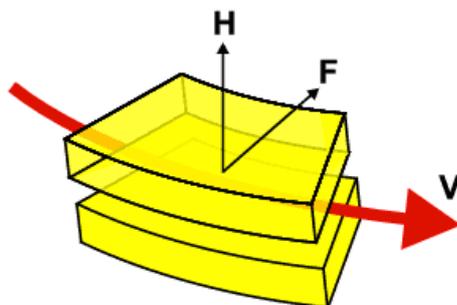


Figura 2-3: Elétron viajando numa direção \mathbf{v} , interceptando um campo magnético \mathbf{H} e conseqüentemente sofrendo uma força \mathbf{F} (INGOLD, 2000).

Os dipolos magnéticos possuem duas características importantes no funcionamento dos síncrotrons. Primeiro, se um elétron viajando numa direção \mathbf{v} (horizontal como pode ser visto na Figura 2-3), intercepta um campo magnético \mathbf{H} em uma direção perpendicular a \mathbf{v} , este elétron vai sofrer uma força \mathbf{F} (conhecida como força de *Lorentz*) que vai numa direção perpendicular aos dois, \mathbf{v} e \mathbf{H} . Então, se o elétron está se movendo com a velocidade \mathbf{v} , \mathbf{F} vai produzir uma aceleração centrípeta fazendo com que o elétron se mova numa órbita circular (WILLMOTT, 2011). A segunda característica importante, é que se o elétron está sendo acelerado dentro do dipolo magnético, ele vai emitir radiação eletromagnética.

Devido a essas características, colocando uma série de dipolos magnéticos em torno de um círculo com um determinado raio, é possível fazer um elétron se mover em torno desse círculo.

Para que o síncrotron funcione, é necessário uma fonte de elétrons energéticos para “alimentar” o anel, e isso pode ser feito usando um acelerador linear (LINAC) que vai produzir elétrons com energias que vão da faixa de MeV (10^6 eV) até GeV (10^9 eV). Em alguns síncrotrons, existe um pequeno *booster* síncrotron situado entre o LINAC e o síncrotron maior, e ele é usado para complementar o *gap* de energia entre a saída em MeV do LINAC e a entrada em GeV no síncrotron principal.

Na Figura 2-4 é possível identificar o anel principal do síncrotron, o LINAC e o síncrotron booster.

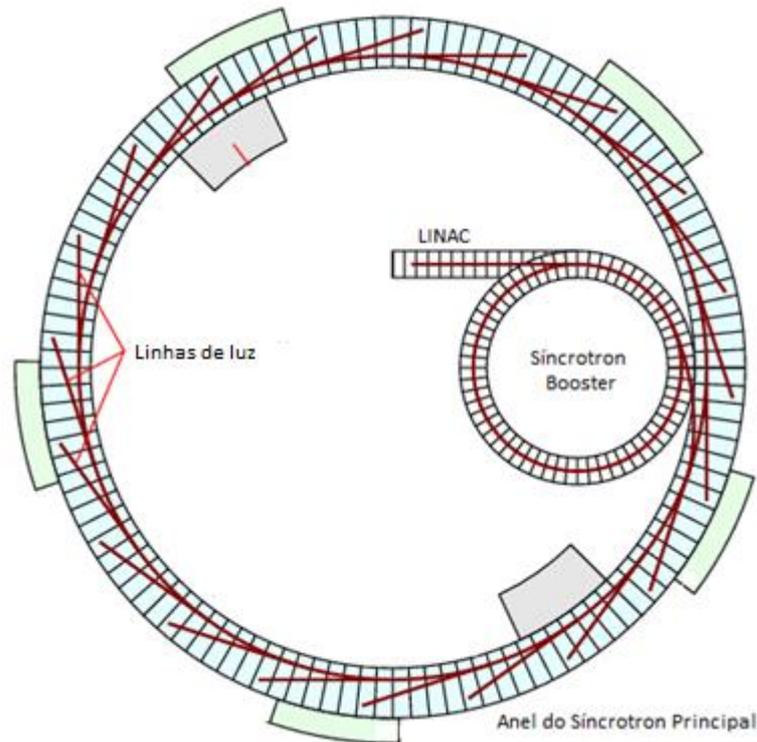


Figura 2-4: Anel principal do síncrotron, LINAC e síncrotron booster (INGOLD, 2000)

As fontes de luz síncrotron possuem aplicações em diversas áreas e uma delas é a microtomografia, que tem sido muito utilizada no estudo de amostras biológicas.

II.3 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E MICROTOMOGRAFIA

A tomografia é uma técnica não destrutiva que utiliza várias radiografias individuais de um determinado objeto para obter imagens tridimensionais dele. Seu nome tem origem do grego: "tomo" - parte e "graphein" - escrever. A tomografia é uma técnica muito utilizada em radiologia médica, oceanografia, astrofísica e muitas outras áreas. Durante a tomografia, o objeto fica parado enquanto a fonte e os detectores giram 360° em torno deste obtendo radiografias, para que depois a imagem tridimensional seja gerada a partir da reconstrução.

As primeiras aplicações de tomografia computadorizada começaram em 1970 e eram usadas basicamente para imagens médicas, mas os benefícios desta técnica fizeram com que ela se adaptasse em muitos outros campos.

Os tomógrafos convencionais usam fontes de tubos de raios-X e a sua resolução espacial é limitada pela geometria destes feixes de raios-X e também pelas características do detector que está sendo utilizado. Usando os princípios matemáticos da tomografia, uma série de imagens em 2D são reconstruídas para produzir uma imagem tridimensional. Quando raios-X passam através de um corpo, a atenuação em cada ponto depende do material naquele ponto e da distribuição de energia (espectro) do feixe. Em tomografia computadorizada o espectro é composto de vários níveis de energia (policromático) e varia conforme o feixe passa através do objeto. A atenuação num ponto pode variar com a direção com a qual o feixe passa através do objeto. Se o espectro possuir apenas um nível de energia (monocromático), isso não acontece (HERMAN, 1980).

Com o passar dos anos a técnica de tomografia computadorizada passou a ser usada para visualizar escalas menores, e desta maneira surgiu a técnica de microtomografia. Nesta técnica o detector permanece parado e a amostra gira 360° em torno de si mesma.

A técnica de microtomografia computadorizada, normalmente conhecida como μ CT, vem sendo muito usada em vários tipos de materiais, principalmente em materiais biológicos, desde 1980, e pode produzir imagens em 3D com uma resolução de 1 μ m e em algumas situações até menores.

A microtomografia pode ser usada tanto como um método qualitativo quanto quantitativo. O método qualitativo permite que as amostras sejam visualizadas em qualquer direção e em qualquer corte planar, com uma resolução de micrometros, no seu estado natural e a necessidade de nenhuma técnica destrutiva (LANDIS, 2010).

Um importante descobrimento para a microtomografia foi o uso de radiação síncrotron como uma fonte de raios-X, o que tornou possível a obtenção de contrastes muito melhores nas amostras. A radiação síncrotron emite luz em ordens de grandeza muito maiores que fontes de raios-X convencionais e essa implicação para tomografia é que o alto fluxo permite resolver o problema de variações muito sutis na absorção.

A absorção foi durante muito tempo o único mecanismo de contraste que podia ser usado para as reconstruções das estruturas em 3D. Isso significa que a microtomografia só era aplicada com bons resultados em amostras de materiais que possuíam um alto coeficiente de atenuação ou que fossem formadas por componentes que possuíssem grandes diferenças nos coeficientes de atenuação. A chegada do contraste de fase (SNIGIREV et al., 1995), desenvolvida especialmente para materiais com baixo coeficiente de atenuação como polímeros e vários tipos de materiais biológicos mudou essa situação. A quantificação do volume da traqueia (WESTNEAT et al., 2003) representou um dos primeiros experimentos em que a radiação síncrotron foi aplicada a insetos.

II.3.1 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA RECONSTRUÇÃO

A matemática envolvida na técnica de tomografia vai ser descrita neste capítulo. O processo de imagens tomográficas envolve raios-X passando através de um objeto, e medidas dos raios-X transmitidos através do uso de um detector colocado do lado oposto à fonte de raios-X. Os raios-X passam pelo material, mas são absorvidos ao longo do caminho de acordo com a composição e a densidade de cada material.

A intensidade (número de fótons por segundo) é reduzida de acordo com o coeficiente de atenuação linear μ , que para uma determinada amostra não é uniforme e possui uma certa variação, então se pode escrever $\mu(x,y,z)$, ou para o plano 2D, $\mu(x,y)$ (HERMAN, 1980). O coeficiente de atenuação linear é produto da densidade e do coeficiente de absorção de massa, que depende da composição elementar do material.

Em aplicações médicas as densidades variam muito pouco. Já para aplicações industriais ocorrem significantes variações de densidade. A intensidade medida é dada pela Lei de Beer-Lambert:

$$\int \mu(x,y)dS = \log_e \frac{I_0}{I_d} \quad 4$$

Onde I_0 é a intensidade incidente (de um tubo de raios-X ou radioisótopo) que é conhecido e normalmente é constante, e I_d é a intensidade detectada. Essa integral descreve o resultado da projeção linear ao longo do objeto.

O problema consiste em determinar os coeficientes de atenuação $\mu(x,y)$ em cada ponto do corpo de prova. A determinação do coeficiente de atenuação pode ser

calculado a partir da Equação 6, onde a integral corresponde ao raio-soma, sendo este a soma de todos os coeficientes de atenuação numa determinada direção. (BARROSO, 1997)

Como pode ser visto na Figura 2-5 a função $(P(\phi,t))$ que descreve essa projeção é normalmente plotada como o inverso da intensidade ou o somatório da absorção ao longo de cada linha. A função é escrita como $P(\phi,t)$ para indicar que varia com o ângulo e posição. Cada "medida" é o contorno de uma dimensão da atenuação medida com função da posição, correspondendo a um ângulo particular. A coleção dessas "medidas" pode ser representada como um gráfico 2D ou imagem na qual um eixo é a posição t e o outro é o ângulo ϕ . Essa imagem é chamada de sinograma ou a transformada de Radon da slice 2-D.

O nome "Transformada de Radon" vem do fato dos princípios desse método de imagem ter sido publicado em 1917 por Radon. Contudo, as equações representadas por ele não apresentavam uma forma prática para fazer a reconstrução, só em 1963, Hounsfield e Cormack desenvolveram um algoritmo prático de reconstrução, e em 1979 eles dividiram o Prêmio Nobel de medicina (HOUSFIELD, 1973).

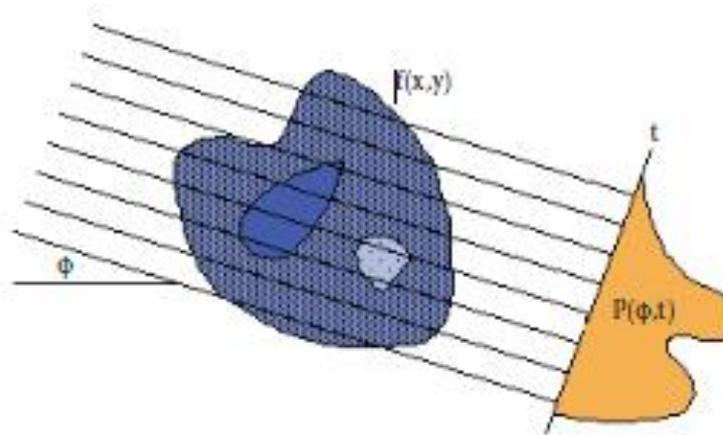


Figura 2-5: A figura mostra um conjunto de projeções através de um objeto com um ângulo de observação ϕ formando a função P . (HERMAN, 1980)

O caminho dos raios-X através de um objeto pode ser pensado como uma integral de linha representando a atenuação total sofrida pelos raios-X quando eles viajam

através do objeto. A Figura 2-6 mostra o objeto sendo representado por uma função bidimensional $f(x, y)$ e cada integral de linha pelos parâmetros (θ, t) . A equação da linha AB é

$$x \cos \varphi + y \sin \varphi = t. \quad 5$$

Essa relação pode ser usada para definir a integral de linha

$$P_\varphi(t) = \int_{(\varphi, t) \text{ line}} f(x, y) dS. \quad 6$$

Usando a função delta, essa equação pode ser reescrita como

$$P_\varphi(t) = \iint_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \varphi + y \sin \varphi - t) dx dy. \quad 7$$

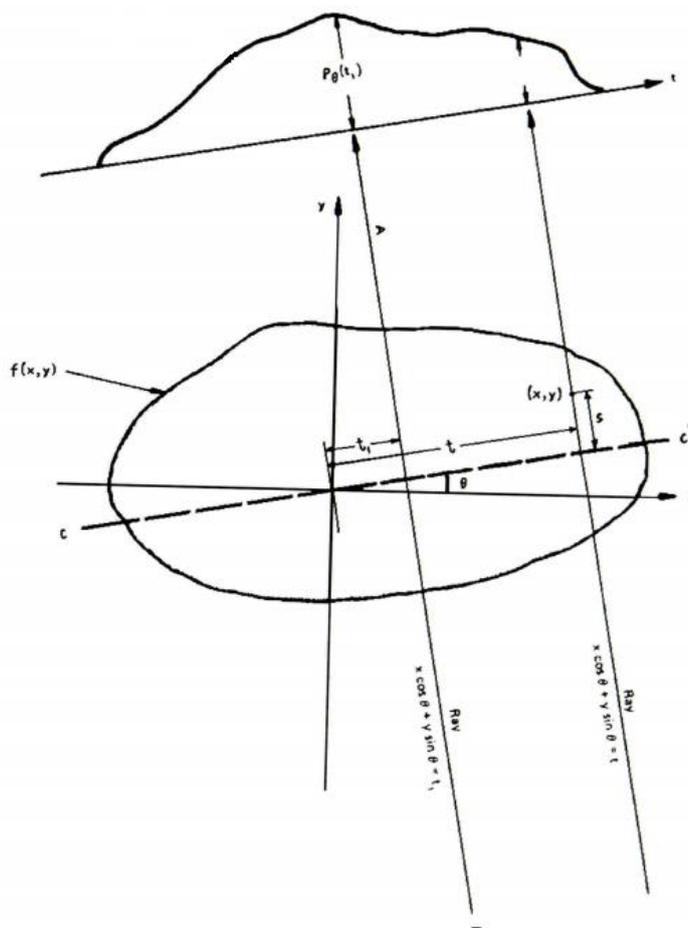


Figura 2-6: Objeto sendo representado por uma função bidimensional $f(x, y)$ e cada integral de linha pelos parâmetros (θ, t) (HERMAN, G. T., 1980)

A função $P_\varphi(t)$ representa a Transformada de Radon da função $f(x, y)$. A projeção é formada combinando o conjunto de integrais de linha. A projeção mais simples é uma coleção de integrais de feixes paralelos como é dado por $P_\varphi(t)$ para uma constante φ . Isso é conhecido como projeção paralela. Isso pode ser medido movendo uma fonte de raios-X e um detector junto com linhas paralelas do lado oposto de um objeto. Um diferente tipo de projeção é possível com uma fonte numa posição fixa.

II.3.1.1 TEOREMA DA FATIA DE FOURIER

O Teorema da fatia de Fourier diz que "A transformada de Fourier de uma projeção paralela de uma imagem $f(x, y)$ feita com um ângulo φ nos fornece uma slice de uma transformada de duas dimensões, $F(u, v)$ "

Em outras palavras, a transformada de Fourier de $P_\varphi(t)$ fornece os valores de $F(u, v)$ ao longo da linha BB na Figura 2-7. O teorema da fatia de Fourier deve ser derivado pegando a transformada de Fourier unidimensional de uma projeção paralela e observando que é igual a slice da transformada de Fourier bidimensional do objeto original. Isso mostra que com os dados da projeção, pode ser possível estimar o objeto simplesmente fazendo a transformada inversa de Fourier bidimensional.

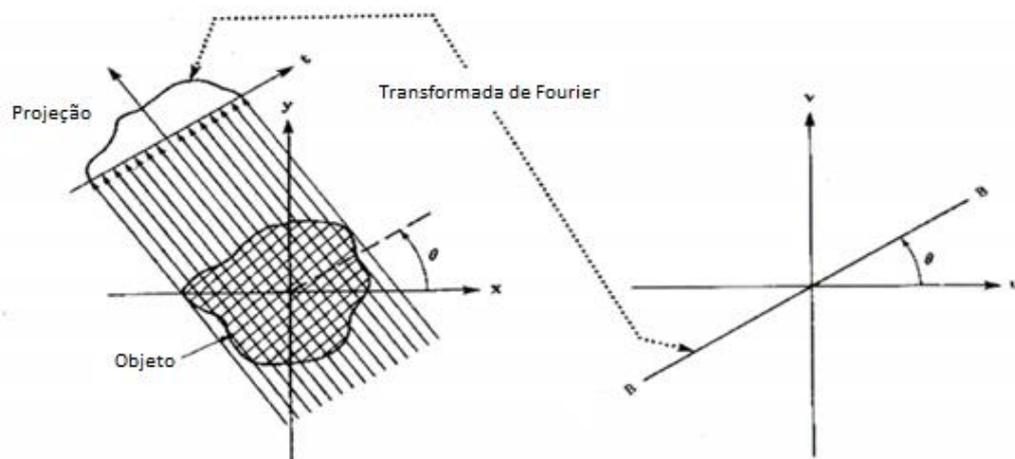


Figura 2-7: Teorema da fatia de Fourier (HERMAN, 1980)

Considerando o sistema de coordenadas (t, u) como a versão "girada" do sistema original (x, y) pode-se escrever

$$\begin{bmatrix} t \\ u \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\varphi & \text{sen}\varphi \\ -\text{sen}\varphi & \cos\varphi \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}. \quad 8$$

No sistema de coordenadas (t,u) a projeção ao longo da linha da constante t é escrita

$$P_\varphi(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t, u) dS. \quad 9$$

E a sua transformada de Fourier fornece

$$S_\varphi(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_\varphi(t) e^{-j2\pi\omega t} dt. \quad 10$$

onde ω é a frequência espacial. Substituindo a definição da projeção na equação, podemos reescrever a equação da seguinte forma:

$$S_\varphi(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} f(t, u) dS \right] e^{-j2\pi\omega t} dt. \quad 11$$

Transformando o resultado no sistema de coordenadas (x,y), podemos escrever

$$S_\varphi(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-j2\pi\omega(x\cos\varphi + y\text{sen}\varphi)} dx dy. \quad 12$$

O lado direito dessa equação agora representa a transformada de Fourier bidimensional com uma frequência espacial $u = \omega\cos\varphi$, $v = \omega\text{sen}\varphi$, e tomando essa transformada para o caso $v = 0$,

$$S_\varphi(\omega) = F(\omega, \varphi) = F(\omega\cos\varphi, \omega\text{sen}\varphi). \quad 13$$

Essa equação é a essência da tomografia computadorizada e prova o Teorema da fatia de Fourier.

II.3.1.2 ALGORITMO DE RETROPROJEÇÃO FILTRADA

O teorema da fatia de Fourier indica que utilizando as projeções de uma função do objeto com os ângulos $\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_k$ e usando a transformada de Fourier de cada um, é possível determinar os valores de $F(u, v)$ ao longo das linhas radiais (PAI, 2002).

Lembrando que estamos no seguinte sistema de coordenadas

$$u = \omega\cos(\varphi), \quad v = \omega\text{sen}(\varphi) \quad 14$$

onde w é o raio e o φ é o ângulo, as diferenciais vão mudar da seguinte forma,

$$dudv = \omega d\omega d\varphi \quad 15$$

A técnica mais conhecida e utilizada de reconstrução de imagem é a retroprojeção filtrada (filtered backprojection) como será visto a seguir, este método usa o fundamento do teorema da projeção.

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_0^\infty F(\omega, \varphi) e^{j2\pi\omega(x\cos\varphi + y\sin\varphi)} \omega d\omega d\varphi \quad 16$$

Pode-se escrever a integral de cima variando de 0 até π e depois variando de π até 2π . Então teremos a seguinte equação

$$\begin{aligned} f(x, y) = & \int_0^\pi \int_0^\infty F(\omega, \varphi) e^{j2\pi(x\cos\varphi + y\sin\varphi)} \omega d\omega d\varphi + \\ & \int_\pi^{2\pi} \int_0^\infty F(\omega, \varphi + \pi) e^{j2\pi(x\cos(\varphi+\pi) + y\sin(\varphi+\pi))} \omega d\omega d\varphi \end{aligned} \quad 17$$

Mas, a partir da teoria de Fourier,

$$F(\omega, \varphi + \pi) = F(-\omega, \varphi) \quad 18$$

Então teremos a seguinte equação

$$f(x, y) = \int_0^\pi \int_{-\infty}^\infty [F(\omega, \varphi) |\omega| e^{j2\pi(x\cos\varphi + y\sin\varphi)} d\omega] d\varphi \quad 19$$

Nesse caso, podemos dizer que $F(\omega, \varphi)$ dentro da integral é o mesmo que $S(\omega)$ da equação do teorema de Fourier. Então teremos

$$f(x, y) = \int_0^\pi \left[\int_{-\infty}^\infty S_\varphi(\omega) |\omega| e^{j2\pi(x\cos\varphi + y\sin\varphi)} d\omega \right] d\varphi \quad 20$$

Na equação acima, o termo dentro dos colchetes representa uma operação filtrada que estima as projeções filtradas, e a operação feita pela integral de fora dos colchetes estima as retroprojeções (back projections).

O termo $|\omega|$ surgiu devido à mudança 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 (ALMEIDA, 2013).

O algoritmo de retroprojeção filtrada pode ser descrito por 3 processos:

- 1) Encontrar a transformada de Fourier das projeções.

- 2) Encontrar as projeções filtradas. Que pode ser representado matematicamente como

$$Q_{\varphi}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} S_{\varphi}(\omega) |\omega| e^{i2\pi\omega t} d\omega \quad 21$$

- 3) Encontrar as retroprojeções (back projection). Esse processo é descrito da seguinte forma

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} Q_{\varphi}(xcos\varphi + ysen\varphi) d\varphi \quad 22$$

Esses três passos descritos acima representam o que é feito basicamente no algoritmo de retroprojeção filtrada (NUGENT, 1996).

II.4 CONTRASTE DE FASE

Em qualquer técnica de imagem feita com raios-X existem dois mecanismos básicos de contraste, o contraste por absorção e o contraste de fase.

No contraste por absorção, para um determinado comprimento de onda ou energia dos raios-X, o coeficiente de absorção aumenta com a densidade do material. Ele é baseado no fato de que a intensidade do feixe decresce exponencialmente quando aumentamos a distância de propagação dentro de um material homogêneo. O coeficiente de atenuação do material determina a velocidade com que essa exponencial decresce. Para um determinado comprimento de onda ou energia dos raios-X, o coeficiente de absorção cresce com a densidade eletrônica do material e com o número atômico dos elementos químicos que os constituem.

O contraste por absorção é ideal para imagens médicas com alta densidade como ossos envolvidos por tecidos com densidades baixas, como músculos e pele. Contudo, o contraste por absorção não é sugerido para materiais com baixa absorção como polímeros e tecidos biológicos. Esses tipos de materiais ficam com melhores contrastes quando é usado o contraste de fase (BETZ et al., 2007).

Várias formas de contraste de fase já foram implementadas durante os anos, os principais são: o método holográfico, o método por interferometria, a DEI (*diffraction-enhanced image*) e o método por propagação. Este último método que se baseia no mesmo princípio do método holográfico e tem sido o mais utilizado já que é o mais simples de todos. O único pré-requisito para que seja possível utilizar este método é

uma alta coerência espacial do feixe incidente, o que pode ser obtido através de uma fonte de luz síncrotron (GUREYEV et al., 2001).

Diferentemente do que ocorre na absorção, a mudança de fase não influencia na amplitude da onda do feixe e, portanto, não pode ser medida diretamente atrás da amostra. A imagem é criada pela interferência dos componentes difratados do feixe e a parte não difratada do feixe. De um modo geral, o contraste e a largura das franjas de interferência aumentam com o aumento da distância entre a amostra e o detector. Portanto, a imagem por contraste de fase permite o mapeamento das mudanças no índice de refração. As interfaces entre materiais com diferentes densidades correspondem em descontinuidades no índice de refração.

Para que ocorra o contraste de fase é muito importante que duas condições sejam obedecidas. A primeira condição, é que o feixe que passa através da amostra deve ter alta coerência espacial, e a segunda condição, é que deve existir uma distância significativa entre a amostra e o detector.

Existem muitos estudos do uso do contraste de fase em imagens acoplados ao uso de síncrotrons de terceira geração. Esses síncrotrons permitem que a informação da fase seja extraída do feixe que passa através do objeto de interesse, e com essa mudança de fase φ do feixe, informações importantes sobre o objeto estudado podem ser obtidas.

O contraste de fase realça o contraste em tecidos moles, mostrando muitos detalhes que não poderiam ser vistos com o contraste por absorção.

II.4.1 PRINCÍPIOS FÍSICOS DO CONTRASTE DE FASE POR PROPAGAÇÃO

A interação do feixe de raios-X com uma amostra pode ser descrita em termos do índice de refração,

$$n_{\lambda}(x, y, z) = 1 - \delta_{\lambda} - i\beta_{\lambda} \quad 23$$

onde λ é o comprimento de onda.

As mudanças na parte real do desvio do índice de refração são o que produzem o contraste de fase da imagem. A parte imaginária do índice de refração β determina a parte responsável pela absorção (MAYO, 2012).

Um objeto situado em um feixe de raios-X altamente coerente introduz uma mudança de fase, que pode ser detectada a uma distância atrás da amostra devido à difração de Fresnel (KONSTANTIN, 2004). A grande vantagem do contraste de fase por propagação é a sua simplicidade experimental. Não é necessário nenhum tipo de elemento óptico como espelhos e cristais, e o setup experimental e alinhamento são muito simples. O método de propagação tem sensibilidade suficiente para detectar diferenças grandes no índice de refração. Na Figura 2-9 se encontra uma exemplificação deste tipo de contraste de fase.

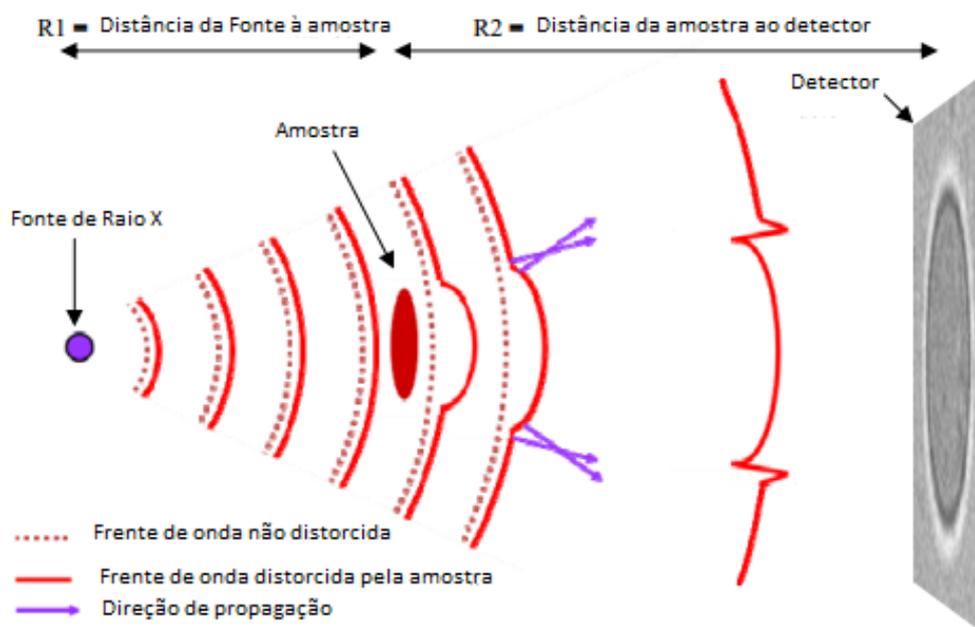


Figura 2-8: Exemplo do funcionamento do contraste de fase por propagação (MAYO, 2012)

No contraste de fase, o tamanho da fonte de raios-X normalmente deve ser algo $<40\mu\text{m}$, e isso permite que os efeitos de refração sejam visualizados. Para otimizar os efeitos do contraste de fase é necessário que exista uma distância significativa entre a amostra e o detector (0,1 até 1 m), e raios-X com comprimento de onda da ordem de 1 \AA ou menores e de energia de aproximadamente 10 keV ou maiores (GUREYEV, 2000).

Se considerarmos um raio-X monocromático se propagando com uma determinada intensidade ao longo de uma direção no eixo z, os efeitos de fase, $\varphi(x, y, 0)$, que a amostra vai gerar nos raios-X transmitidos é proporcional aos valores

correspondentes à parte real do índice de refração, enquanto a distribuição da intensidade dos raios-X transmitidos, $I(x, y, 0)$, é proporcional a parte imaginária:

$$\varphi(x, y, 0) = -(2\pi/\lambda) \int_{-\infty}^0 \delta_{\lambda}(x, y, z') dz' \quad 24$$

$$I_{\lambda}(x, y, 0) = \exp \left\{ -(4\pi/\lambda) \int_{-\infty}^0 \beta(x, y, z') dz' \right\} \quad 25$$

A formação do contraste de fase por propagação pode ser descrita pela equação do transporte da intensidade:

$$-\nabla \cdot [I_{\lambda}(x, y, 0) \nabla \varphi_{\lambda}(x, y, 0)] = 2\pi/(R\lambda) [I_{\lambda}(x, y, R) - I_{\lambda}(x, y, 0)] \quad 26$$

onde $\nabla = (\partial_x, \partial_y)$ é o operador gradiente e R é a distância da amostra ao detector. No caso de uma fonte pontual, R pode ser descrito como:

$$R = \frac{R_1 R_2}{(R_1 + R_2)} \quad 27$$

onde R_1 é a distância da fonte ao objeto e R_2 é a distância da amostra ao detector, como podemos ver na Figura 2-9.

A Equação 29 mostra que o contraste das imagens coletadas a uma determinada distância do objeto é proporcional a essa distância e à magnitude dos efeitos de fase introduzida pela amostra devido aos raios-X transmitidos.

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 suavemente que β quando a energia é aumentada, como ilustrado na Figura 2-10. 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. (ALMEIDA, 2013)

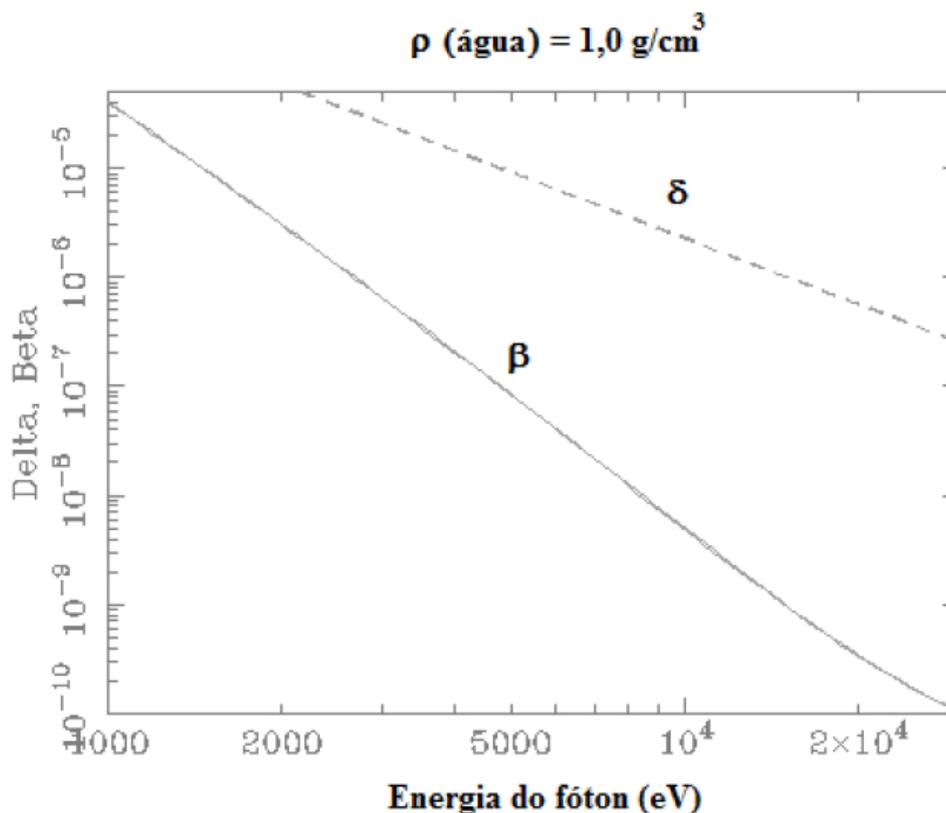


Figura 2-9: Partes real e imaginária, delta e beta, do índice de refração complexo da água. (ALMEIDA, 2013)

II.4.2 COERÊNCIA ESPACIAL E TEMPORAL

A coerência é a medida da correlação entre as diferentes fases medidas em diferentes pontos (temporal e espacial) em uma onda.

A física das propriedades de coerência dos campos eletromagnéticos normalmente é dividida em coerência temporal e espacial.

II.4.2.1 COERÊNCIA TEMPORAL

A coerência temporal de um feixe de luz é normalmente descrita por coerência de "comprimento" (l_c) que é o comprimento da onda eletromagnética e está relacionada a sua monocromaticidade $\frac{\lambda}{\Delta\lambda} = N$ pela relação

$$l_c = \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} = N\lambda \quad 30$$

onde l_c é a diferença de caminho que pode entre dois feixes de interferência.

II.4.2.2 COERÊNCIA ESPACIAL

A coerência espacial ou coerência transversal descreve o grau de correlação da fase da onda em dois pontos distintos em um plano transversal, e fornece a informação de quanto uniforme é a fase da frente de onda.(ALMEIDA, 2013).

II.5 RESOLUÇÃO

A resolução pode influenciar muito nos resultados obtidos a partir de uma microtomografia computadorizada e a alta resolução depende totalmente do detector que está sendo utilizado e também da geometria do feixe (RUSS, 2011).

A resolução é determinada pelo tamanho das unidades de informação que representam uma imagem. O pixel é uma unidade de informação por exemplo. Cada pixel carrega uma quantidade definida de informação que fica guardada. A Figura 2-11 demonstra uma imagem representando este tipo de informação (pixel).

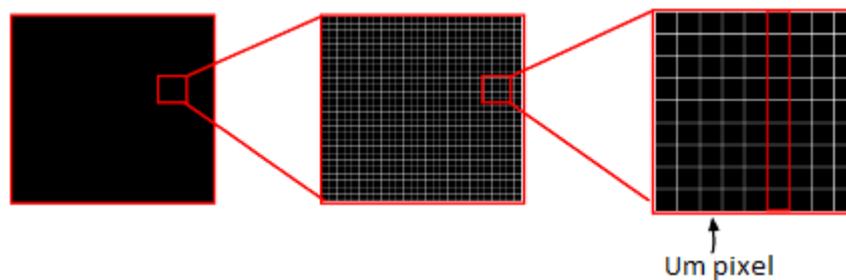


Figura 2-10: Representação de um pixel (RUSS J., 2011)

A resolução de uma imagem pode ser medida de várias formas:

1. Amostras por polegada, (spi, escâneres).
2. Pixels por polegada, (ppi monitores).
3. Pontos por polegada, (dpi, impressoras).

Mais pixels em uma determinada área fornecem uma imagem muito mais detalhada, porém os arquivos gerados são muito pesados. A intensidade de um pixel é digitalizada e guardada como um número digital. Devido à capacidade de

armazenamento limitado, um número digital é armazenado com um número finito de bits. Por exemplo, um número digital de 8 bit varia de 0 a 255, enquanto um número digital de 11 bit varia de 0 a 2047.

Com o passar do tempo, os pixels foram ficando cada vez menores, e a diferença entre a alta resolução e a "extrema" alta resolução nem sempre podem ser discriminadas pelo olho humano. Porém, na microtomografia computadorizada, em muitas situações, quanto melhor a resolução, melhor tem sido a visualização das imagens. Na Figura 2-12 pode se identificar o que ocorre quando cada vez mais uma imagem é "ampliada".

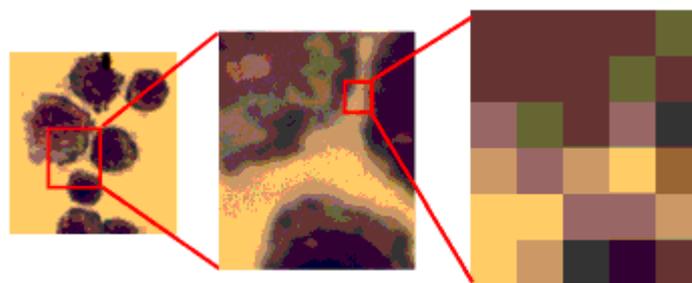


Figura 2-11: Ampliação de uma imagem (RUSS, 2011)

II.5.1 RESAMPLING

O *Resampling*, ao mesmo tempo em que pode ser perigoso, também pode ser útil, já que através dele é possível adicionar ou remover pixels de uma imagem. Este tipo de processo não é reversível, podendo ser muito útil se for usada com cuidado. Existem duas razões para usá-lo:

1. Mudar a resolução sem afetar as dimensões da imagem.
2. Mudar as dimensões sem afetar a resolução.

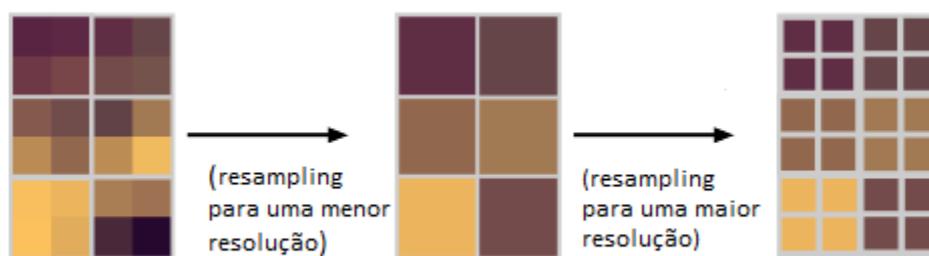


Figura 2-12: Exemplos de resampling (RUSS, 2011)

Existem programas que já possuem a opção para este tipo de técnica como, por exemplo, o Avizo 8.0 e se usado com cuidado pode melhorar muito uma imagem.

II.6 RHODNIUS PROLIXUS

O *Rhodnius prolixus* é um dos principais insetos vetores do *Tripanossoma cruzi* o agente etiológico da Doença de Chagas, e pode ser identificado na Figura 2-14.



Figura 2-13: *Rhodnius prolixus*

Aproximadamente 8 milhões de pessoas no mundo são infectadas pela Doença de Chagas, que ocorre principalmente na América Latina e América Central (WHO, 2013).

A doença de chagas é causada pela picada do *Rhodnius prolixus*, que infecta o ser humano com o protozoário *Trypanosoma cruzi*, presente nas suas fezes e urina. Isto ocorre porque este inseto, assim que se alimenta, tem o hábito de defecar e urinar logo a seguir, e quando o indivíduo que foi picado coça o local, permite a entrada do protozoário na corrente sanguínea.

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 2-15) (GARCIA et al, 2007).

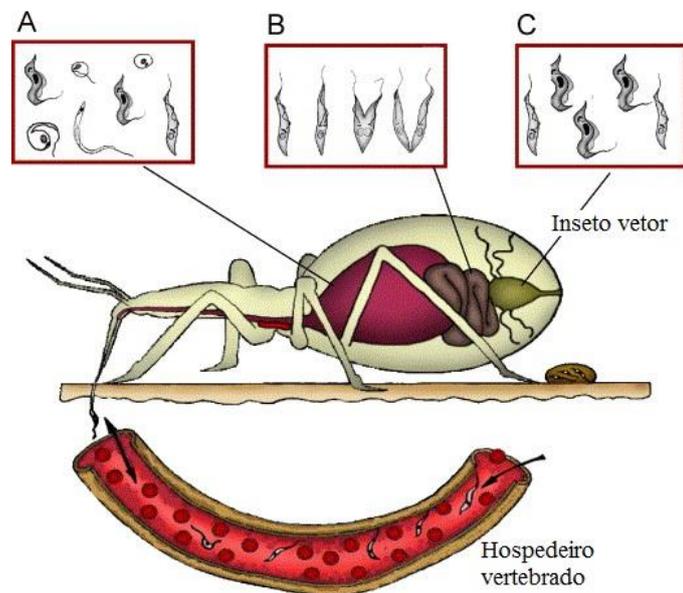


Figura 2-14: Esquema do ciclo biológico do parasita *Trypanosoma cruzi* com o inseto vetor *Rhodnius prolixus*. O inseto alimentado com sangue infectado com a forma tripomastigota os quais se transformam em epimastigotas e alguns spheromastigotes no estômago (A). No intestino, epimastigotas multiplicadas (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).

Outra forma de contágio da doença é o consumo de alimentos como caldo de cana ou açaí contaminados com o *triatomíneo* ou seus excrementos. A doença também pode ser transmitida através de transfusão de sangue contaminado, ou de forma congênita, isto é, de mãe para filho durante a gravidez ou parto.

O *Rhodnius prolixus* é um hemíptero hematófago, que chega a ingerir 10 vezes seu peso em sangue em uma única refeição. Durante seu ciclo de vida apresenta cinco estádios de ninfa antes de atingir a fase adulta. Apenas na fase adulta este inseto possui asas e apresenta dimorfismo sexual. A muda de um estágio para o outro ocorre em resposta a um repasto sanguíneo. Este inseto não possui um hospedeiro preferencial, alimentando-se em qualquer vertebrado, inclusive o homem.

O tratamento para doença de Chagas pode ser feito inicialmente com o uso de medicamentos durante cerca de um mês, que podem curar a doença ou evitar suas complicações enquanto o parasita ainda encontra-se no sangue do indivíduo. Mas quando a doença se encontra na fase crônica, o parasita deixa o sangue e passa a habitar os tecidos que formam os órgãos e por isso, ela torna-se crônica atacando especialmente o coração e o sistema nervoso de forma lenta, mas progressiva.

Devido a falta de uma vacina ou de algum tipo de tratamento para essa doença na fase aguda, o controle do inseto vetor tem sido o principal método de prevenção, e o estudo das suas estruturas internas e externas da cabeça pode ser muito útil no estudo para uma possível forma de controle (GARCIA, 1984; ROSA, 1999; ORCHARD, 1980). Além disso, o *Rhodnius prolixus* tornou-se um excelente inseto modelo para o estudo da fisiologia e da bioquímica de insetos.

II.6.1 QUITINA NO *RHODNIUS PROLIXUS*

A cutícula dos insetos é composta basicamente por proteínas, lipídeos e quitina. As proteínas e a quitina interagem para fornecer as funções mecânicas da cutícula, gerando a força e a rigidez que são necessárias para servir como exoesqueleto.

A quitina é um principal carboidrato da protocutícula do *Rhodnius prolixus*, compreendendo a metade do peso seco das cutículas. Ela é produzida pelas células endodérmicas da epiderme, variando de 10% a 45%. A quitina também é um componente da matriz que reveste o intestino médio, parte do sistema digestivo, reto e traquéia (LOCKE, 1958; KLAUDEN, 2007). É um amino polissacarídeo muito comum na natureza, e os estudos sobre a síntese da quitina vem se tornando muito importantes já que foram descobertos um conjunto de componentes que bloqueia a formação da quitina e pode causar a morte de alguns insetos já que eles não conseguem produzir novas cutículas.

O descobrimento de uma forma de impedir a formação da quitina pode ser muito útil para o controle de determinadas pragas e insetos que causam algum tipo de doença. O *Rhodnius prolixus* é um deles, e por isso, a identificação de estruturas com quitina neste inseto pode ser muito interessante (KLAUDEN, 2007).

CAPÍTULO III

III MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 MICROTOMOGRÁFIAS

III.1.1 SYRMEP

As medidas de microtomografia foram feitas na linha SYRMEP (**SY**nchrotron **R**adiation for **ME**dical **P**hysics) do laboratório de luz síncrotron ELETTRA (Figura 3-1), localizado na província de Trieste na Itália. A linha de luz SYRMEP é uma das 26 linhas do ELETTRA.



Figura 3-1: ELETTRA, Trieste, Itália

No setup utilizado para as medidas, o feixe é contido antes do monocromador, sendo a microtomografia por absorção e por contraste de fase disponibilizadas numa cabana a aproximadamente 15 m da fonte (ABRAMI et al, 2005). Com o objetivo de realizar experimentos com uma alta resolução, um sistema com uma câmera CCD oferecendo uma resolução espacial de 2 μm foi utilizado, com um feixe de raio-X branco com área de seção máxima de 100 (horizontal) x 6 (vertical) mm a uma distância de 15m da fonte. Uma tela cintiladora (Crytur, República Tcheca) de cristal de granada de lutécio-alumínio dopado com cério ($\text{Lu}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) com 25 μm de espessura foi

acoplada a uma câmara CCD de 16 bit refrigerada a ar (Photonic Science, KAI 4022M CCD, 2048 x 2048 full frame, tamanho de pixel de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, campo de visão de $7 \times 7 \text{mm}^2$) através de um microscópio óptico de luz visível (LEICA). A distância amostra-detector foi de 9 cm. Filtros de Si (1,0 mm) e Mo (0,025 mm) foram usados, de maneira que a energia média do feixe incidente fosse torno de 17 keV. Para os experimentos, foram obtidas 1440 projeções ao longo de um intervalo angular de 180° com um passo de $0,125^\circ$.

Na Figura 3-2 podem ser identificadas a câmara CCD, o porta-amostras e os filtros.

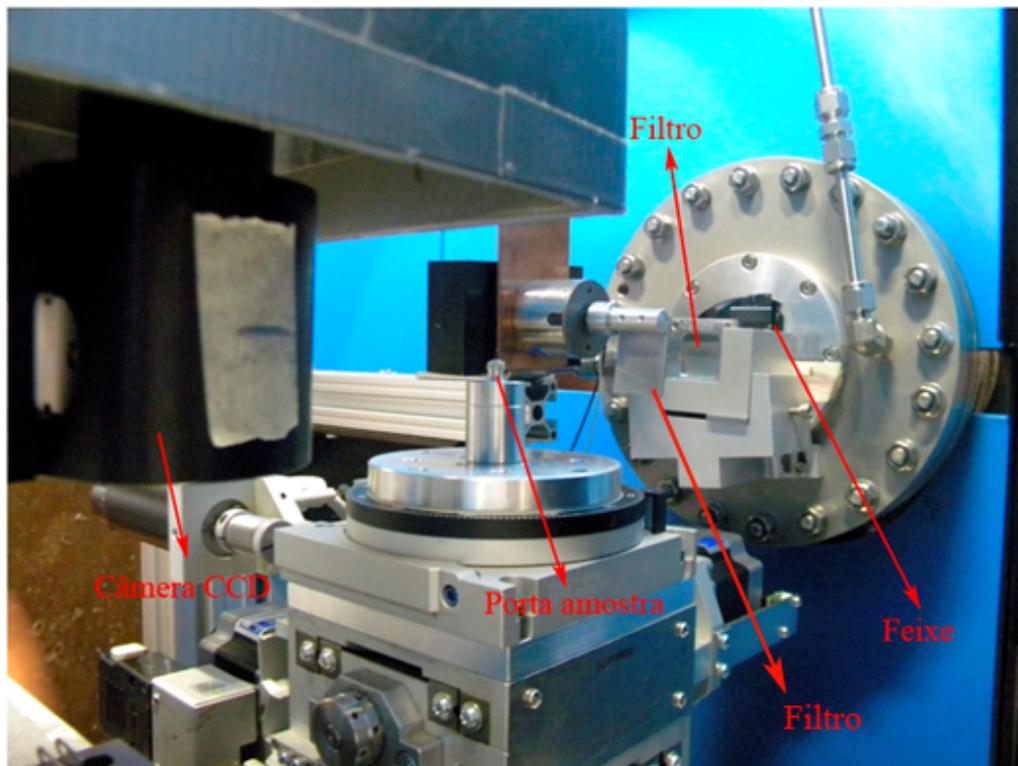


Figura 3-2: Setup mostrando a câmara CCD, o porta-amostras e os filtros.

Na Figura 3-3 pode-se ver como a cabeça do inseto foi posicionada diretamente no porta-amostras para que as medidas fossem realizadas.

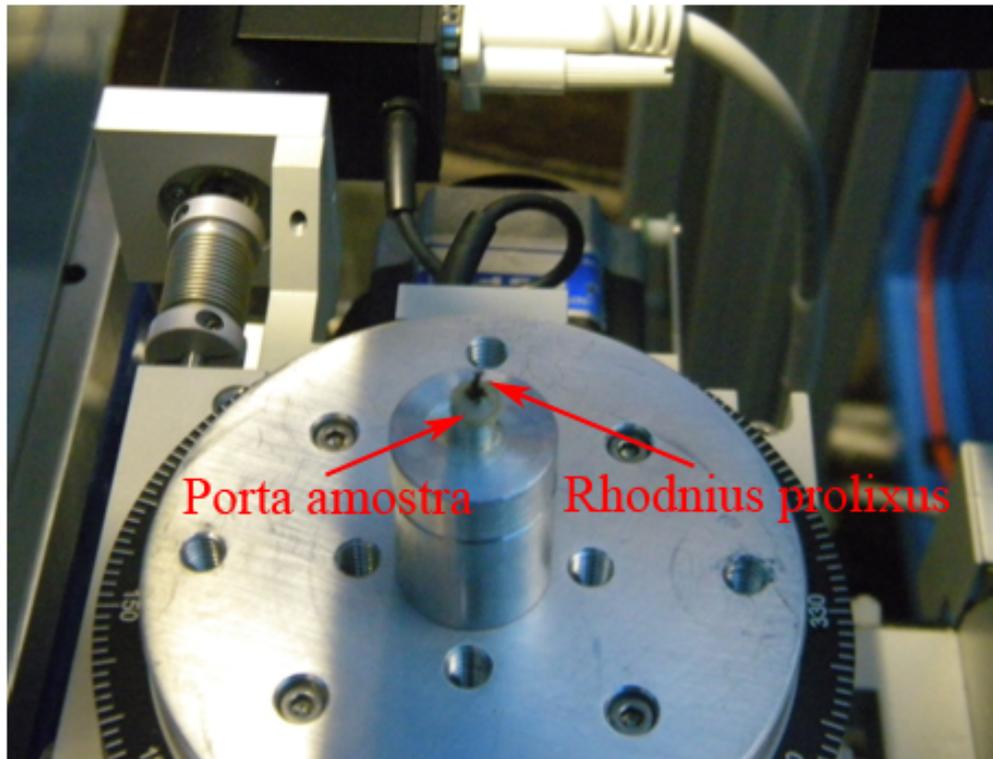


Figura 3-3: Porta-amostras e *Rhodnius prolixus*.

III.1.2 SELEÇÃO DOS PARÂMETROS DA LINHA DE LUZ

Antes de começar as medidas tomográficas é necessário escolher os parâmetros experimentais: tamanho do feixe laminar, energia média 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 (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**3-4).

O feixe laminar entra na sala experimental a cerca de 15 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*. 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 (NOGUEIRA, 2011). Para a realização de todas as tomografias o tamanho do feixe foi igual a $40 \times 4 \text{ mm}^2$.

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 3-4). Para fazer esse alinhamento uma amostra padrão em forma de agulha é usada.

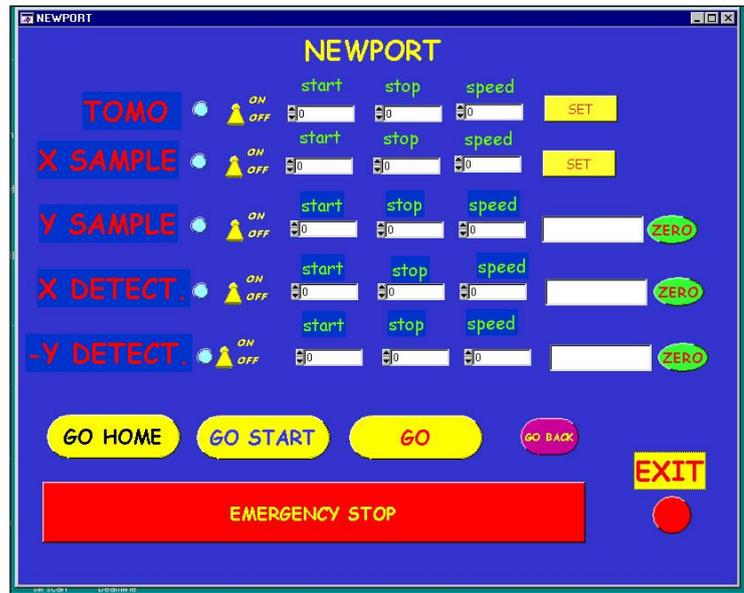


Figura 3-4: Interface do programa Newport para o alinhamento do centro da amostra e do detector

III.1.3 AQUISIÇÃO DAS TOMOGRAFIAS

A amostra é rotacionada dentro do feixe policromático 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 e Figura 3-6b).

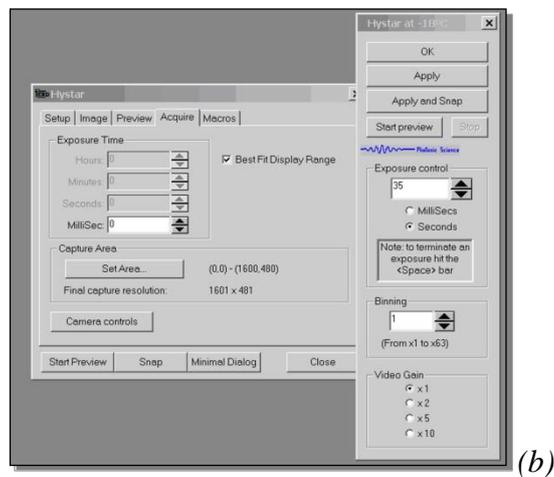
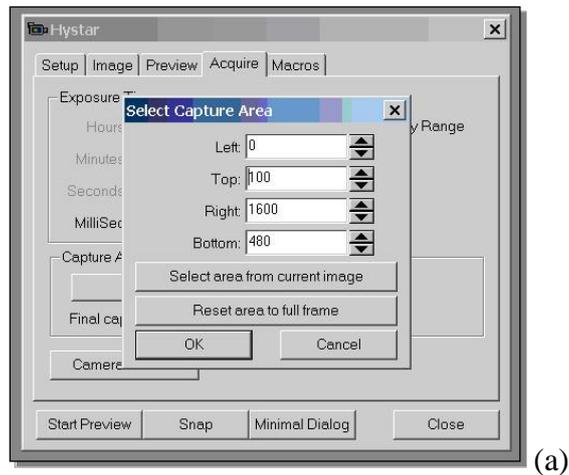
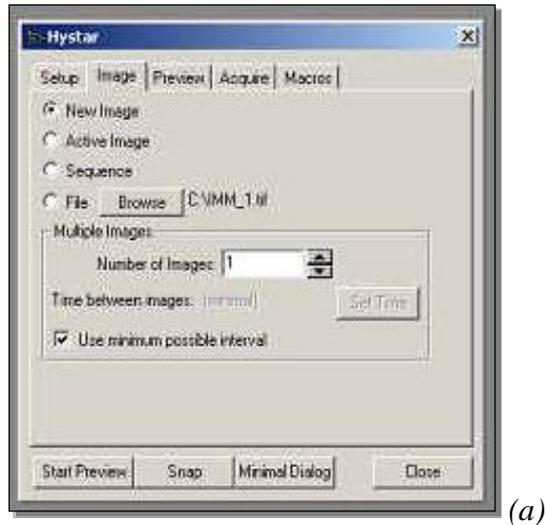
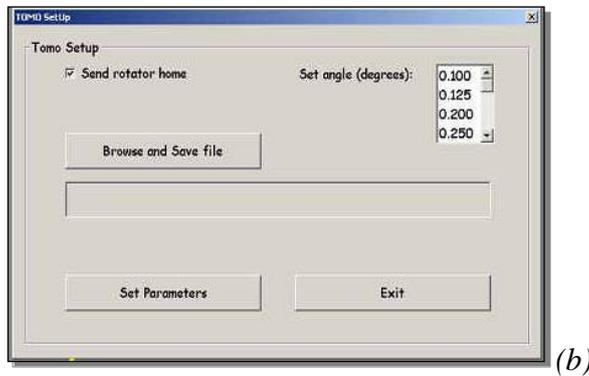


Figura 3-5: Interface do programa Image Pro Plus: (a) Submenu para seleção da área de captura da imagem. (b) Submenu para seleção do tempo de aquisição e binning da imagem.

No submenu *Image* (Figura 3-7a) 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 3-7b). Após cada aquisição, o arquivo é salvo na destinação definida.



(a)



(b)

Figura 3-6: (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas. (b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.

Todas as imagens obtidas são normalizadas a partir da seguinte relação

$$I_{normalizada} = \frac{I_{Amostra} - I_{Dark}}{I_{Flat} - I_{Dark}}$$

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 obturador fechado (sem feixe);

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

As Figuras 3-8, 3-9, 3-10 e 3-11 mostram um exemplo de cada uma dessas imagens obtidas para uma amostra.

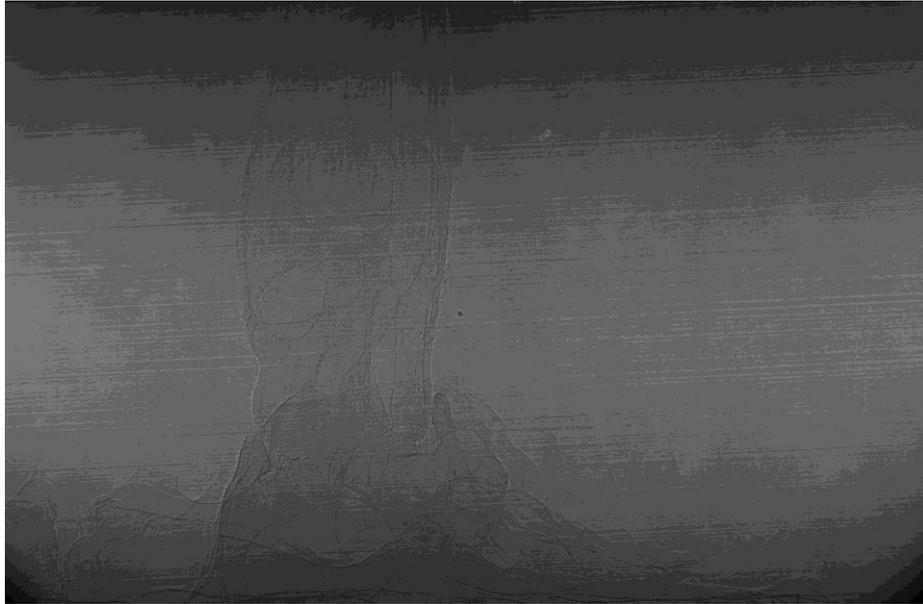


Figura 3-7: Imagem da amostra.

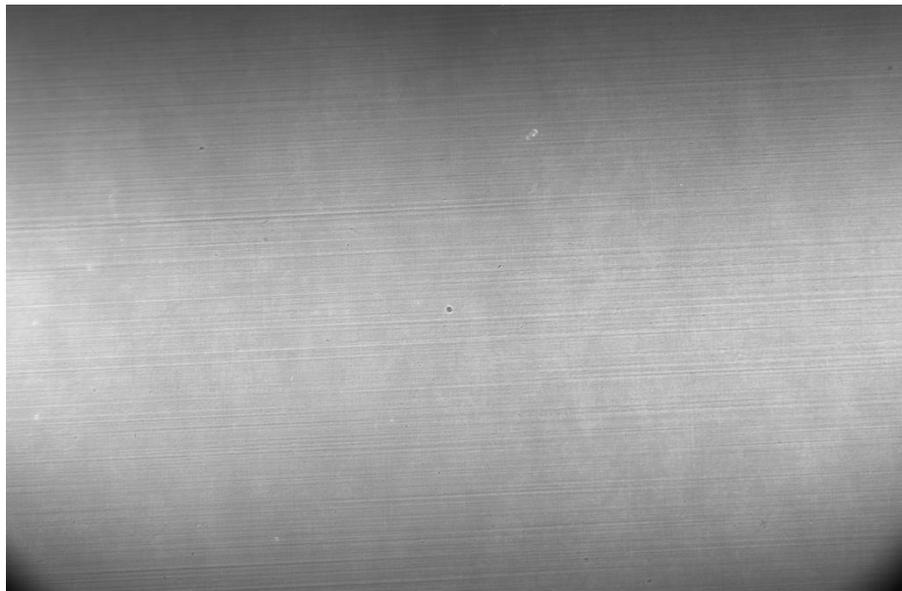


Figura 3-8: Imagem flat.

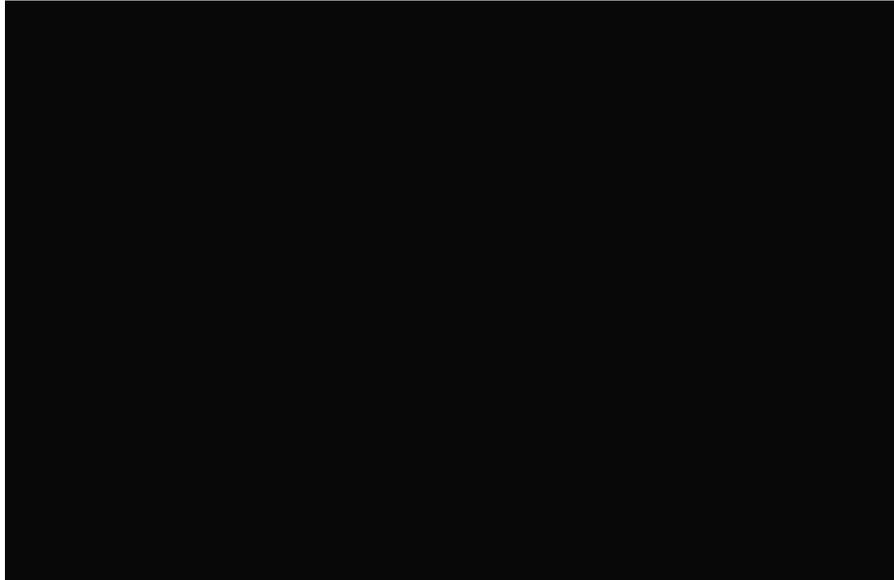


Figura 3-9: Imagem dark

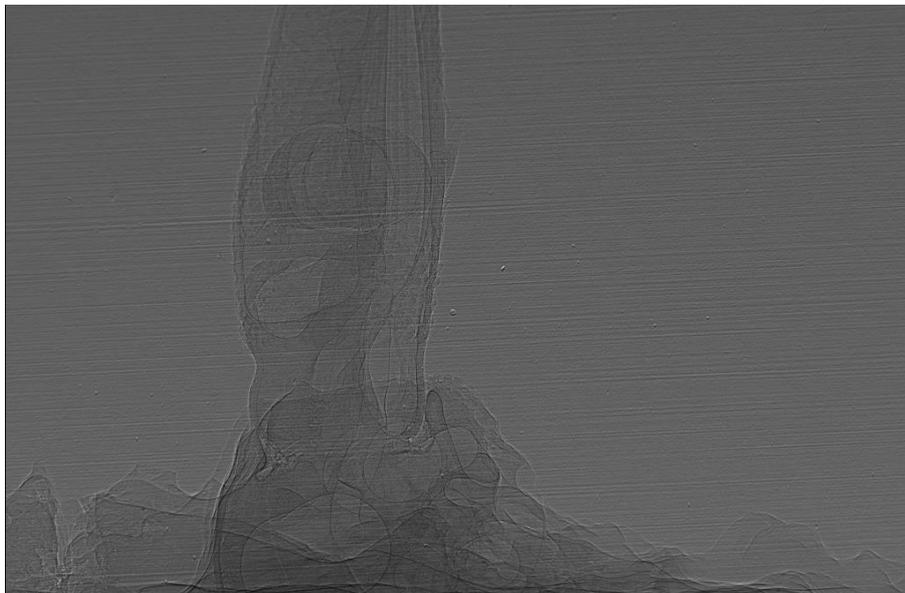


Figura 3-10: Imagem normalizada.

III.1.4 RECONSTRUÇÃO DAS IMAGENS

As tomografias foram reconstruídas usando o algoritmo de retroprojeção filtrada com o filtro *Shepp Logan* através o programa SYRMEP TOMO PROJECT desenvolvido pelo grupo da SYRMEP.

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 (NOGUEIRA, 2011). 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 *slice* da qual se deseja construir o sinograma (Figura 3-12).
- Selecionar o filtro ao qual as *slices* serão submetidas (*ramlak*, *shepp_logan*, *kernel width*, *rem ring*, *rem zinger*). O filtro *Shepp-Logan* foi usado para todas as imagens.
- Escolher na imagem do sinograma a largura da *slice* a ser reconstruída definindo os limites esquerdo e direito (*Crop Left Right*) no sinograma de modo a selecionar a região que realmente contém os dados (Figura 3-13).
- 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 *slices* reconstruídas.
- Finalmente, depois de otimizados os parâmetros tomográficos, todos os sinogramas podem ser criados e as *slices* podem ser reconstruídas. Todas as *slices* foram convertidas 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.

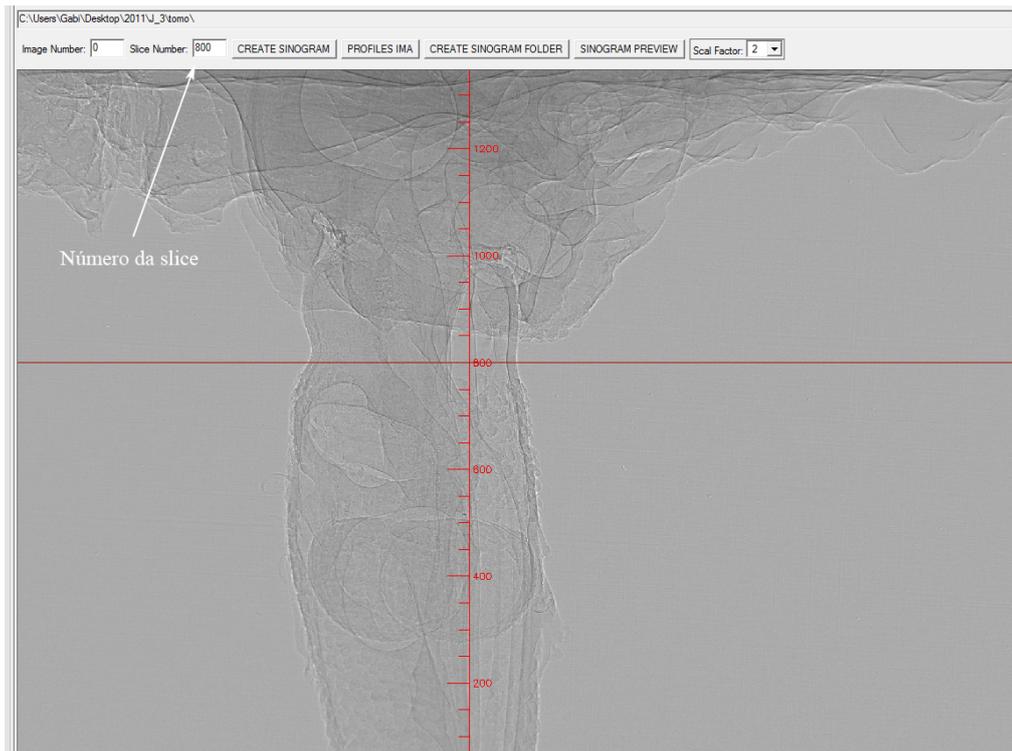


Figura 3-11: Janela do programa de reconstrução mostrando um exemplo de projeção e a escolha da slice da imagem.

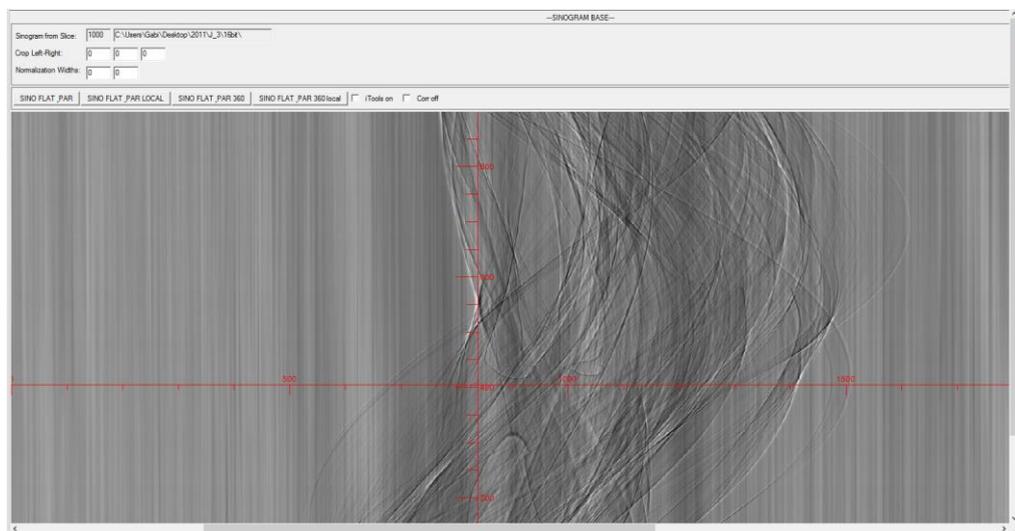


Figura 3-12: Sinograma da fatia escolhida definindo os limites esquerdo e direito.

III.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os insetos (*Rhodnius prolixus*) de quinto estágio, como pode-se identificar na Figura 3-14, foram retirados de uma colônia no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia dos insetos, na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Brasil. Eles foram mantidos a uma temperatura de 28 °C e com umidade relativa entre 60% e 70%. Os insetos foram alimentados com sangue de coelho usando um aparelho artificial como foi descrito por GARCIA, et al. (1984).

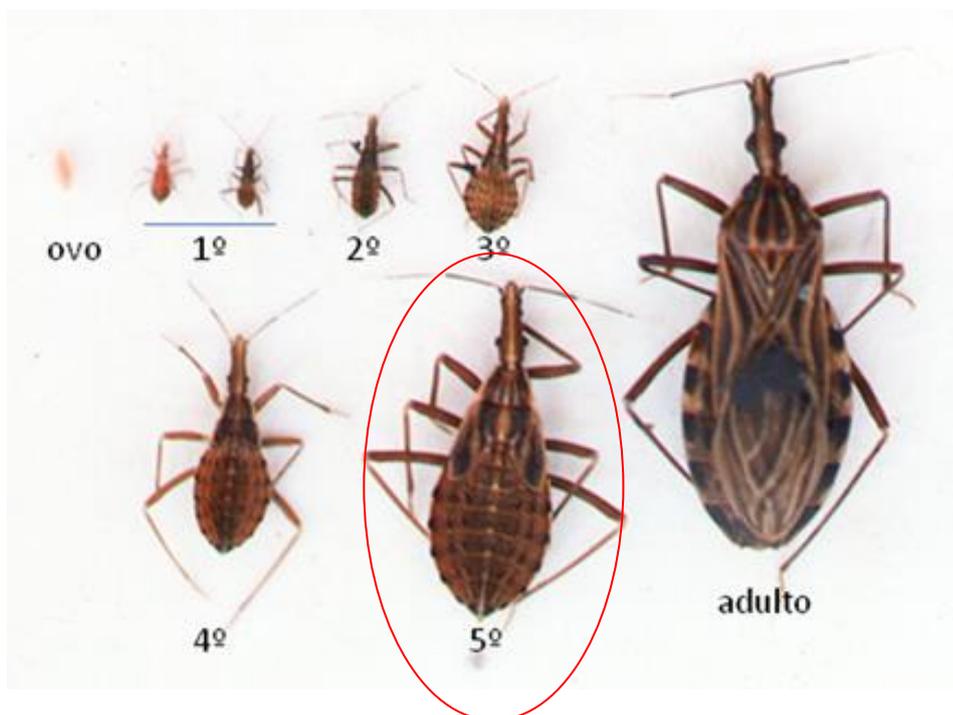


Figura 3-13: Os seis diferentes estádios do *Rhodnius prolixus*, com destaque para o quinto que é o utilizado neste trabalho.

Três diferentes grupos de insetos foram utilizados, um grupo foi alimentado e 4 dias após a alimentação foi sacrificado, o outro grupo foi sacrificado 10 dias após a alimentação e o terceiro grupo estava em jejum. Neste trabalho, os insetos em jejum são aqueles que passaram do estágio de quarta ninfa para quinta ninfa e não foram alimentados após passarem para o quinto estágio.

Os insetos foram cortados transversalmente na região entre o prototórax e o segmento mesotórax como pode ser visto na Figura 3-14. As amostras foram fixadas em

uma solução fixadora a 1% sacarose, em 5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4.



Figura 3-14: Quinta ninfa de Rhodnius prolixus mostrando a região de corte entre o prototórax e mesotórax.

Para a microtomografia as amostras foram deixadas secar por 24h para evitar que ocorresse perda de água durante as medidas.

CAPÍTULO IV

IV RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi comprovado que mais uma vez a microtomografia utilizando radiação síncrotron e contraste de fase se mostrou uma excelente técnica para o estudo das estruturas internas e externas do *Rhodnius prolixus*.

Os primeiros trabalhos utilizando microtomografia com radiação síncrotron e contraste de fase no *Rhodnius prolixus* (ALMEIDA et al., 2012, 2013, 2014) utilizavam uma resolução de 4,5 μm e um feixe monocromático. Nestes trabalhos, foi possível identificar grande parte das estruturas internas desse inseto, incluindo o *protocerebrum*, que é uma das principais estruturas a ser estudada neste inseto. Porém, pelo fato de mostrar um grande número de estruturas, essas imagens obtidas nos primeiros trabalhos não permitem que algumas estruturas sejam vistas de uma forma individual, o que para alguns trabalhos pode ser um problema, já que na literatura existem muitos trabalhos que estudam estruturas de insetos individualmente (KAISER, 2007; LOCKE, 1958; SNELLING, 2011; WIGGLESWORTH, 1990, 1991; CLARK, 1963; SMITH, 1979), como a faringe e a traqueia. Órgãos que são de grande importância no entendimento da evolução do *Rhodnius prolixus*.

Neste trabalho, a microtomografia com radiação síncrotron e contraste de fase foi realizada com uma resolução de 2 μm e feixe policromático. Apesar da alta resolução, muitas estruturas que eram vistas anteriormente, como o *protocerebrum*, não estão sendo identificadas, e isso pode ser consequência do feixe policromático utilizado para obtenção das imagens. Apesar de não ter sido possível a visualização de muitas estruturas nas imagens que foram obtidas neste trabalho, os sistemas digestivo e respiratório estão sendo mais bem visualizados, destacando-se estruturas como faringe e traqueia, o que é muito importante já que o sistema digestivo é parte do caminho do *Tripanossoma cruzi* e o sistema respiratório é essencial para a sobrevivência do inseto. (GONZALEZ, 2013)

Os resultados serão apresentados em duas partes, a primeira com algumas análises obtidas através das *slices* e a segunda com as imagens obtidas com o inseto em 3D.

IV.1 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS SLICES

Os primeiros resultados obtidos com este trabalho puderam ser observados antes mesmo que as imagens fossem observadas em 3D. Nos trabalhos anteriores não era possível identificar determinadas estruturas dos insetos nas slices, e com a resolução de 2 μm essas estruturas foram identificadas. Na Figura 4-1 foi possível identificar estruturas, como a *onmatidia*, os dutos da mandíbula, a faringe, o filamento axial e também o olho composto (SENA et al., 2014).

A observação das *slices* permitiu que fossem notadas diferenças na faringe dos diferentes grupos de inseto.

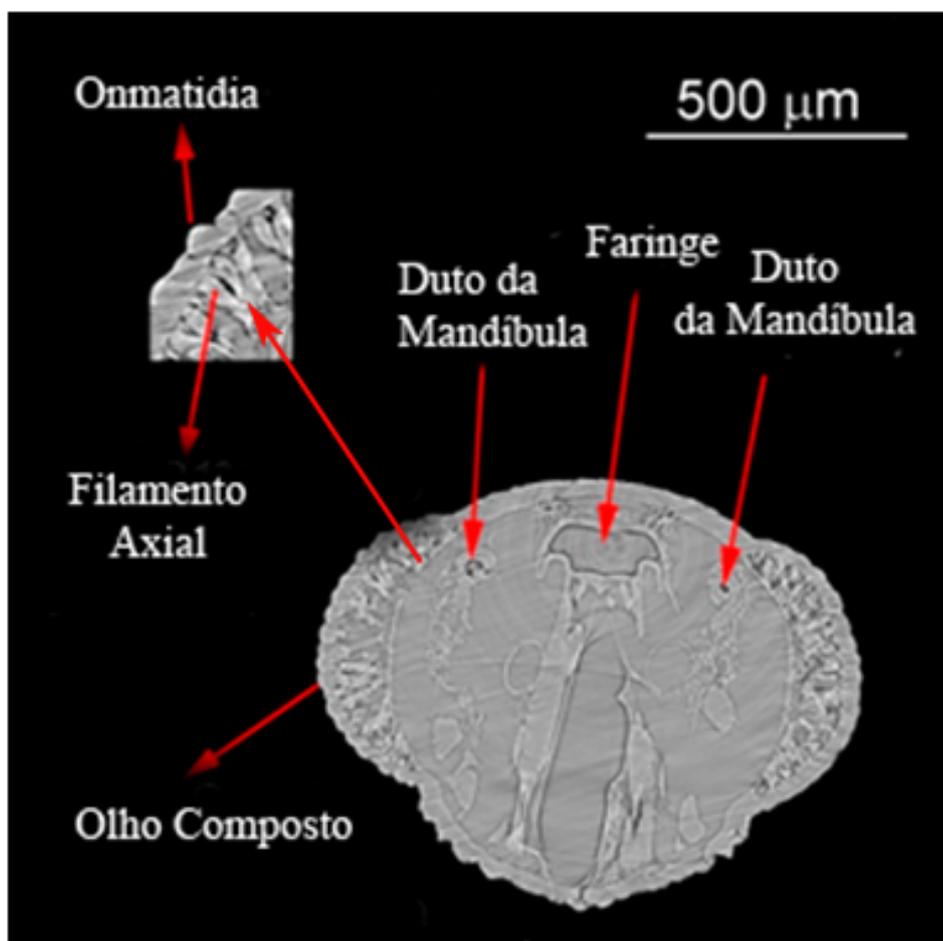


Figura 4-1: Na figura foi possível identificar estruturas, como a *onmatidia*, os dutos da mandíbula, a faringe, o filamento axial e também o olho composto.

Neste trabalho, foram estudados três grupos diferentes de *Rhodnius prolixus*: aqueles que foram alimentados e quatro dias após a alimentação foram sacrificados,

aqueles que foram sacrificados dez dias após a alimentação, e os que estavam em jejum. Para cada grupo de insetos a faringe foi observada de uma forma diferente.

Na figura 4-2a o inseto foi sacrificado 4 dias após a alimentação, e a faringe se encontra muito pouco dilatada. Na figura 4-2b o inseto foi sacrificado 10 dias após a alimentação e sua faringe se encontra um pouco mais dilatada que na figura 4-2a. Já na figura 4-2c o inseto se encontra em jejum e sua faringe se encontra muito mais dilatada que nas outras duas figuras. Os cortes das slices foram feitos exatamente nos mesmos lugares em todos os insetos estudados, e em todos eles foi observada a mesma situação.

Isso nos mostra que quanto mais tempo o inseto está sem se alimentar mais dilatada se encontra sua faringe.

Este tipo de visualização é muito interessante já que mostra que mesmo sem a imagem tridimensional é possível observar mudanças no interior dos insetos, e de uma forma não destrutiva.

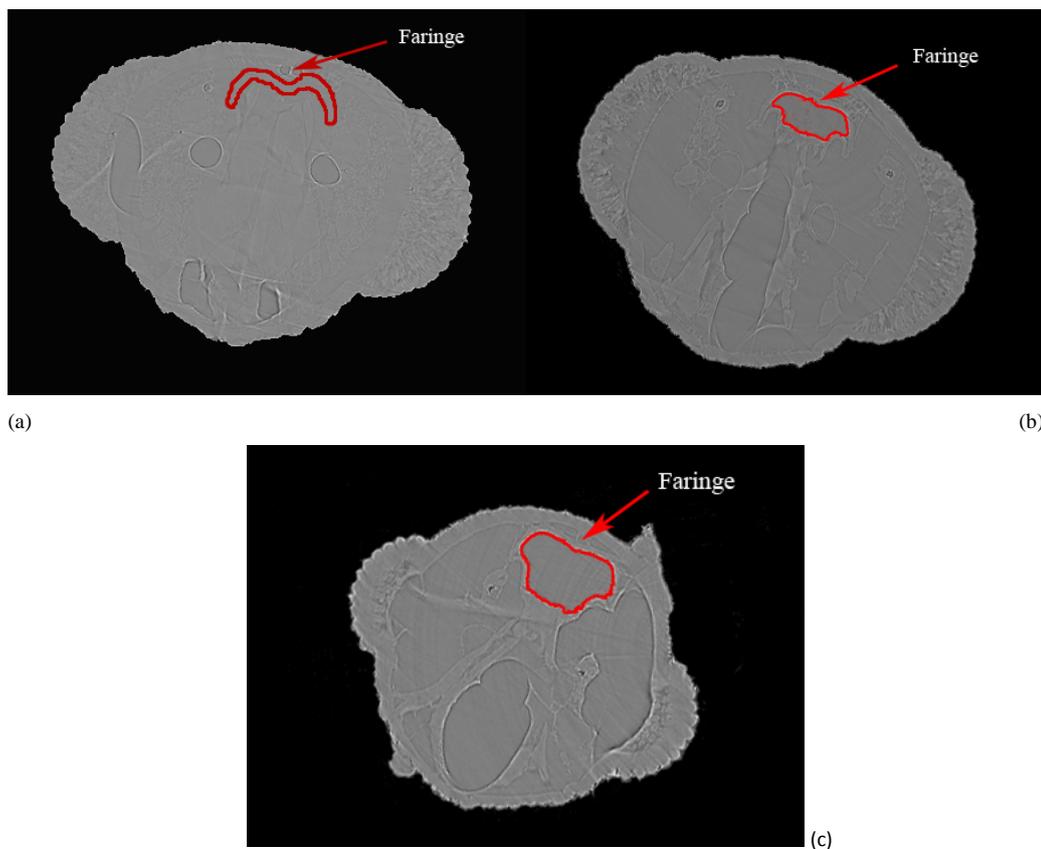


Figura 4-2: (a)Inseto sacrificado 4 dias após a alimentação com a faringe muito pouco dilatada, (b)inseto sacrificado 10 dias após a alimentação com a faringe mais dilatada que o inseto de 4 dias e (c)inseto em jejum com a faringe muito mais dilatada que nas outras duas situações

IV.2 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS IMAGENS 3D

Nas imagens obtidas em 3D muitas estruturas foram identificadas e algumas delas nunca haviam sido observadas anteriormente com a técnica de microtomografia. Todas as imagens obtidas em 3D são dos insetos em jejum, já que nessa fase é mais fácil a visualização das suas estruturas internas.

Observando as imagens em 3D obtidas com uma resolução de 2 μm e feixe policromático foi possível perceber que todas possuem o mesmo comportamento, as mesmas estruturas são vistas em todas as imagens, faringe, esôfago e traqueia. Todas essas estruturas são ricas em quitina, que é a parte mais densa do inseto (ALMEIDA et al., 2012, 2014). Além destas estruturas internas, também se destacam as estruturas externas também ricas em quitina, como as calosidades da gena. Esses resultados são consequência do uso do feixe policromático com radiação síncrotron que além de possibilitar o uso contraste de fase também realçou o contraste por absorção, fazendo com que o resultado final fosse uma composição dessas duas técnicas. O contraste de fase realça os tecidos moles, pouco densos, e o contraste por absorção realça aqueles tecidos com maior densidade.

Na figura 4-3 podemos visualizar um corte sagital da cabeça do *Rhodnius prolixus*, onde algumas estruturas podem ser perfeitamente visualizadas, como a faringe, o esôfago, e o duto salivar. Os músculos são visíveis, mas não de uma maneira bem definida, o que pode ter sido consequência do fato de não possuírem quitina. Nos trabalhos anteriores aqui citados, a faringe e o esôfago foram identificados, mas não estavam bem definidos, já que as imagens possuíam muita informação e se tornava difícil destacar esses órgãos, e agora, com esta técnica é possível observar perfeitamente a sua estrutura interna, e visualizar perfeitamente a junção da faringe com o esôfago. Isso pode ser muito útil nos trabalhos biológicos, já que esse é o caminho do *Tripanossoma cruzi*, e qualquer tipo de alteração e observação desses órgãos pode contribuir para o estudo da prevenção da Doença de Chagas.

O duto salivar é um órgão muito difícil de ser visualizado e nunca havia sido identificado em trabalhos de microtomografia com *Rhodnius prolixus*, apenas com microscopia eletrônica, que é uma técnica destrutiva.

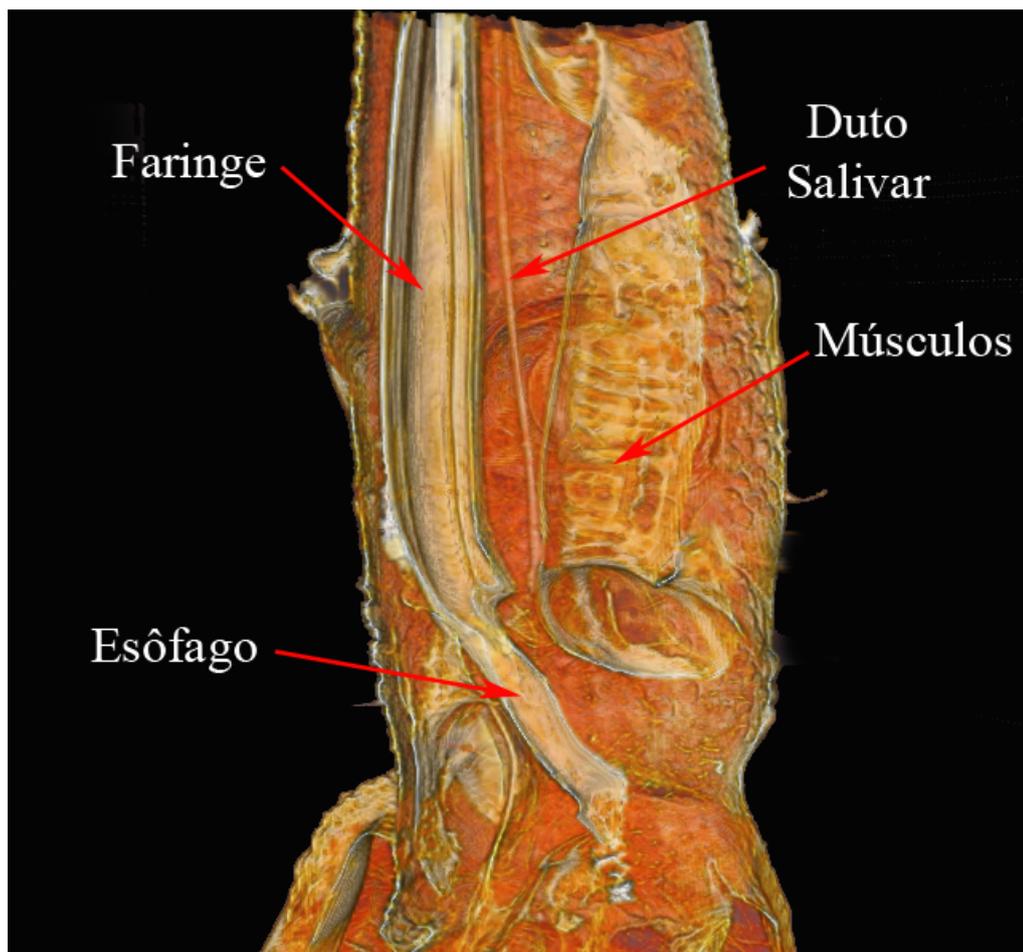


Figura 4-3: Corte sagital da cabeça do *Rhodnius prolixus* onde são identificados o esôfago, a faringe, o duto salivar e os músculos.

A Figura 4-4 mostra um corte sagital da cabeça do *Rhodnius prolixus*, onde mais uma vez a faringe e o esôfago estão bastante destacados, mas com um inseto diferente da Figura 4-3. Percebe-se claramente que nenhuma outra estrutura do inseto está bem definida. Os músculos novamente aparecem, mas de uma forma não muito clara, o que mostra que o que pode ser visualizado nas duas figuras são praticamente as mesmas estruturas, com um grande realce na faringe, no esôfago e nesta junção. Nesta Figura 4-4 o duto salivar não foi identificado.

Outra característica importante de se destacar nas Figuras 4-3 e 4-4 é que a região entre a parte interna e externa do inseto fica muito bem definida, como se neste local existisse uma “casca” que separa as duas regiões. Essa “casca” também possui muita quitina, ou seja, é muito densa.

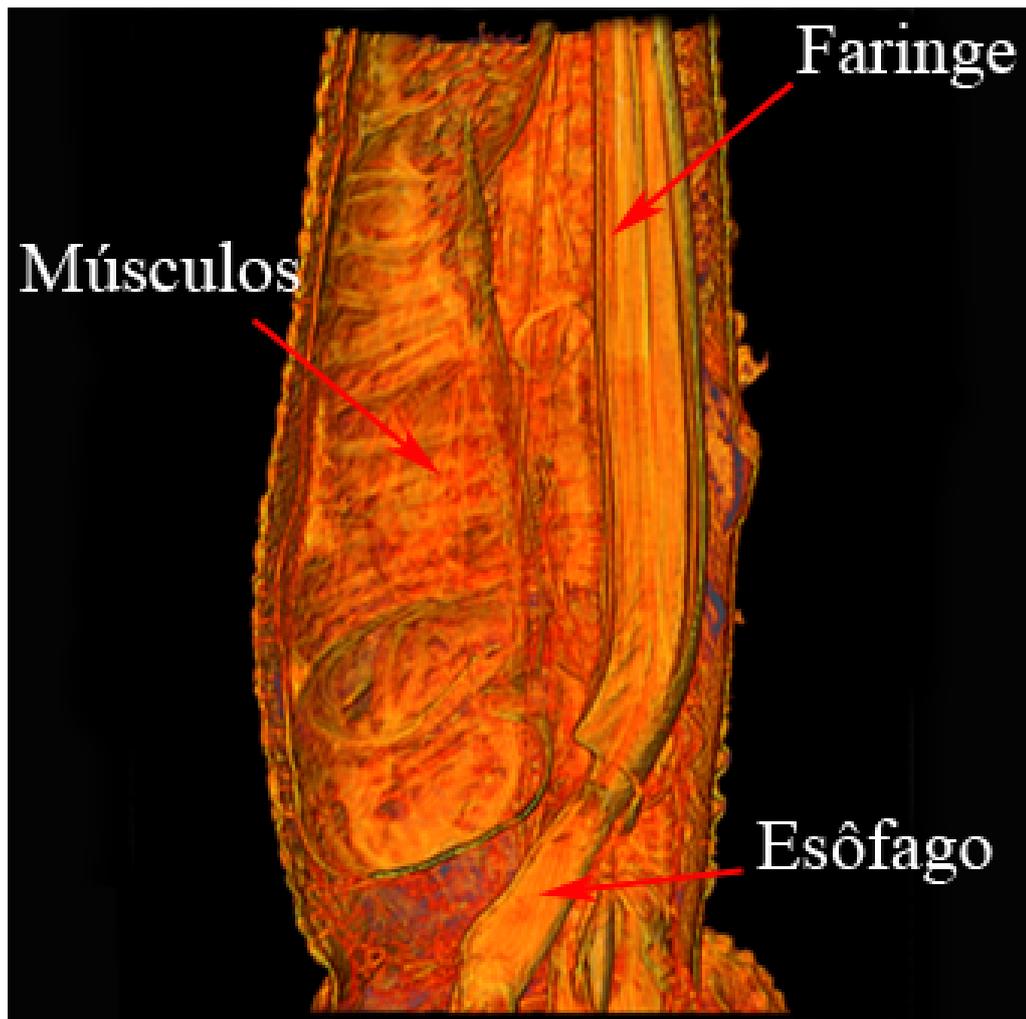


Figura 4-4: Corte sagital da cabeça do *Rhodnius prolixus* onde são identificados o esôfago, a faringe e os músculos.

Na Figura 4-5 pode-se visualizar um corte transversal da cabeça do *Rhodnius prolixus*, e nela pode ser identificado um órgão nunca visto antes com microtomografia, a traqueia. Este órgão é crucial para a sobrevivência do inseto, e muitos trabalhos na literatura estudam apenas o sistema respiratório dos insetos para entender o seu funcionamento (WIGGLESWORTH, 1990, 1991; SOCHA, 2010; SNELLING, 2011) Os insetos de uma forma geral possuem muita dificuldade de respirar e o estudo desse órgão é muito importante para entender sua evolução.

A traqueia é rica em quitina (KLAUDEN, 2007) e pode ser claramente identificada na Figura 4-5.

Além da traqueia é possível identificar o olho composto e também é nítido que toda a estrutura externa deste inseto fica muito bem definida, tornando possível uma

visualização das calosidades no interior do inseto. Novamente, as estruturas com quitina foram muito bem destacadas na imagem.

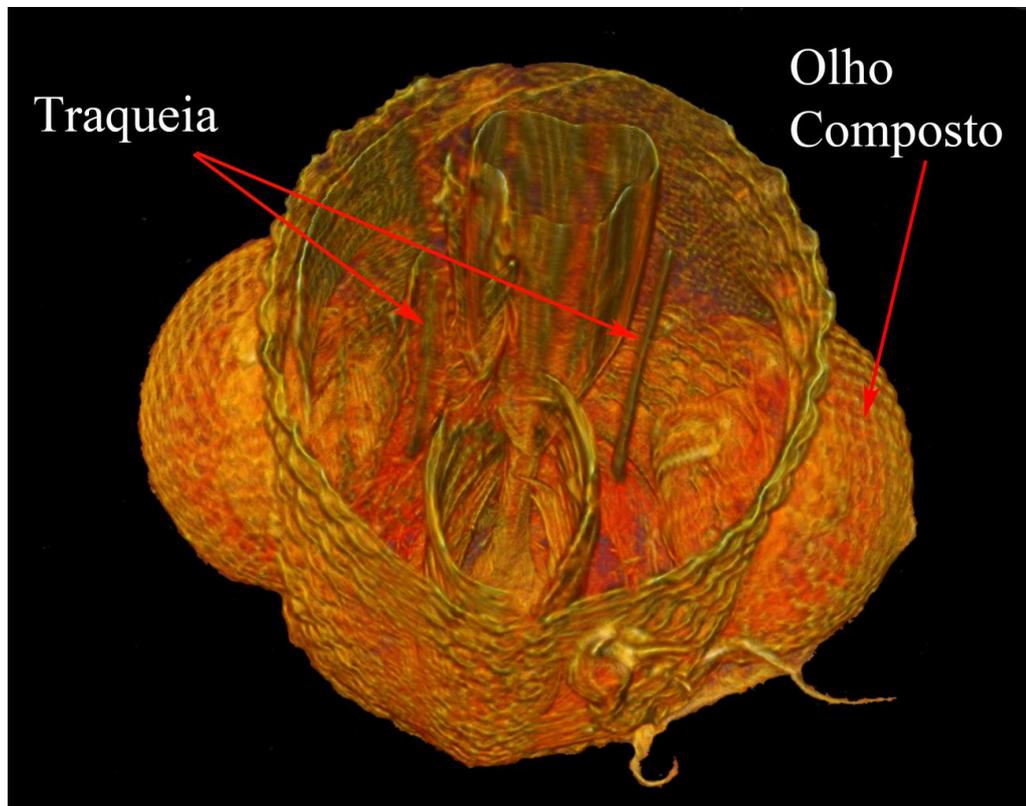


Figura 4-5: Corte transversal da cabeça do *Rhodnius prolixus*, onde podem ser identificados o olho composto e a traqueia.

Na Figura 4-6 o comportamento das imagens continua sendo o mesmo das anteriores. As mesmas estruturas, como a traqueia, a faringe e o esôfago, continuam muito realçadas e muito bem definidas. Mas estruturas como o *protocerebrum*, que eram muito bem visualizadas em trabalhos com o feixe monocromático, não aparecem nessas imagens.

Nesta Figura 4-6 as calosidades também estão muito destacadas reforçando cada vez mais a ideia de que as estruturas com quitina são as mais bem identificadas com esta técnica. Claramente percebe-se que é possível destacar a traqueia e a faringe do resto do inseto já que não existem outras estruturas impedindo sua visualização, o que não era possível com os outros trabalhos de microtomografia com *Rhodnius prolixus*.

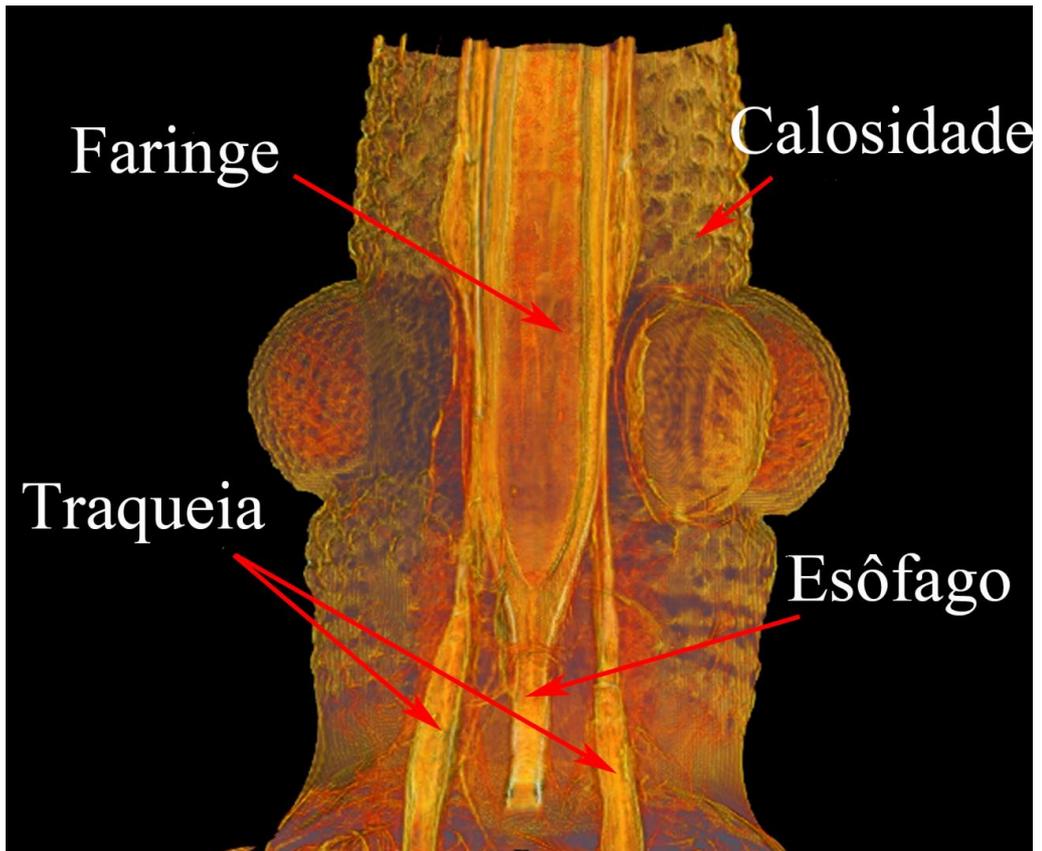


Figura 4-6: Corte longitudinal da cabeça do *Rhodnius prolixus* mostrando as calosidades, a faringe, a traqueia e o esôfago.

Na Figura 4-7 temos a visualização externa tridimensional da cabeça do *Rhodnius prolixus*. Toda sua estrutura externa se encontra muito bem definida, diferente das imagens obtidas em trabalhos anteriores. As calosidades da gena e o olho composto são muito bem identificados.

A visualização da parte externa deste inseto é importantíssima, já que através dela pode ser possível identificar gêneros distintos de *triatomíneos*. Toda a parte externa da cabeça do *Rhodnius prolixus* é rica em quitina (KLAUDEN, 2007).

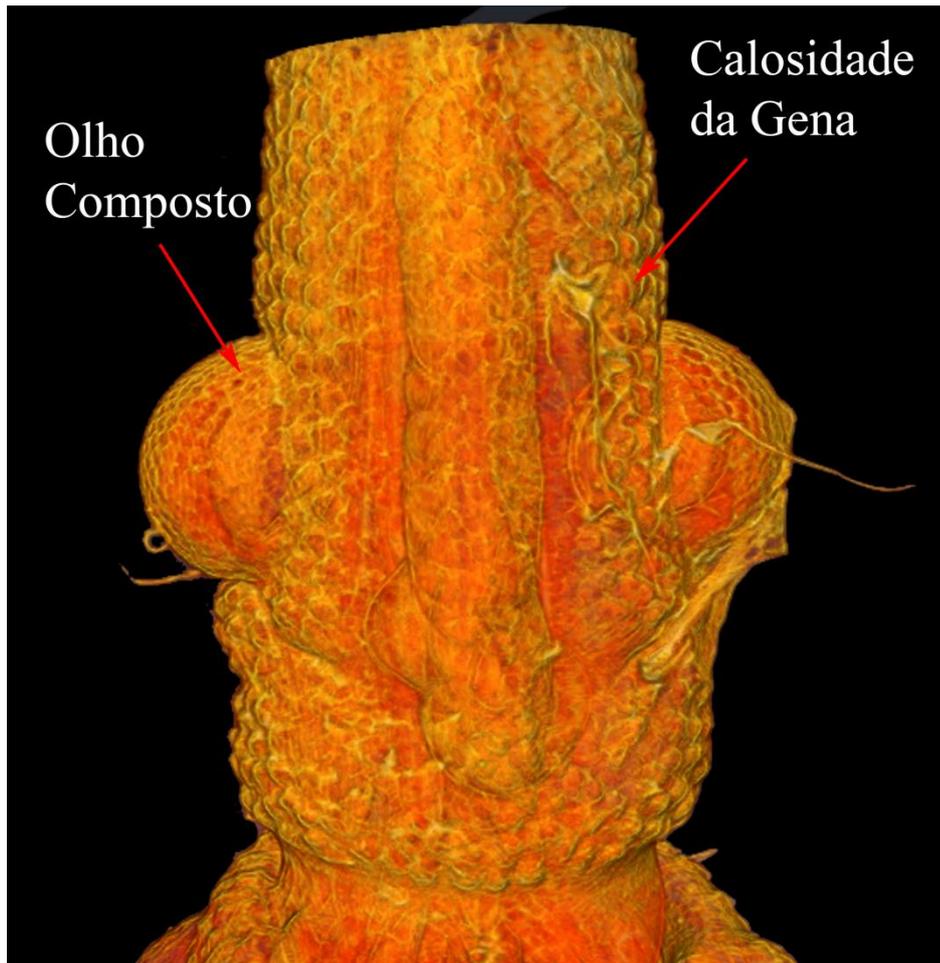


Figura 4-7: Imagem tridimensional da cabeça do Rhodnius prolixus

Na Figura 4-8 duas estruturas estão muito bem identificadas, o músculo retrator da mandíbula e a traqueia. Essa imagem mostra claramente que as duas estruturas podem ser visualizadas, e que as estruturas que foram vistas nas outras imagens é realmente a traqueia, e pode ser comprovado em et. al. (RAMIREZ, 1969). As calosidades também estão muito bem definidas nesta Figura 4-9.

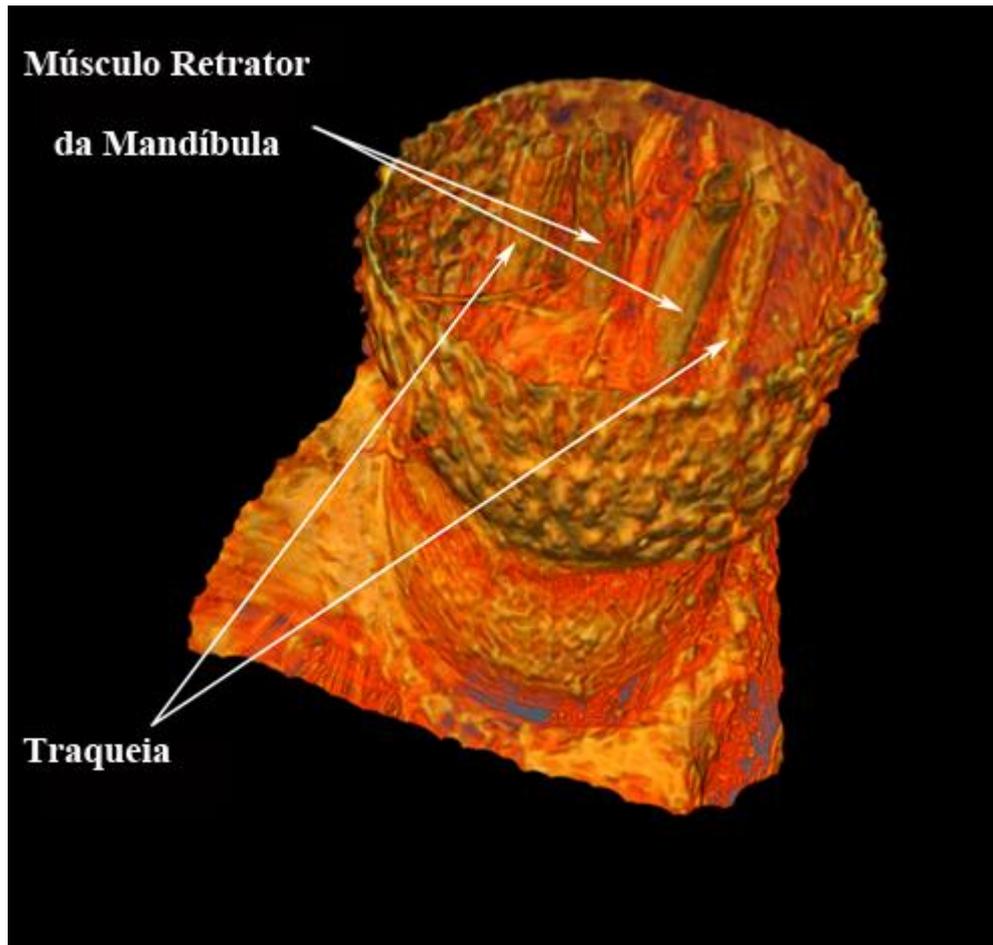


Figura 4-8: Corte transversal da cabeça do Rhodnius prolixus mostrando a traqueia e o músculo retrator da mandibular.

Como foi possível perceber através dos resultados deste trabalho, em todas as imagens as estruturas que foram destacadas foram sempre as mesmas, traqueia, faringe, esôfago e principalmente as calosidades. Todas essas se destacaram mais por serem muito densas e ricas em quitina.

CAPÍTULO V

V CONCLUSÃO

As imagens obtidas neste trabalho demonstraram mais uma vez que a microtomografia utilizando radiação síncrotron e contraste de fase é uma excelente ferramenta para o estudo do interior do *Rhodnius prolixus* de uma forma não-destrutiva.

Os resultados mostraram detalhes de estruturas e órgãos que nunca haviam sido visualizados com a técnica de microtomografia. Nos primeiros trabalhos usando SR-microCT em *Rhodnius prolixus* (ALMEIDA et al., 2012, 2013, 2014) as imagens mostraram um número maior de estruturas, o que é muito útil para entender como é a organização das estruturas internas deste inseto, porém, este tipo de visualização não facilita o isolamento de uma estrutura específica como por exemplo a traqueia e a faringe. Já com as imagens obtidas neste trabalho se torna muito mais fácil identificar separadamente a traqueia e a faringe, que são órgãos muito estudados em trabalhos com insetos e que nunca haviam sido vistos com tantos detalhes no *Rhodnius prolixus*.

O principal fator que permitiu uma visualização muito destacada de determinadas estruturas foi o uso do feixe policromático. O uso deste tipo de feixe pode gerar artefatos indesejáveis nas imagens e também pode prejudicar a formação do contraste de fase, contudo, neste trabalho ele permitiu que as estruturas mais densas existentes no *Rhodnius prolixus*, que são aquelas ricas em quitina, se destacassem muito mais que as outras. Isso ocorre porque a energia média do feixe é geralmente mais alta que a energia utilizada num feixe monocromático. O resultado final obtido, pode ser considerado uma combinação de contraste de fase com contraste por absorção. Essa combinação pode ser muito importante, já que muitos insetos são ricos em quitina, e conhecendo a formação de cada uma das suas estruturas, pode-se escolher entre o feixe monocromático, que vai realçar várias estruturas incluindo os tecidos muito pouco densos, ou pode-se optar pelo feixe policromático mais energético, que irá realçar as estruturas mais densas no *Rhodnius prolixus*.

Outro fator importante neste trabalho, foi que a resolução de 2 μm ajudou na visualização de duas estruturas que nunca haviam sido visualizadas antes com microtomografia computadorizada, o duto salivar e a traqueia.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que vários fatores podem melhorar as imagens obtidas através da técnica de microtomografia. Inicialmente quando o estudo começou a ser feito, esperava-se que a resolução fosse o principal fator que iria influenciar nos resultados de uma forma positiva. O feixe policromático foi usado apenas porque a linha de microtomografia do ELETTRA que possibilitava uma resolução de 2 μ m só funcionava com esse tipo de feixe. Apesar de o feixe policromático atrapalhar alguns fatores, ele mostrou que pode ser útil em algumas situações e que nem sempre sua utilização deve ser substituída pelo feixe monocromático.

Muitos testes podem ser feitos com o objetivo de melhorar a técnica de microtomografia aplicada a insetos, e este trabalho poderá ser usado como base para testes futuros.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P., SOARES, J., MENESES, A. A. M et al., 2012 "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., 2012 "Application of the SRPhC- 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 2013 "Microtomografia usando recuperação de fase como ferramenta de avaliação e determinação das estruturas internas do *Rhodnius prolixus*" COPPE/UFRJ 1-97
- 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
- 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.
- 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.Q., HÖRNSCHEMEYER T. 2008 "On the head morphology of Tetraphalerus, the phylogeny of Archostemata and the branching events in Coleoptera". Cladistics, 24:270-298.
- BRUNKE, O., BROCKDORF, K., DREWS, S., et al., 2008 "Comparison between x-ray tube-based and synchrotron radiation-based μ CT", Developments in X-Ray Tomography VI, edited by Stuart R. Stock, Proceedings of SPIE, Vol. 7078.

CLARK, B. 1963 "The control of meal size in the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*", J. Exp. Biology, 40, 741-750.

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.

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.

GONZALEZ, M., SOUZA, M., GARCIA, E., 2013 *Trypanosoma cruzi* TcSMUG L-surface Mucins Promote Development and Infectivity in the Triatomine Vector *Rhodnius prolixus*, PLOS Neglected Tropical Diseases, 7, 1-10.

GUREYEV TE, STEVENSON, PAGANIN D, et. al., 2000 "Quantitative methods in phase-contrast x-ray imaging", J Digit Imaging, 13 (Suppl 1): 121–126.

GUREYEV TE, MAYO S, WILKINS SW, PAGANIN D, et. al. 2001 "Quantitative in-line phase-contrast imaging with multienergy x rays" Physical review letters 86 (25), 5827

HERMAN, G. T., 1980 "Image Reconstruction from Projections. The Fundamentals of Computerized Tomography", New York-London, Academic Press

HOHEISEL M.; BERNHARDT P.; LAWACZECK R.; et. al. 2006 "Comparison of Polychromatic and Monochromatic X-rays for Imaging". Medical Imaging 6142 614209-1

HOUNSFIELD G N 1973 "Computerized transverse axial scanning (tomography) - Description of the system" Br J Radiol 46:1016–1022

INGOLD C., Introduction in Power Diffraction, Fevereiro, 2000 Disponível em: <<http://pd.chem.ucl.ac.uk/pdnn/inst2/work.htm>>. Acesso em: 12 de janeiro. 2014.

KAISER, A., KLOK, C., SOCHA, J., 2007 "Increase in tracheal investment with beetle size supports hypothesis of oxygen limitation on insect gigantism", National Acad Sciences, 32, 13198-13203

KETCHAM, R.A., AND HANNA, R.D. 2014 "Beam hardening correction for X-ray computed tomography of heterogeneous natural materials" Computers & Geosciences, 67, 49-61.

KLAUDEN M. J. 2007 "Physiological systems in insects". University of Idaho, Second edition, 1-699

KONSTANTIN I. 2004 "Development of X-ray Phase Contrast and Microtomography Methods for the 3D Study of Fatigue Cracks", Georgia Institute of Technology.

LANDIS E. N., KEANE D. T. 2010 "X-ray microtomography", Materials Characterization, 61(12), 1305-1316

LAK J., NÉRAUDEAU D. , NEL A., et. al. 2008 "Phase Contrast X-Ray Synchrotron Imaging: Opening Access to Fossil Inclusions in Opaque Amber". Microsc Microanal. 14(3) 251-9

LOCKE, M., 1958 "The Formation of Tracheae and Tracheoles in *Rhodnius prolixus*", University College of the West Indies, 29-46.

MAYO, SHERIDAN C.; STEVENSON, et. al. 2012 "In-Line Phase-Contrast X-Ray Imaging and Tomography for Materials Science" 5, 937-965

MIZUTANI, R., SUZUKI, Y., 2012 "X-ray microtomography in biology", Micron, 43, 104-115

NOGUEIRA, L. P. 2011 "Microtomografia computadorizada e fluorescência de raio X por luz síncrotron para avaliação dos efeitos da radiação em microestruturas ósseas de ratos", COPPE/UFRJ 1-105

NUGENT, K. A., T.E. GUREYEV, D.J. COOKSON, et. al. 1996 "Quantitative phase imaging using hard X rays," Phys. Rev. Lett. 77, 2961-2964

ORCHARD, I., STEEL, C.G.H., 1980 "Electrical activity of neurosecretory axons from the brain of *Rhodnius prolixus*: relations of changes in the pattern of activity to endocrine events during the moulting cycle". Brain Res. 191, 53–65.

PAI, S. A. 2002 "X-ray microtomographic analysis for identification of cotton contaminants", Texas Tech University, 1-186

PAIVA, LYNCH J., ROSENBERG E., et. al. 1998 "A beam hardening correction for X-ray microtomography". NDT & E International, 31 16-22

WILLMOTT P 2011 "An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications", John Wiley & Sons, Ltd , 1-352

RACK, A., STILLER, M., DALÜGGE, O., 2011 "Developments in High-Resolution CT: Studying Bioregeneration by Hard X-ray Synchrotron-Based Microtomography". Comprehensive Biomaterials. 3, 47-62.

RAMÍRES-PÉREZ, J., 1969 "Estudio sobre la anatomía de *Rhodnius prolixus*". Rev. Venez Sanid. Assist Soc. 34 11-98

ROSA, J., BARATA, J., CILENSE, M., et. al. 1999 "Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae)". International Journal of Insect Morphology and Embryology 28, 363-375

RUSS J., 2011 "The Image Processing Handbook", Sixth Edition Hardcover, CRC Press.

SENA, G.; ALMEIDA, A. P.; BRAZ, D.; et al, 2014 "Phase Contrast X-Ray Synchrotron Microtomography for Virtual Dissection of the Head of *Rhodnius prolixus*" , Journal of Physics: Conference Series 499

SMITH, J. 1979 "Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus* ", J. Exp. Biology. 82, 93-104.

SNELLING, E.P., SEYMOUR, R.S., RUNCIMAN, S., 2011. "Moulting of insect tracheae captured by light and electron-microscopy in the metathoracic femur of a third instar locust *Locusta migratoria*". J Insect Physiol. 57(9): 1312-6.

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

SOCHA, J., FORSTER, T., GREENLEE, K., 2010 "Issues of convection in insect respiration insights from synchrotron X-ray imaging and beyond", *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 173, S65-S73.

SOCHA, J.J., WESTNEAT, M. W., HARRISON, J. F., et al., 2007 "Real-time phasecontrast X-ray imaging: a new technique for the study of animal form and function". *BMC Biol.* 5, 6.

A.W. STEVENSON, T.E. GUREYEV A, D. PAGANIN A,B, et al, 2003 "Phase-contrast X-ray imaging with synchrotron radiation for materials science applications" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 199 427–435

TANG Z., HU G. 2011 "Dual Energy CT Imaging in Cone-Beam Micro-CT for Improved Attenuation Coefficient Measurement", *Tsinghua Science and Technology*, 16(4), 352-357.

WESTNEAT M. W, BETZ O., BLOB R. W., et. al. 2003 "Tracheal Respiration in Insects Visualized with Synchrotron X-ray Imaging", *Science* 299 558-560

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.

WHO. World Health Organization, 2013. Control of Chagas Disease.

WIGGLESWORTH, V.B., 1990 "The properties of the lining membrane of the insect tracheal system". *Tissue Cell.* 22(2):231-8.

WIGGLESWORTH, V.B., 1991 "The distribution of aeriferous tracheae for the ovaries of insects". *Tissue Cell.* 23(1):57-65

WILKINS S W, GUREYEV T E, GAO D, POGANY A, STEVENSON A W 1996 "Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays" *Nature* 384 (6607), 335-338

ZHANG, K., LI, D., ZHU, P., et al., 2010 "3D visualization of the microstructure of *Quediusebesoni* Cameron using micro-CT". *Anal. Bioanal. Chem.* 397,2143–2148.

ANEXO A

Phase Contrast X-Ray Synchrotron Microtomography for Virtual Dissection of the Head of
Rhodnius prolixus

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

2014 J. Phys.: Conf. Ser. 499 012018

(<http://iopscience.iop.org/1742-6596/499/1/012018>)

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

Download details:

IP Address: 177.192.105.171

This content was downloaded on 30/04/2014 at 11:45

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

Phase Contrast X-Ray Synchrotron Microtomography for Virtual Dissection of the Head of *Rhodnius prolixus*

G Sena¹, A P Almeida¹, D Braz¹, L P Nogueira², M V Colaço², J Soares², S C Cardoso³, E S Garcia⁴, P Azambuja⁴, M S. Gonzalez⁵, S Mohammadi^{6,7}, G Tromba⁷ and R C Barroso²

¹ COPPE/Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

² Medical Physics Laboratory/Physics Institute/State University of Rio de Janeiro, Brazil

³ Physics Institute/Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Laboratory of Biochemistry and Physiology of Insects/Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Brazil

⁵ Department of General Biology/Federal University Fluminense, Brazil

⁶ Department of Physics, University of Trieste, Italy

⁷ Elettra - Sincrotrone Trieste ScpA, Trieste, Italy

E-mail: apalmeid@gmail.com

Abstract. Phase Contrast X-Ray Synchrotron Microtomography is a non-destructive technique that allows the microanatomical investigations of *Rhodnius prolixus*, one of the most important insect vectors of *Trypanosoma cruzi*. In this work complete series of virtual thin sections through the heads of selected *Rhodnius prolixus* were obtained. The sections of the head were important to compare the difference in use the spatial resolution of 2 μ m or 4.5 μ m and to see anatomical details that couldn't be seen with other technique. Three different groups of *Rhodnius prolixus* were used. One group was fed with defibrinated rabbit blood and after 10 days was sacrificed, other group was sacrificed 4 days after feeding and the last group remained unfed. The results show some differences for each kind of groups and for the different resolutions.

1. Introduction

Conventional X-ray computed tomography (CT) is based on the difference in radiation absorption by different materials or tissues. At the same time, a wide range of samples used in materials science, biology, and medicine demonstrate very weak absorption contrast, nevertheless producing significant phase shifts in the X-ray beam. The use of phase information for imaging purposes is therefore a suitable alternative.

Application of X-ray microtomography (μ CT) on insects is quite recent [1, 2, 3, 4, 5] and its transposition to use phase-contrast synchrotron X-ray microtomography is even more recent [6, 7, 8, 9]. Phase contrast X-ray imaging is already shown to be useful to study other insects within different matters.

Members of the subfamily *Triatominae*, family *Reduviidae*, are an interesting group to study for comprising a large number of insect species of which some are vectors of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Rhodnius prolixus* is a blood-sucking insect well known by for its



importance as vector of Chagas disease, especially in Latin 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 [10].

Despite the fact that the *R. prolixus* is one of the most well-know model in terms of both physiology and vector-parasite interactions studies, the understanding of 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 remains remarkably limited. Head morphology is also largely unknown, especially internal features. It was demonstrated in earlier studies that head structures are not only of great importance in terms of coordination of the central nervous system, sensory perception, and food processing, but also provide much phylogenetic information due to their complexity [3].

The demand for this kind of investigation is increasing with the necessity to find new vector control methods. The present study aimed to visualize three-dimensional structures at micrometer scale of the head of *R. prolixus* defining their precise spatial relationships, variations in size, shape and proportion of individual structures.

This work is part of a series of articles that use Synchrotron Radiation Phase Contrast microtomography (SR-PhC- μ CT) for the study of *R. prolixus* morphology. In the first paper [11] 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 the second study [12] the same data set have been revisited with application of a single distance phase retrieval algorithm for comparison with previous results. 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 *R. prolixus*.

In the present work, the μ CT images were obtained using the new experimental set-up which was recently made available at the SYRMEP beamline [13] and these images were compared to those used in the first and second papers. The new set-up uses the polychromatic configuration. In this configuration the outgoing beam from the ring is intercepted before the monochromator and in a dedicated end-station, absorption and phase contrast radiography and tomography set-up are available. A 2 μ m resolution was achieved in the μ CT images with the set-up used for these analyses. The images obtained with the new set-up at SYRMEP beamline provided a better visualization of virtual sections of the head of *R. prolixus*.

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 with rabbit blood using a membrane apparatus previously described by Garcia et al. [14]. 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 (gluteraldehyde) and maintained at room temperature.

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. This procedure is usual in studies with insects [2, 3, 5, 9]. All specimens (n = 5) were imaged.

2.2. Experimental set-up at SYRMEP beamline

The first microCT images of the entire internal anatomy of the head of specimens of *R. prolixus* were obtained using the microCT setup at the SYRMEP (Synchrotron Radiation on Medical Physics) beamline of the ELETTRA synchrotron radiation facility (Trieste, Italy). The experimental station is placed about 23m and at this distance, the beamline provides a monochromatic laminar-section X-ray with a maximum area of about 160x5 mm² at 20 keV. The detector system is comprised of a 12/16-bit CCD camera, with 4008 x 2672 pixels², 4.5 μm pixel size with a field of view of 18x12 mm², coupled to an intensifier screen with no magnification (1:1).

To gather as much information as possible from the specimens of *R. prolixus*, we decided to use the new high-resolution microCT setup which has been recently available at the SYRMEP for this study. In order to optimize the performances of the microCT setup for high resolution experiments in the SYRMEP beamline, a lens-coupled CCD camera system (high-resolution 2048 x 2048 pixels², effective pixel size of 1.03 μm) designed to achieve up to 2 μm spatial resolution was used in white/pink X-ray beam mode that provides a nearly parallel, laminar-section X-ray beam with a maximum area of 100x6 mm² at a distance of about 15 m from the source. Although monochromatic beam was not possible to be used in this high-resolution setup at SYRMEP beamline, physics filters of Si (1 mm) and Mo (0.025 mm) were used to minimize beam-hardening. Another advantage of using this new setup was the faster acquisition time achieved. For our experiments, 1440 radiographic projections were acquired over an angular range of 180° with angular step of 0.125°.

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. ImageJ® software was used to render the 3D volumes.

3. Results and discussions

Morphological studies on insects often focus on a detailed analysis of the head or parts of it. The insect head shows a broad spectrum of structures, such as sensory organs, endo and exo skeletal features, muscles, brain or mouthparts, whose specific organization can act as an aid to understanding the evolution, development and ecology of the insect under study [15, 16, 17]. In this work, we obtained complete series of virtual thin sections through the heads of selected *Rhodnius prolixus*; these could be used both for the inspection of planar sections and for 3D reconstructions of the entire head. In figure 1, it can be seen anatomical details of the compound eyes such as ommatidia and the axial filament, which could not be revealed from our previous images [11, 12].

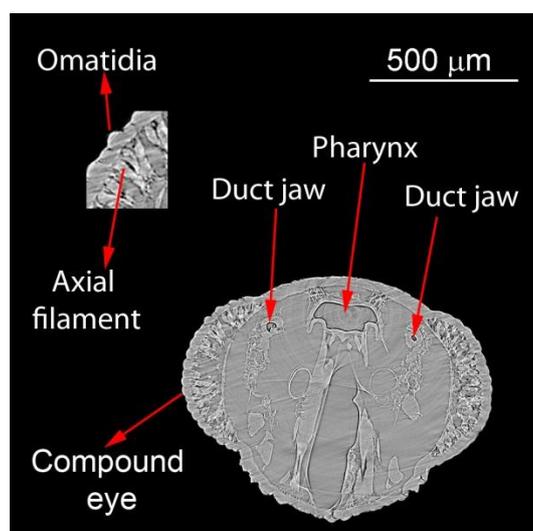


Figure 1. Virtual section (transversal view) through the head of *R. prolixus*.

The pharynx and its dilator muscles were recognized in figures 2 to 4. Variation in size of pharynx can be noted in different times after feeding.

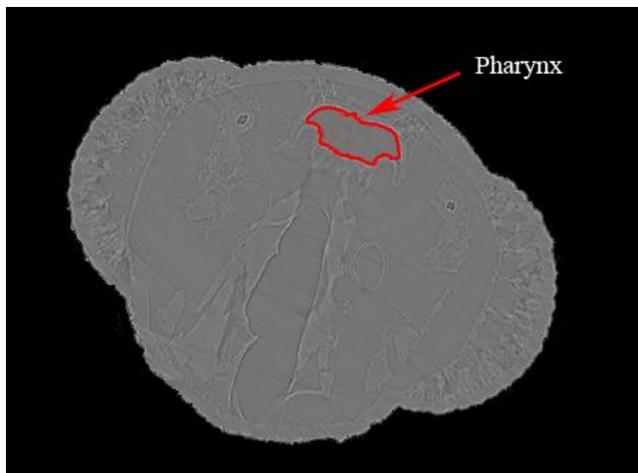


Figure 2. 3D rendering of the head of *R. prolixus* sacrificed 10 days after feeding.

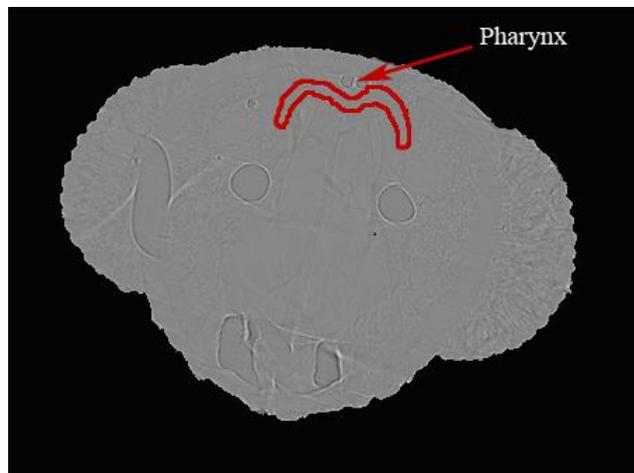


Figure 3. 3D rendering of the head of *R. prolixus* sacrificed 4 days after feeding.

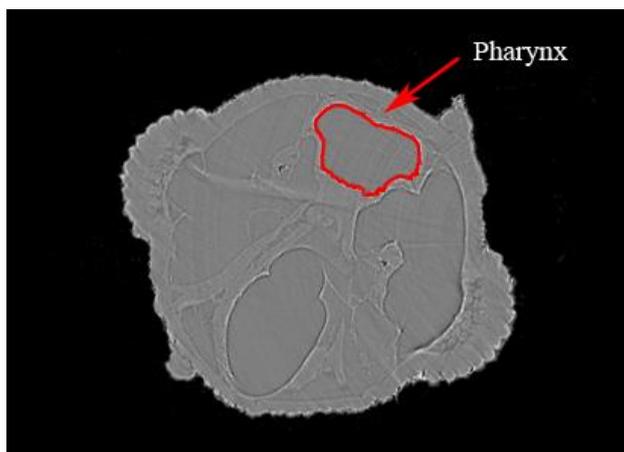


Figure 4. 3D rendering of the head of unfed *R. prolixus*.

Comparing this images one can realize that the muscles of unfed *R. prolixus* (figure 5) are thinner than the muscles in figures 3 and 4. Pharynx in unfed insects seems more dilated than in insects that were sacrificed 10 days after feeding.

In figures 5 and 6 it can be seen a virtual thin section of the head of *Rhodnius prolixus* obtained previously with the conventional setup at SYRMEP beamline [ARTIGOS ALMEIDA]. Comparing with figures 3 and 4 it is easy to realize that figures 6 and 7 do not show details seen in figures 2 and 3. The virtual thin sections are approximately in the same region.

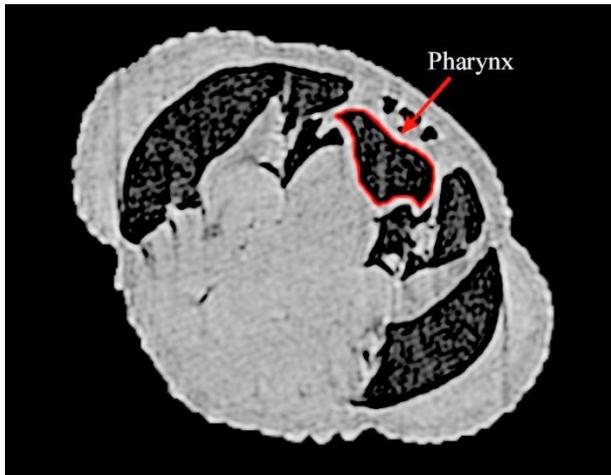


Figure 5. 3D rendering of the head of *R. prolixus* sacrificed 10 days after feeding.

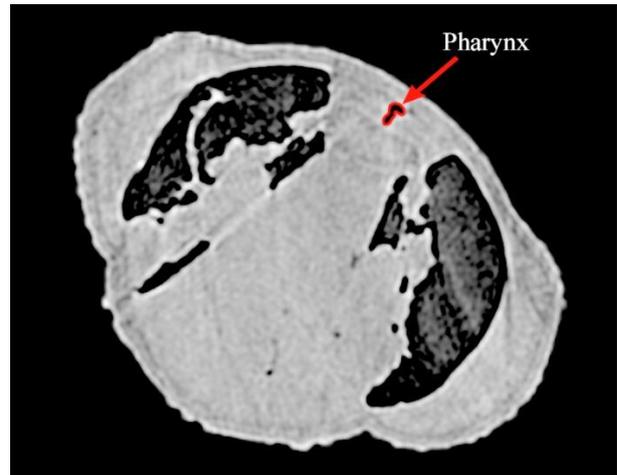


Figure 6. 3D rendering of the head of *R. prolixus* sacrificed 4 days after feeding.

External morphological features such as individual facets of the composed eyes and the detailed rugose cuticular features of the head capsule could be clearly visualized in figure 7.

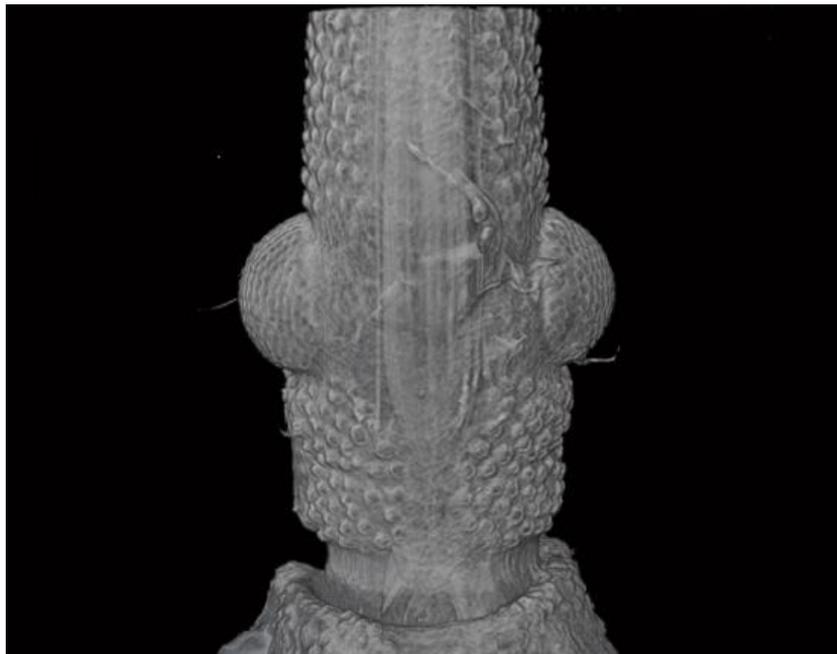


Figure 7. Volume-rendered SR-PhC- μ CT image of *R. Prolixus*.

4. Conclusions

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 and is a non-destructive technique.

There is not any available vaccine to prevent from Chagas disease, so depending on the region, key tools are vector control, house improvement such as plastered walls, cement floors, corrugated-iron roofs and personal preventive measures. Anyway, controlling the transmission of *Trypanosoma cruzi* by means of its vector insect is much more efficient. In previous studies it has been shown that the control of *Trypanosoma cruzi* relies on the study of the head of *R. prolixus* and its structures. So, high resolution images from internal structures of the head of *R. prolixus* could be of great importance for biology and medicine to understand the main structures where *Trypanosoma cruzi* passes by.

Acknowledgments

We warmly thank Nicola Sodini from the SYRMEP beamline for their invaluable help during the experiment. These images were obtained during a visit (R.C.B.) within the Associate Scheme of the Abdus Salam International Center for Theoretical Physics (ICTP).

References

- [1] Mizutania R, Suzuki Y 2012 *Micron* 43 104-115
- [2] Hornschemeyer T, Goebels J, Weidemann G 2006 *J. Entomol* 103 409-423
- [3] Beutel R G, Ge S, Ho T, Hornschemeyer T 2008 *Cladistics* 24 270-298
- [4] Eberhard M J B, Lang D, Metscheret B 2010 *Arthropod Struct Dev* 39 230-241
- [5] Zhang K, Li D, Zhu P 2010 *Bioanal Chem* 397 2143-2148
- [6] Jakubeka J, Granja C, Damme J 2007 *Nucl. Instrum. Meth. A* 571 69-72
- [7] Westneat M W, Socha J J, Lee W K 2008 *Annu. Rev. Physiol.* 70 119-142
- [8] Heethoff M, Norton R A 2009 *Invertebr. Biol.* 128 332-339
- [9] Betz O, Wegst U, Weide D 2007 *J. Microsc.* 227 51-71
- [10] WHO-World Health Organization 2002 *Control of Chagas Disease*
- [11] Almeida A P, Braz D, Nogueira L P, Colaço M V, Soares J, Cardoso S C, Garcia E S, Azambuja P, Gonzalez M S, Mohammadi S, Tromba G and Barroso R C 2012 *JINST8C07004*
- [12] Almeida A P, Braz D, Nogueira L P, Colaço M V, Soares J, Cardoso S C, Garcia E S, Azambuja P, Gonzalez M S, Mohammadi S, Tromba G and Barroso R C 2013 *Radiation Physics and Chemistry* IN PRESS
- [13] Abrami A, Arfelli F, Barroso R C 2005 *Nucl. Instrum. Meth. A* 548 221-227
- [14] Garcia E S, Azambuja P, Forster H, Rembold H 1984 *Naturforsch* 29 1155-1158
- [15] Rembold H, Garcia E S 1989 *Naturwissenschaften* 76 77-78
- [16] Garcia E S, Azambuja P, Forster H, Rembold H 1984 *Naturforsch* 29 1155-1158
- [17] Gonzalez M S, Nogueira N F S, Mello C B, Souza W, Schaub G A, Azambuja P, Garcia E S 1999 *Experimental Parasitology* 92 100-108