

UTILIZAÇÃO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA COM FEIXE
DE RAIOS X CÔNICO PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO
VOLUME DA TRAQUEIA E FARINGE DO *RHODNIUS PROLIXUS*

Izabella Soares de 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

André Pereira de Almeida

Rio de Janeiro

Março de 2017

UTILIZAÇÃO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA COM FEIXE
DE RAIOS X CÔNICO PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO
VOLUME DA TRAQUEIA E FARINGE DO *RHODNIUS PROLIXUS*

Izabella Soares de 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. André Pereira de Almeida, D.Sc.

Prof. Edmilson Monteiro de Souza, D.Sc.

Prof. Marcos Vinicius Colaço Gonçalves, D.Sc.

Prof. Regina Cély Rodrigues Barroso, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2017

Souza, Izabella Soares de

Utilização da Microtomografia Computadorizada com Feixe de Raios X Cônico para Determinação Quantitativa do Volume da Traqueia e Faringe do *Rhodnius prolixus*/ Izabella Soares de Souza. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XII, 67 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Delson Braz

André Pereira de Almeida

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 50-67.

1. Microtomografia computadorizada. 2. Faringe 3. Traqueia. 4. *Rhodnius prolixus*. I. Braz, Delson *et al*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título

“Mas eu, quando estiver com medo, confiarei em ti.”

Salmo 56:3

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades.

Aos meus orientadores, professores, Delson Braz e André Almeida, pelo suporte, paciência e incentivos durante a caminhada.

A professora Regina Cély Barroso pelo incentivo e sempre me encorajar a superar cada desafio, e não esquecendo o excelente recebimento no Lab_FisMed da UERJ, sempre com braços abertos e ensinando o gosto pela pesquisa.

Ao professor Carlos Roberto Appoloni, pelo incentivo para aquisição das imagens microtomográficas.

Ao professor Liebert Nogueira, pela dedicação e por toda ajuda nas dúvidas sobre segmentação.

Ao professor Marcelo Gonzalez e a professora Patrícia Azambuja, pelo ótimo recebimento na FIOCRUZ, e também por fornecer as amostras necessárias para o prosseguimento da pesquisa.

As meus pais, e irmãos, Gabriella e Pablo, por sempre acreditaram em mim, e pela atenção, carinho e pelo apoio incondicional. E pela paciência nos dias de estresse, porém todas as conquistas não seriam possíveis sem vocês.

Ao meu amado noivo, Roderick, pelo carinho, apoio e incentivos, e também por ser o melhor companheiro, amigo, namorado e noivo do mundo.

A todos os amigos do Lab_FisMed (UERJ), Gabriela, Isadora, Arrissa, Carla, Andrea, Gabriel e Marcos, por toda a ajuda, conversas e risadas, deixando o trabalho muito mais leve e animado.

Aos meus amigos da UFRJ, Luis, Carlos, Pedro, Patrícia, Vitória, Eliane e Maíra pelas conversas, por me fazerem rir sempre e ao mesmo tempo pelo incentivo. Também aos amigos de Belém, que mesmo distante me fazem rir.

Às agências brasileiras, CNPq, CAPES e CNEN pelo auxílio financeiro.

À FIOCRUZ e ao Laboratório de Análise por Raios X (LARX) da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

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

UTILIZAÇÃO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA COM FEIXE
DE RAIOS X CÔNICO PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO
VOLUME DA TRAQUEIA E FARINGE DO *RHODNIUS PROLIXUS*

Izabella Soares de Souza

Março/2017

Orientadores: Delson Braz

André Pereira de Almeida

Programa: Engenharia Nuclear

Na última década, a microtomografia computadorizada usando radiação síncrotron tornou-se uma técnica poderosa para gerar imagens de alta resolução do *Rhodnius prolixus*. Imagens de tecidos moles (protocérebro e músculos) e estruturas densas (faringe, traqueia e esôfago) da cabeça do *R. prolixus* foram obtidas usando microtomografia com radiação síncrotron na configuração mono e policromática, respectivamente. Os avanços na microtomografia convencional aumentaram a resolução e o contraste alcançáveis, tornando essa tecnologia relativamente barata, amplamente disponível e potencialmente útil para estudos de morfologia interna dos insetos. O objetivo principal deste trabalho foi fornecer um novo conjunto de imagens microtomográficas de alta qualidade do *R. prolixus* usando microtomografia convencional, permitindo a visualização tridimensional de importantes estruturas quitinizadas: faringe e traqueias. Os volumes dessas estruturas foram avaliados quantitativamente em diferentes dias (1, 4, 10, 15 e 20) após a alimentação. Os resultados sugerem que a variação dos volumes médios pode ser atribuída ao pulso do hormônio 20-hidroxi-ecdisona (20-OH-Ec) aos 11 dias após a alimentação. Para faringe, o volume diminuiu 3,80 vezes. Por outro lado, os volumes traqueais aumentaram 1,78 vezes. O volume total da cabeça apresentou comportamento semelhante ao da traqueia.

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

X-RAY CONE BEAM MICROTOMOGRAPHY FOR QUANTITATIVE
ASSESSMENT OF TRACHEAL AND PHARYNGEAL VOLUMES OF *RHODNIUS*
PROLIXUS

Izabella Soares de Souza

March/2017

Advisors: Delson Braz

André Pereira de Almeida

Department: Nuclear Engineering

In the past decade microcomputed tomography imaging using synchrotron radiation has become a powerful technique to generate high resolution images of *Rhodnius prolixus*. Images of soft tissues (protocerebrum and muscles) and dense structures (pharynx, trachea and esophagus) of *R. prolixus* head have been obtained using synchrotron radiation microtomography in mono and polychromatic configuration, respectively. Advancements in conventional microtomography have increased the achievable resolution and contrast, making this relatively inexpensive and widely available technology potentially useful for studies of insect internal morphology. The main goal of this work was to provide a new set of high quality microtomographic images of *R. prolixus* achieved by means of a desktop X-ray microtomograph. It allows the three-dimensional visualization of important chitinized structures: pharynx and tracheae. Pharyngeal and tracheal volumes were quantitatively evaluated at different days (1, 4, 10, 15 and 20) after feeding. The results suggest that variation of average volumes could be attributed to insect hormone 20-hydroxy-ecdysone (20-OH-Ec) pulse at 11 days after feeding. Pharyngeal volumes decrease 3.80 times. On the other hand, tracheal volumes increase 1.78 times. Head total volume showed similar trends than trachea.

ÍNDICE

I INTRODUÇÃO	1
II FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
II.1 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA	5
II.1.1 INTRODUÇÃO	5
II.1.2 PRINCÍPIOS FÍSICOS DA MICROTOMOGRÁFIA DE RAIOS X	7
II.1.3 PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS	11
II.1.4 SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS	12
II.2 RHODNIUS PROLIXUS	14
II.2.1 DOENÇA DE CHAGAS	14
II.2.2 CICLO BIOLÓGICO	14
II.2.3 SISTEMA DIGESTIVO	17
II.2.3.1 FARINGE	19
II.2.4 SISTEMA TRAQUEAL	21
III MATERIAIS E MÉTODOS	24
III.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	24
III.2 MICROTOMOGRÁFIA	26
III.2.1 MICROTOMÓGRAFO SKYSCAN 1172	26
III.2.2 PROGRAMA NRecon	27
III.2.3 PROGRAMA DE ANÁLISE MORFOLÓGICA – CTAn	29
III.2.3.1 SEGMENTAÇÃO BINÁRIA	31
III.2.3.2 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS	33
IV RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
IV.1 VOLUME DA FARINGE	37
IV.2 VOLUME DA TRAQUEIA	40
IV.3 VOLUME TOTAL DA CABEÇA	44
V CONCLUSÃO	47
TRABALHOS FUTUROS	49
REFERÊNCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1: Princípio geral de aquisição de uma microtomografia.	8
Figura 2-2: Representação esquemática de projeções obtidas para diferentes direções (STOCK, 1999).	9
Figura 2-3: Esquema do microtomógrafo com fonte-detector fixos (Adaptado de KIM et al., 2011).	10
Figura 2-4: Ilustração de um esquema experimental típico para microtomografia de raios X com feixe cônico (Adaptado de RITMAN, 2004).	11
Figura 2-5: Representação esquemática dos conceitos de pixel, voxel e fatia resultando no volume cúbico (PINHEIRO, 2008).	12
Figura 2-6: Imagem binarizada de um corte transversal na altura dos olhos do <i>Rhodnius prolixus</i> . As setas em vermelho indicam os dois ramos da traqueia. A seta em azul indica a faringe.	13
Figura 2-7: Ciclo biológico de desenvolvimento do <i>Rhodnius prolixus</i> (PAIM, 2014)..	15
Figura 2-8: Desenho esquemático do cérebro de triatomíneos (Adaptado de INSAUSTI, 1994).	16
Figura 2-9: Diagrama do sistema alimentar de um inseto (WIGGLESWORTH, 1972). a: cérebro; b: coração; c: faringe; d: glândula salivar; e: papo; f, proventrículo; g: intestino médio; h, cordão nervoso central; i: túbulos de Malpighi; k: intestino posterior; l: reto.	17
Figura 2-10: Esquema das maxilas dos triatomíneos na pele do hospedeiro (Adaptado de LAVOPIERRE et al., 1959).	19
Figura 2-11: Mecanismo de alimentação de inseto hematófago (Adaptado de SANT'ANNA, 2017).	20
Figura 2-12: Diagrama da seção transversal da cabeça do <i>Rhodnius prolixus</i> em destaque a faringe (Adaptado de BENNET-CLARK, 1963a).	21
Figura 2-13: Ramo traqueal próximo ao espiráculo: a) íntima; b) tenídeo; c) matriz; d) membrana basal (Adaptado de WIGGLESWORTH, 1974).	21
Figura 3-1: Adaptador artificial de alimentação para o <i>Rhodnius prolixus</i> (SILVA, 2012).	24

Figura 3-2: Região do corte realizado em ninfa de 5º estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> utilizado neste trabalho.	25
Figura 3-3: Vista interna do microtomógrafo SkyScan 1172 identificando os principais componentes. A câmera de vídeo é utilizada para controle do posicionamento da amostra.....	26
Figura 3-4: Interface do programa NRecon para alinhamento do centro de rotação da amostra. Funções <i>preview</i> e <i>fine-stuning</i> são indicadas pelas setas.	27
Figura 3-5: Janela do Nrecon com histograma em destaque.	28
Figura 3-6: Processo de reconstrução tomográfica.....	29
Figura 3-7: Sequência de aquisição até obtenção da ROI.	30
Figura 3-8: Processo de aquisição dos dados da análise quantitativa 3D.....	30
Figura 3-9: Janela do CTAn com histograma da segmentação da faringe.	31
Figura 3-10: Esquema para as análises quantitativas da faringe. (a) Fatia 598 da amostra da faringe; (b) Em vermelho ROI selecionada; (c) Binarização da faringe.	32
Figura 3-11: Janela do CTAn com setas indicando os parâmetros <i>Top</i> e <i>Bottom</i> e com a seleção da geometria da ROI.	33
Figura 3-12: Lista de tarefas aplicada com a função <i>Morphological operations</i> apenas na traqueia.....	34
Figura 4-1: Volume 3D renderizado da cabeça de um inseto do grupo 4D: (a) visualização da estrutura externa, (b) identificação da faringe em transparência e (c) vista dorsal com faringe em destaque na cor vermelha.	36
Figura 4-2: (A) (a) Vista transversal da cabeça de um inseto do grupo 4D com realce da faringe em vermelho. (b) Volume renderizado da faringe em destaque.	37
Figura 4-3: Volume médio calculado (mm ³) da faringe em função do tempo (em dias) após a alimentação.....	38

Figura 4-4: ((a) Vista dorsal do volume 3D renderizado da cabeça de um inseto do grupo 10D com traqueia em azul. Corte sagital com realce da traqueia direita (b) em (c) esquerda.	39
Figura 4-7: (a) Vista transversal da cabeça de um inseto do grupo 10D com traqueias indicadas pelas setas. (b) Volume renderizado da traqueia em destaque.	40
Figura 4-8: Volume médio calculado (mm^3) das traqueias direita e esquerda em função do tempo (em dias) após a alimentação.	41
Figura 4-9: Volume total médio calculado (mm^3) da cabeça em função do tempo (em dias) após a alimentação.	44
Figura 4-10: Corte transversal do volume 3D renderizado da cabeça do inseto indicando a variação da dimensão da faringe para um inseto típico do grupo (a) 1D e (b) 15D. Setas indicam outras importantes estruturas que podem ser visualizadas.	45
Figura 4-11: Corte transversal do volume 3D renderizado da cabeça do inseto indicando as traqueias para um inseto típico do grupo (a) 1D e (b) 15D. Setas indicam outras importantes estruturas que podem ser visualizadas.	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3-1: Descrição das amostras do inseto <i>Rhodnius prolixus</i> (n=4 para cada grupo).	25
Tabela 4-1: Principais parâmetros escolhidos para realização das tomografias.....	35
Tabela 4-2: Volumes (mm ³) calculados da faringe (média ± desvio padrão) de cada inseto por grupo (n=4).	37
Tabela 4-3: Volumes (mm ³) calculados da traqueia direita (média ± desvio padrão) de cada inseto por grupo (n=4).	40
Tabela 4-4: Volumes (mm ³) calculados da traqueia esquerda (média ± desvio padrão) de cada inseto por grupo (n=4).	41
Tabela 4-5: Volumes (mm ³) calculados da cabeça (média ± desvio padrão) de cada inseto por grupo (n=4).	43

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO

A microtomografia computadorizada de raios X (μ TC) é uma técnica de imagem não invasiva e não destrutiva que permite a visualização tridimensional de estruturas internas de uma amostra. No início dos anos 70, HOUNSFIELD (1973) desenvolveu um sistema comercial de tomografia computadorizada para imagens médicas, e o número de sistemas médicos é, agora, praticamente incontável. No mundo moderno a análise de microestruturas e microarquitetura dos mais diversos materiais e tecidos, seja para auxiliar nos diagnósticos de doenças, na análise da melhor liga metálica ou na melhor técnica para alterar a qualidade de determinados alimentos, tornou-se um grande aliado da caracterização de metais, rochas, ossos, alimentos e outros objetos. Avanços recentes na microtomografia computadorizada tem tornado possível a obtenção de dados tridimensionais (3D) de modo não destrutivo (JONES *et al.*, 2007; POUECH *et al.*, 2010; ZASLANSKY *et al.*, 2010). Hoje, os nanotomógrafos podem atingir resoluções espaciais melhores que 100 nm (WILDENSCHILD & SHEPPARD, 2013).

O conhecimento detalhado do interior de estruturas biológicas e organismos é fundamental para uma melhor compreensão de sua função e evolução. Tradicionalmente, para o estudo da morfologia e anatomia biológicas, as estruturas internas dos organismos inteiros, ou partes deles, são acessadas através da dissecação ou secção serial histológica. Uma técnica não destrutiva que permita análises qualitativa e quantitativa da estrutura completa de um organismo translúcido é, portanto, muito desejada, especialmente se um método de preparação de amostra demorado pode ser evitado (STEVENSON *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2005; BETZ *et al.*, 2007; HÖNNICKE, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2010; LUSSANI *et al.*, 2015). Uma boa revisão sobre equipamentos, fontes de radiação, sistemas de aquisição de dados e aplicações da μ TC pode ser encontrado em STOCK (1999). Menos de uma década depois, o mesmo autor (STOCK, 2008) publicou uma nova revisão apresentando avanços da μ TC aplicada à materiais.

A μ TC é uma técnica de imagem baseada na absorção de raios X. No entanto, um problema bem conhecido em técnicas baseadas na absorção de raios X é a baixa sensibilidade, o que torna difícil a aplicação destas técnicas para a obtenção de imagem

de tecidos moles, tais como amostras biológicas. Por outro lado, as amostras biológicas que apresentam um baixo contraste, por absorver pouca radiação, produzem deslocamentos de fase significativos no feixe de raios X (GROSO *et al.*, 2006). A técnica de contraste de fase (PhC- μ TC) oferece um melhor realce e detalhe de imagem e, frequentemente, com doses menores quando comparada com as técnicas convencionais de raios X (LEWIS, 2004). Esta técnica é baseada no fato de que tanto a amplitude quanto a fase dos raios X são modificadas conforme um feixe de raios X se propaga através de um objeto. Um entendimento detalhado requer que a radiação seja tratada como um campo de onda ao invés de, como simples óptica geométrica. Tal consideração representa uma significativa mudança no campo de imagens por raios X e talvez seja um dos motivos pelos quais os efeitos de fase para imagens não tenham sido muito considerados até recentemente.

O desenvolvimento de fontes de radiação síncrotron e técnicas de imagem de contraste de fase, resultaram em grandes avanços tanto em imagem microscópica, como para imagens de raios X em tempo real de organismos vivos (CLOETENS *et al.*, 1996). Em 2008, WESTNEAT *et al.* publicaram uma excelente revisão sobre imagens obtidas usando fontes síncrotron de raios X e delineou os muitos usos para imagem que auxiliam o estudo da anatomia dos organismos vivos. Em um tempo relativamente curto, novas técnicas disponibilizadas para a comunidade científica têm sido aplicadas em diversas áreas da ciência. Em 2012, MIZUTANI & SUZUKI revisaram as aplicações da microtomografia por raios X para visualização de estruturas 3D de tecidos biológicos.

A aplicação da μ TC para o estudo de insetos é recente (HORNSCHEMEYER *et al.*, 2006; BEUTEL *et al.*, 2008; EBERHARD *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; FRIEDRICH *et al.*, 2013; SOMBKE *et al.*, 2015) e sua transposição para o uso da μ TC por contraste de fase (PhC- μ TC) usando radiação síncrotron tem ganho bastante espaço (SOCHA *et al.*, 20107; JAKUBEKA *et al.*, 2007; FRIEDRICH & BEUTEL, 2008; HEETHOFF & NORTON, 2009; SOCHA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2012; RIEDEL *et al.*, 2012; SHAHA *et al.*, 2013).

Particularmente, a colaboração entre o grupo de pesquisa em Física Aplicada do Instituto de Física da UERJ e a COPPE/UFRJ vem trabalhando na utilização da técnica PhC- μ TC usando radiação síncrotron (SR- μ TC) para o conhecimento detalhado das estruturas anatômicas do *Rhodnius prolixus* (ALMEIDA *et al.*, 2012, 2013, 2014;

ALMEIDA, 2013; SENA *et al.* 2014, 2015, 2016a, 2016b; SENA, 2015). O *Rhodnius prolixus* é um inseto hematófago e pertence a subfamília Triatominae, ordem Hemiptera e família Reduviidae. Considerado um dos principais insetos vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, uma doença humana tropical negligenciada, cuja transmissão normalmente ocorre pela eliminação do parasita pela urina e fezes dos insetos vetores infectados (GARCIA *et al.*, 2007). Aproximadamente de sete a oito milhões de pessoas no mundo estão infectadas por essa doença (WHO, 2013).

Os primeiros trabalhos utilizando SR- μ TC e contraste de fase no *R. prolixus* (ALMEIDA *et al.*, 2012, 2013, 2014) foram realizados com feixe monocromático e resolução de 4,5 μ m. Nestes trabalhos, foi possível identificar grande parte das estruturas internas desse inseto, incluindo o protocerebrum, uma estrutura fundamental para a melhor compreensão da sua função e evolução. Todos esses trabalhos foram realizados na linha de luz SYRMEP (SYnchrotron Radiation on MEDical Physics) do laboratório síncrotron ELETTRA em Trieste, Itália. Com o objetivo de otimizar a performance do setup de μ TC para experimentos de alta-resolução na linha SYRMEP, um sistema de lentes acoplado à câmera CCD (2048 x 2048 pixels, tamanho de pixel efetivo de 1,03 μ m) desenhado para alcançar 2 μ m de resolução espacial foi utilizado no modo de feixe policromático. Com este novo setup novas estruturas do *R. prolixus* foram identificadas por SENA *et al.* (2014, 2015). Sistemas digestivo e respiratório foram melhor visualizados, destacando-se estruturas como faringe e traqueia.

Embora a SR- μ TC possa produzir imagens de alta-resolução da morfologia interna de insetos, é necessário buscar o aprimoramento do contraste entre tecidos de baixa densidade de modo a permitir que estruturas possam ser melhor distinguidas. Alguns estudos (MESTCHER, 2009a, 2009b) mostraram que com o uso de fixadores e marcadores apropriados, a μ TC pode produzir imagens de alta qualidade de tecidos de baixo contraste. Assim, novas imagens microtomográficas foram obtidas na nova linha IMX (*X-Ray Imaging*) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, no Brasil (SENA *et al.*, 2016a). Ainda na linha IMX, efeitos biológicos do uso de um pesticida excelente para controle de pragas - o triflumuron (Starycide® sc 480 Bayer) - em ninfas de 5º estágio do *R. prolixus* foram estudados (SENA *et al.*, 2016b). As imagens mostrando o *R. prolixus* na fase da muda nunca haviam sido mostradas usando microtomografia. Além disso, foi confirmada a eficácia do triflumuron.

O objetivo deste trabalho é dar continuidade ao estudo de estruturas internas do *Rhodnius prolixus* usando um microtomógrafo de bancada com feixe de raios X cônico. É bem sabido que o alto fluxo de fótons e a coerência do feixe de raios X gerados por fontes de radiação síncrotron possibilitam a rápida aquisição de imagens de alta resolução com excelente contraste, mas aceleradores lineares que geram feixes com essas propriedades não são nem comuns nem amplamente acessíveis, limitando o uso desta abordagem para aqueles com acesso a tempo de feixe e técnicos treinados. Os avanços na μ TC aumentaram a resolução e o contraste alcançáveis, tornando esta tecnologia relativamente pouco dispendiosa, amplamente disponível e potencialmente útil para estudos de morfologia interna de insetos (HÖRNSCHEMEYER *et al.*, 2002; SHAHA *et al.*, 2013). Além disso, as reconstruções 3D de dados de varredura são diretas com software próprio do equipamento e livremente disponível, facilitando a análise de estruturas internas finas.

O objetivo específico é usar a μ TC convencional como uma abordagem direta e relativamente barata para identificar e estimar com precisão os volumes da cabeça, faringe e traqueias do *R. prolixus* em diferentes dias após a alimentação de 5º estágio ninfal. Em triatomíneos, a alimentação com sangue está ligada ao sistema neuroendócrino o qual regula a maior parte dos eventos anatômicos e fisiológicos. Assim, os insetos da colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (FIOCRUZ/BRASIL) foram coletados em diferentes dias após a alimentação. A investigação tridimensional da cabeça, faringe e traqueias do *R. prolixus* foi realizada usando o microtomógrafo de bancada SkyScan-Bruker 1172 instalado no Laboratório de Análise por Raios X (LARX) da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa na Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os procedimentos de reconstrução e visualização das imagens foram realizados no Laboratório de Física Aplicada às Ciências Biológicas (Lab_FisMed) do Instituto de Física da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

No capítulo a seguir serão apresentados os conceitos teóricos básicos sobre a técnica de μ TC e sobre o alvo de aplicação da técnica, o *Rhodnius prolixus*. O capítulo III mostra a metodologia usada para obter os resultados que, por sua vez, serão apresentados e discutidos no capítulo IV. As conclusões finais e propostas de trabalhos futuros serão apresentados no capítulo V. A lista de referências bibliográficas usadas estão no final do corpo do texto.

CAPÍTULO II

II FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II.1 MICROTOMOGRÁFIA DE RAIOS X

II.1.1 INTRODUÇÃO

A tomografia computadorizada (TC) tornou-se viável com o desenvolvimento da tecnologia de computadores na década de 1960, mas algumas das ideias em que se baseia podem ser rastreadas até a primeira metade do século XX (KALENDER, 2006). Em 1917, o matemático boêmio RADON (1917) provou que a distribuição de um material em uma camada de um objeto pode ser calculada se os valores integrais ao longo de qualquer número de linhas que passam pela mesma camada são conhecidos. As primeiras aplicações desta teoria foram desenvolvidas para a radioastronomia por BRACEWELL (1956), mas encontraram pouca resposta e não foram exploradas para finalidades médicas.

Os primeiros experimentos em aplicações médicas deste tipo de tomografia reconstrutiva foram realizados pelo físico A M Cormack (CORMACK, 1963). Entre 1957 e 1963, e sem conhecimento de estudos prévios, desenvolveu um método de cálculo das distribuições de absorção de radiação no corpo humano com base em medidas de transmissão. Ele postulou, para aplicações radiológicas, que deve ser possível distinguir mínimas diferenças de absorção, isto é, diferentes estruturas de tecidos moles.

Embora o trabalho de Cormack tenha sido mais tarde reconhecido como uma contribuição essencial para o desenvolvimento da TC, outros pesquisadores merecem ser mencionados da mesma forma. OLDENDORF (1961) publicou seu trabalho verdadeiramente pioneiro na TC em 1961. KUHLE E EDWARDS (1963) introduziram os conceitos de tomografia computadorizada por emissão em 1963, embora os esforços de reconstrução estivessem limitados apenas à retroprojeção, a TC de emissão, portanto, era anterior à TC de transmissão. A retroprojeção filtrada foi descrita pela primeira vez por BRACEWELL & RIDDLE (1967). Descrições de técnicas de reconstrução algébrica foram publicadas por GORDON *et al.* (1970) e por HERMAN *et al.* (1973);

descrições de técnicas de reconstrução de Fourier por BATES & PETERS (1971). O papel-chave sobre as funções de filtragem necessárias para reconstrução tomográfica foi o trabalho de SHEPP & LOGAN (1974).

A primeira implementação prática bem sucedida da teoria foi obtida em 1972 pelo engenheiro inglês G.N. Hounsfield, que é geralmente reconhecido como o inventor da tomografia computadorizada (HOUNSFIELD, 1973). As primeiras imagens clínicas com a TC foram produzidas no Atkinson Morley Hospital, em Londres, em 1972. A TC foi imediatamente e com entusiasmo acolhida pela comunidade médica e tem sido muitas vezes referida como a mais importante invenção em radiologia de diagnóstico desde a descoberta de raios-X. Seu desenvolvimento posterior apenas confirmou essas expectativas iniciais, com consideráveis melhorias na resolução espacial e nos tempos de reconstrução de imagens, sendo agora uma ferramenta comum nos laboratórios de materiais. Excelentes revisões sobre TC podem ser encontrados na literatura (BONSE & BUSCH, 1996; BARUCHEL *et al.*, 2000; BANHART, 2008; STOCK, 2009).

No início dos anos 80, os primeiros scanners de microtomografia de raios X de alta resolução (também conhecida como microtomografia computadorizada ou μ TC) foram desenvolvidos usando fontes de raios X de bancada (SATO *et al.*, 1981; BURNSTEIN *et al.*, 1984). A divisão entre TC e μ TC é uma distinção artificial, mas a microtomografia é considerada como incluindo resultados obtidos com pelo menos 50-100 μ m de resolução espacial. A resolução real necessária para uma aplicação particular depende das características microestruturais de interesse e das suas formas.

Os avanços na μ TC aumentaram a resolução e o contraste alcançáveis, tornando esta tecnologia relativamente pouco dispendiosa e amplamente disponível, o que permitiu uma abordagem prática para determinação da estrutura tridimensional (3D) de uma amostra opaca em resolução micrométrica a submicrométrica (RITMAN, 2004). Recentemente, sistemas de nanoTC comerciais (resoluções espaciais reivindicadas substancialmente abaixo de 1 μ m) e sistemas μ TC in vivo (para pequenos animais) começaram a aparecer em laboratórios de pesquisa (BADEA *et al.*, 2008; WAGNER *et al.*, 2010; ALT *et al.*, 2011; ROCHE *et al.*, 2012; PEYRIN *et al.*, 2014).

Com a introdução de fontes de radiação de síncrotron (MAGARITONDO, 1988) em vários países, cientistas de materiais usaram a alta intensidade e brilho dessas fontes

de raios X para fazer TC em resoluções micrométricas, variando de 10 a 0,7 μm . As fontes síncrotron oferecem um fluxo de fótons de várias ordens de magnitude superior à dos tubos convencionais de raios X. Esta propriedade torna-se particularmente importante para imagens de resolução espacial submicrométricas, diminuindo os tempos de varredura enquanto se obtém uma razão sinal-ruído elevada. Eles também permitem o uso de raios X monocromáticos, evitando os artefatos de endurecimento do feixe. A imagem resultante pode então ser considerada como um mapa do coeficiente de atenuação linear dentro da amostra (PEYRIN, 2009; HANNAH *et al.*, 2010; VARGA *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2017).

As fontes síncrotron também permitiram a obtenção de imagens usando contraste de fase. A técnica de contraste de fase (PhC- μTC) oferece um melhor realce e detalhe de imagem e, frequentemente, com doses menores quando comparada com as técnicas convencionais de raios X (LEWIS, 2004). Esta técnica é baseada no fato de que tanto a amplitude quanto a fase dos raios X são modificadas conforme um feixe de raios X se propaga através de um objeto. Um entendimento detalhado requer que a radiação seja tratada como um campo de onda ao invés de, como simples óptica geométrica (FITZGERALD, 2000). O desenvolvimento desta técnica tornou possível a imagem de tecidos biológicos em alta resolução com microtomografia de raios X baseada em síncrotron (SR- μCT) (WESTNEAT *et al.*, 2008).

II.1.2 PRINCÍPIOS FÍSICOS DA MICROTOMOGRÁFIA DE RAIOS X

O princípio geral TC de raios X baseia-se na combinação de aquisição e processamento de dados para produzir imagens 2D da anatomia. A aquisição de dados é realizada através da rotação de uma fonte de raios X ao redor do objeto e a detecção da atenuação dos raios X depois que passam pelo corpo (Figura 2-1).

Conforme descoberto por Röntgen (RÖNTGEN, 1898) a atenuação de raios X de comprimento de onda λ é dada para um objeto homogêneo pela equação familiar (CULLITY, 1978):

$$I = I_0 \exp(-\mu x) \quad (1)$$

onde I_0 e I são as intensidades do feixe medidas antes e depois do objeto, respectivamente e μ é o coeficiente de atenuação do material que depende da energia dos fótons incidentes e do material que o feixe atravessa.

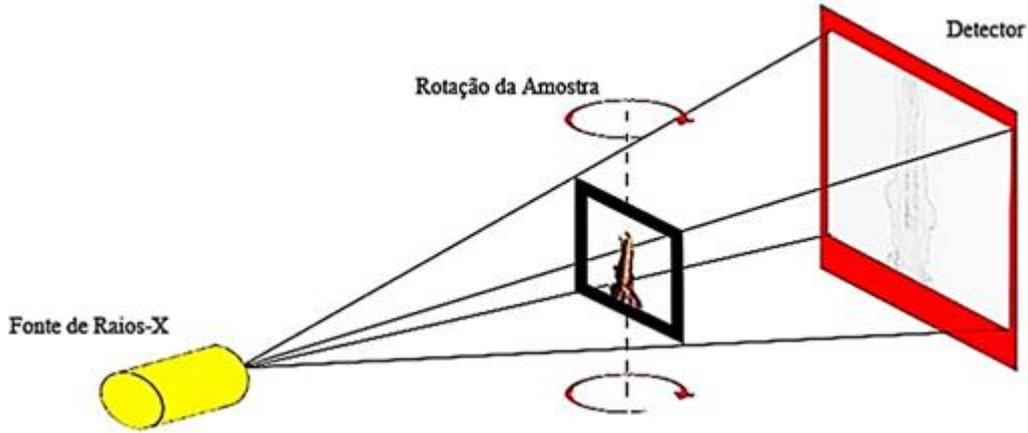


Figura 2-1: Princípio geral de aquisição de uma microtomografia.

Considerando os incrementos da atenuação ao longo da direção de propagação dos raios X através do objeto, pode-se escrever a equação (1) de uma forma mais geral:

$$I = I_0 \exp \int (-\mu(s) ds) \quad (2)$$

onde $\mu(s)$ é o coeficiente de atenuação linear na posição s ao longo do raios s .

O problema centra da TC é atribuir o valor correto de μ para cada posição ao longo deste raio (e ao longo de outros raios atravessando a amostra), conhecendo apenas os valores da integral da linha ao longo de diferentes direções θ . Uma projeção é obtida com o objeto ou o sistema fonte-detector girado de um ângulo θ em relação à posição original, de modo que obtém-se a projeção para cada ângulo θ . No caso de raios paralelos, uma projeção pode ser descrita matematicamente pela equação 2.

$$P_{\theta}(s) = \int \mu(s) ds \quad (3)$$

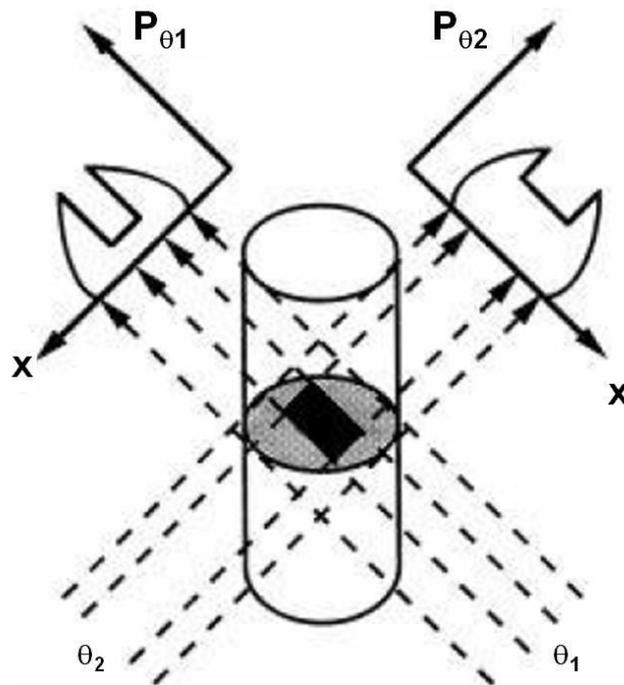


Figura 2-2: Representação esquemática de projeções obtidas para diferentes direções (STOCK, 1999).

As medidas de atenuação não fornecem diretamente a imagem, mas sim o chamado sinograma. Em seguida, a imagem tomográfica é obtida usando um algoritmo de reconstrução tomográfica 2D, com base em uma relação matemática exata que relaciona a imagem ao seu sinograma (PEYRIN *et al.*, 2014). O método de reconstrução de imagem da retroprojeção filtrada (FBP - do inglês Filtered Backprojection) é a técnica mais comumente usada para reconstruir imagens de TC a partir de projeções de transmissão.

Neste trabalho, as imagens tomográficas foram obtidas usando um microtomógrafo comercial de bancada. A maioria desses sistemas usa uma fonte de raios X de feixe de cônico associada a um detector bidimensional. Quando a fonte de raios X é rodada circularmente em torno da amostra, é registrado um conjunto de radiografias 2D em ângulos de vista diferentes. O detector pode ser composto por um cintilador que converte fótons de raios X para luz acoplado a um detector 2D ou por uma câmera CCD (do inglês Charge Coupled Device). A figura 2-4 mostra um esquema típico de um microtomógrafo de bancada.

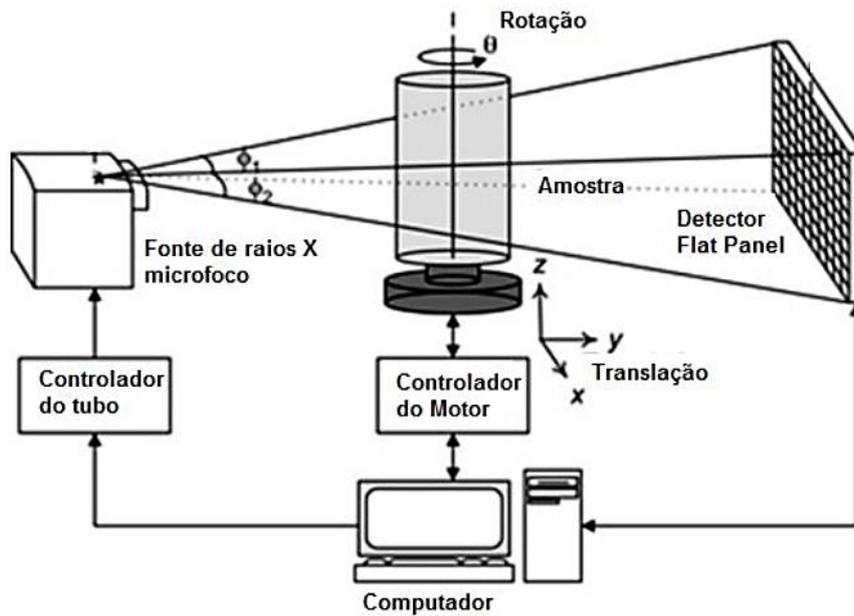


Figura 2-3: Esquema do microtomógrafo com fonte-detector fixos (Adaptado de KIM *et al.*, 2011).

Além de empregar um detector 2D, uma técnica de reconstrução mais sofisticada deve ser aplicada se todo o cone de raios X deve ser usado. A reconstrução já não se separa em conjuntos de dados independentes de fatias, o que só é verdadeiro para um plano central, onde todo feixe de raios X em leque é perpendicular ao eixo de rotação. Todas as fatias vizinhas são penetradas num ângulo crescente com a distância da fatia central. Vários algoritmos 3D ou feixe cônico foram desenvolvidos para resolver este problema e geram um jogo 3D dos dados das projeções do cone tomadas por detectores 2D (KAK & SLANEY, 1988). A imagem 3D é geralmente reconstruída usando o algoritmo Feldkamp-David-Kress (FDK), que generaliza o algoritmo FBP (FELDKAMP *et al.*, 1984). A figura 2-4 mostra o uso convencional do feixe de raio X cônico, que projeta uma imagem de raio X ampliada em um sistema de detecção de grande área como por exemplo, uma câmera CCD.

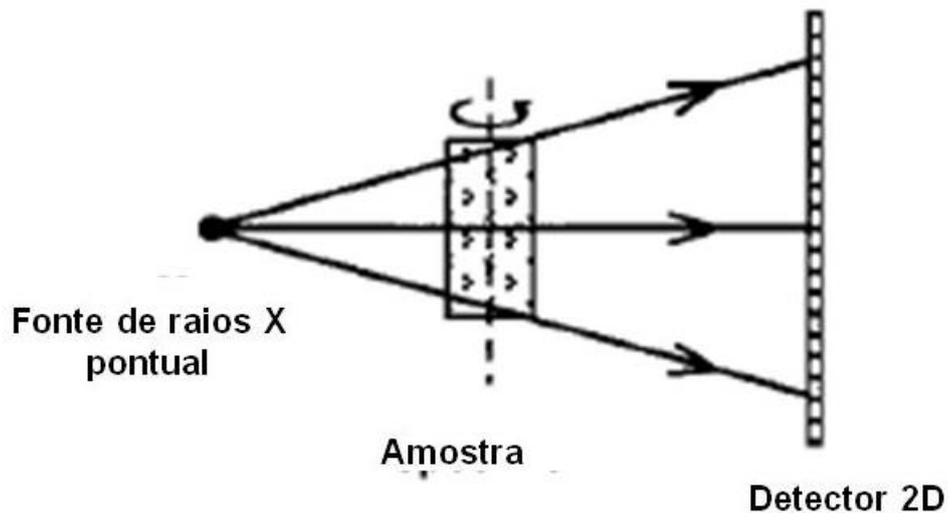


Figura 2-4: Ilustração de um esquema experimental típico para microtomografia de raios X com feixe cônico (Adaptado de RITMAN, 2004).

Uma câmera CCD produz uma imagem digitalização direta como uma matriz de pixels exibidos em um monitor de computador. Um recente avanço na tecnologia de imagem é a (DDI). A imagem computadorizada pode ser manipulada e aprimorada com software de computador. Uma imagem digital é aquela que possui seções localizadas dentro de uma matriz que carrega um número finito de elementos de imagem transversal discretos, chamados de pixels (CHERRY *et al.*, 2012).

II.1.3 PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS

A imagem é uma matriz bidimensional, descrita por $f(x,y)$, em que o valor ou amplitude da função f nas coordenadas espaciais (x,y) dá a intensidade (brilho) da imagem naquele ponto. Para ser adequada para processamento computacional, uma função $f(x,y)$ precisa ser digitalizada tanto espacialmente quanto em amplitude. A digitalização das coordenadas espaciais (x,y) é denominada “amostragem da imagem” e a digitalização da amplitude é chamada quantização em níveis de cinza (GONZALES & WOODS, 1992). Numa imagem digital o pixel é a função $f(x, y)$.

O processo de digitalização envolve decisões a respeito dos valores para N , M , e para o número de níveis de cinza discretos permitidos para cada pixel. O processo assume que quantização do número de níveis de cinza são potências inteiras de dois, ou seja, $N=2^n$, $M=2^k$ e $G=2^m$, onde G é o número de níveis de cinza. Já o número b , de bits necessários para armazenar uma imagem digitalizada é dado por: $b=N \times M \times m$. A

resolução (grau de detalhes discerníveis) de uma imagem depende da amostragem ($N \times M$) e do nível de cinza. Quanto maiores forem esses parâmetros, melhor será a imagem original aproximada pela matriz digitalizada e isto está ligado diretamente a qualidade do feixe de raios X (GONZALES & WOODS, 1992, PRATT, 2001, JAHNE, 2001).

Em uma representação tridimensional de imagens, situação característica nas análises de imagens tomográficas, o modelo de matriz bidimensional é substituído pelo modelo de matriz volumétrica onde pixels ganham a dimensão de profundidade espacial. Este pixel volumétrico recebe o nome de voxel (Figura 2-5). Na tomografia, cada imagem reconstruída é vista como uma coleção de voxels cujas dimensões no plano da imagem correspondem às dimensões horizontais dos pixels e a profundidade corresponde à espessura da imagem (PINHEIRO 2008).

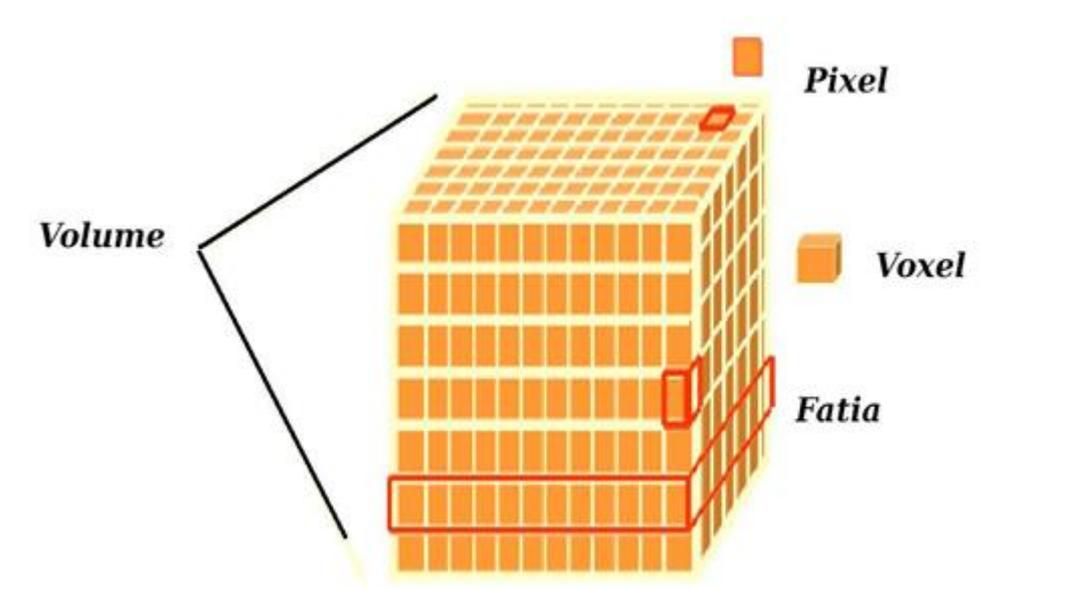


Figura 2-5: Representação esquemática dos conceitos de pixel, voxel e fatia resultando no volume cúbico (PINHEIRO, 2008).

II.1.3 SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS

A segmentação de imagens digitais consiste em fazer recortes de objetos de interesse na imagem, ou seja, subdivide a imagem em suas partes ou objetos constituintes e é uma das ferramentas de análise de imagens digitais. Para a segmentação não há um método padrão, porém métodos clássicos em função da popularidade de suas aplicações (PRATT, 2001).

Os algoritmos de segmentação permitem diferenciar dois ou mais objetos e distinguir partículas entre si e da imagem de fundo. Esta distinção permitirá ao programa interpretar pixels contíguos e agrupá-los em regiões. O processo de binarização consiste na escolha de um valor limiar (threshold) que será aplicado à imagem. Todos os pixels cujo valor for maior ou igual ao do limiar serão convertidos em um valor chamado de saturado. Em uma imagem digital com resolução de 8-bits (Fig 2-6), este valor saturado vale 256. De forma análoga, todos os pixels que tiverem valor inferior ao do limiar, serão convertidos em 0 (zero). O resultado é uma imagem em preto e branco, onde a fase branca corresponde à fase de interesse e a fase preta é o restante não quantificado.

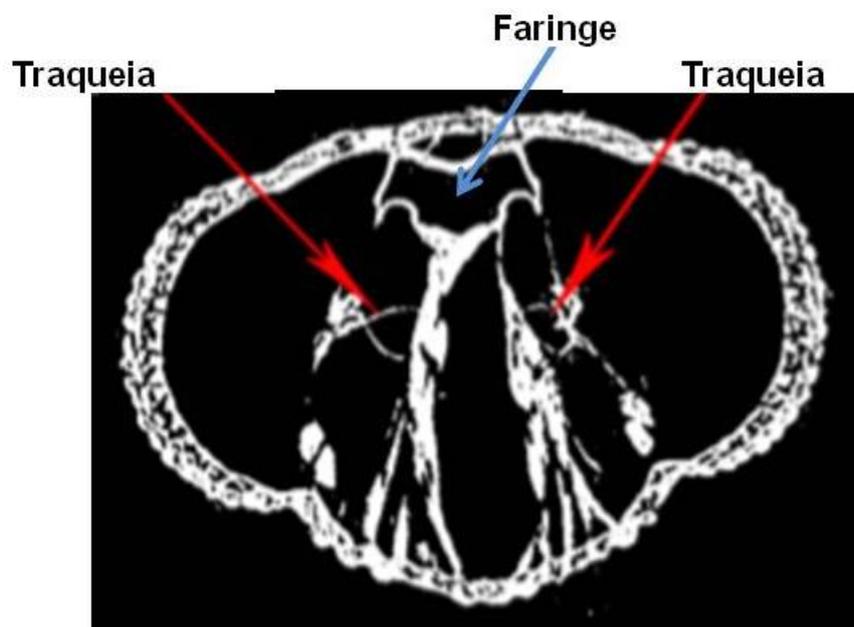


Figura 2-6: Imagem binarizada de um corte transversal na altura dos olhos do *Rhodnius prolixus*. As setas em vermelho indicam os dois ramos da traqueia. A seta em azul indica a faringe.

A escolha de um valor de limiar é crítico neste método (DING *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 1998), pois depende das características do sistema tomográfico, em especial, das características energéticas do feixe de raios X. Uma ferramenta útil na escolha do limiar é o histograma da imagem. No histograma, pode-se observar a distribuição dos valores dos pixels da imagem e buscar um valor que separe "razoavelmente bem" a distribuição correspondente ao da fase de interesse do restante (NOGUEIRA *et al.*, 2012).

II.2 RHODNIUS PROLIXUS

O *Rhodnius prolixus*, é um triatomíneo pertence à ordem Hemíptera, sub-ordem Heteroptera, família Reduviidae. Tem importância devido ao seu papel como vetor do *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas (SCHOFIELD *et al.*, 2006). Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas com a doença de Chagas em todo o mundo, principalmente em áreas endêmicas na América Latina e América Central (WHO, 2015). No Brasil, a doença de Chagas acomete cerca de três milhões de pessoas (DIAS, 2011).

II.2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A transmissão do agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, está relacionada com o hábito de vida hematófago do vetor. *Rhodnius prolixus* é uma das espécies de inseto vetores mais importantes do *Trypanosoma cruzi*. Alimenta-se exclusivamente de sangue em todas as fases de seu ciclo evolutivo, bastando apenas um repasto sanguíneo saturante para ocorrer ecdise (GARCIA *et al.*, 1975). No ambiente domiciliar, *Rhodnius prolixus* alimenta-se principalmente de sangue humano, embora utilize também, como fonte alimentar cães e gatos. No ambiente silvestre faz uso de marsupiais e roedores como fonte de alimento. Vivem em média entre um a dois anos com grande capacidade de reprodução e, dependendo da espécie, com intensa resistência ao jejum. Para seu adequado desenvolvimento necessita de temperatura em torno de 27 a 30 °C e umidade relativa do ar de 75% (AZAMBUJA *et al.*, 1991). Em laboratório, com condições controladas de temperatura e umidade e uso de aparatos artificiais de alimentação, é fácil a manutenção em colônias.

Um dos mecanismos de transmissão do *T. cruzi* ocorre quando o inseto, ao se alimentar, logo em seguida defeca e urina sobre o hospedeiro. O indivíduo picado, ao coçar o local, permite a entrada do protozoário através das micro-lesões na pele ou ao levar as mãos contaminadas ao olho.

II.2.2 CICLO BIOLÓGICO

Na maior parte dos animais, verifica-se um crescimento do tipo contínuo, mesmo em períodos de maior ou menor atividade orgânica. Nos insetos, no entanto, a presença de um exoesqueleto não permite esse tipo de crescimento, ocorrendo ciclicamente períodos de crescimento interno não visualizado, limitados por períodos de rápido

crescimento externo. O crescimento dos insetos está ligado ao processo de muda, uma vez que esses animais necessita, trocar seu exoesqueleto periodicamente por uma outra camada externa que permita que continuem a expandir sua massa corporal (WIGGLESWORTH, 1933; GONZALEZ, 1992).

A muda é definida como um conjunto de eventos fisiológicos interdependentes que culminam com a ecdise, ou seja, a substituição da cutícula antiga por uma nova. Os períodos de crescimento inaparente entre duas trocas cuticulares são denominados estádios, e apresentam intensa atividade fisiológica. O ciclo de vida do *R. prolixus* compreende as fases de ovo, cinco estádios de ninfa (N1 a N5) e adulto (Figura 2-7) cujo o desenvolvimento ocorre através de metamorfose. Entre os estádios de ninfa e da fase jovem para adulto o inseto sofre um processo conhecido como muda ou ecdise que consiste na troca do exoesqueleto antigo por um novo (CARVAVALHO *et al.*, 1997; WIGGLESWORTH, 1972).

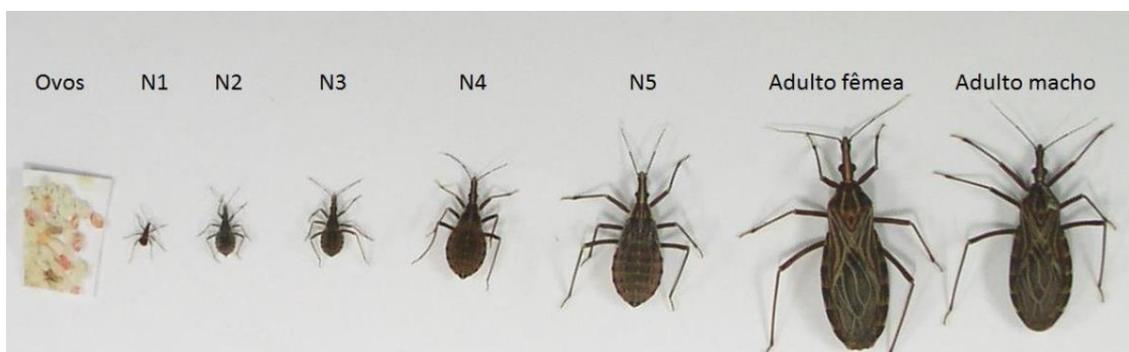


Figura 2-7: Ciclo biológico de desenvolvimento do *Rhodnius prolixus* (PAIM, 2014).

O ciclo biológico do inseto *Rhodnius prolixus* segue um controle hormonal regulador da muda. O hormônio regulador da muda conhecido como ecdisona é produzido, pelas glândulas protorácicas, sendo estas ativadas pelo hormônio cerebral (Figura 2-8) induzido após a refeição de sangue. A ecdisona foi o primeiro composto isolado e caracterizado por sua atividade biológica como indutor da muda em insetos (BUTENANDT & KARLSON, 1954). Os mecanismos de ação da ecdisona compreendem: a ativação das células hipodérmicas, restaurado a capacidade de crescimento e a síntese proteica, permitindo a formação de nova cutícula (MOROHOSHI & IJIMA, 1969). A ecdisona é convertida nos tecidos periféricos a uma forma mais ativa, a 20-hidroxi-ecdisona (20-OH-Ec) que é capaz de induzir a retração da epiderme da cutícula velha (apólise) e a deposição da nova cutícula,

culminando com a liberação do material da cutícula velha ou ecdise (WIGGLESWORTH, 1972; SVOBODA *et al.*, 1975). A presença do hormônio cerebral, o hormônio protoracicotrópico (PTTH), liberado durante alguns dias após a refeição de sangue (período crítico cerebral - PCC) induz a síntese da ecdisona a um nível suficiente para a conclusão do processo de muda (WIGGLESWORTH, 1974; STEEL *et al.*, 1982; FURTADO *et al.*, 1990).

Em 5º estadio de ninfa do *Rhodnius prolixus*, níveis de ecdisteróides aumentam de 6 a 11 dias após a alimentação, e uma vez liberado na hemolinfa, age nos tecidos promovendo o processo de muda. Este período de liberação da ecdisona depende do estágio da ninfa e da temperatura (WIGGLESWORTH, 1974; BAEHR *et al.*, 1978; AZAMBUJA *et al.*, 1993). Cabe ressaltar que grande repasto sanguíneo é o suficiente para cada muda, pois o inseto em curto espaço de tempo tem seu próprio peso aumentado em até 12 vezes e a quantidade de sangue aumenta progressivamente com a evolução dos estágios ninfais (BUXTON, 1930; GARCIA *et al.*, 1975; LENT & VALDERRAMA, 1977).

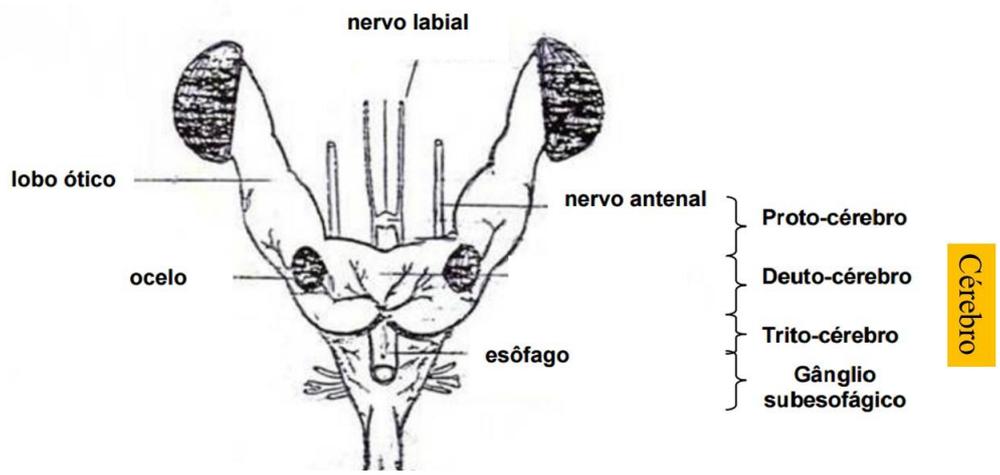


Figura 2-8: Desenho esquemático do cérebro de triatomíneos (Adaptado de INSAUSTI, 1994).

A metamorfose para a fase adulta compreende transformações morfológicas pelo desenvolvimento das asas e da genitália (WIGGLESWORTH, 1970). Na fase adulta os insetos se tornam maduros para a reprodução. As fêmeas tem estímulo à postura dos ovos após a alimentação e, principalmente pelo acasalamento (GARCIA *et al.*, 1975; SANTOS & GARCIA, 1980).

O número de ovos depositados por uma única fêmea de *Rhodnius prolixus* adulta varia entre 200 a 400, sendo que a quantidade de ovos depositados está diretamente relacionada com o número de repastos e quantidade de sangue ingerido (URIBE, 1927). O tempo de incubação dos ovos varia com a temperatura está relacionada com o tempo de eclosão dos ovos, por exemplo, temperaturas variando de 25 °C a 34 °C a eclosão ocorre entre 10 a 20 dias e temperaturas igual ou acima de 37 °C é letal para os ovos (FRIEND, 1965).

II.2.3 SISTEMA DIGESTIVO

O sistema digestivo dos insetos (Figura 2-9) apresenta a principal interface de interação entre esses animais e o meio ambiente (TERRA, 1988). Anatomicamente, o sistema digestivo dos insetos pode ser dividido em três regiões básicas (WIGGLESWORTH, 1972): intestino anterior ou estomodeo, protegido internamente por uma camada contínua e quitinizada (cutícula), intestino médio ou mesêntero, compreendido pelo “estômago e “intestino” e intestino posterior ou proctodeo, novamente com um revestimento cuticular.

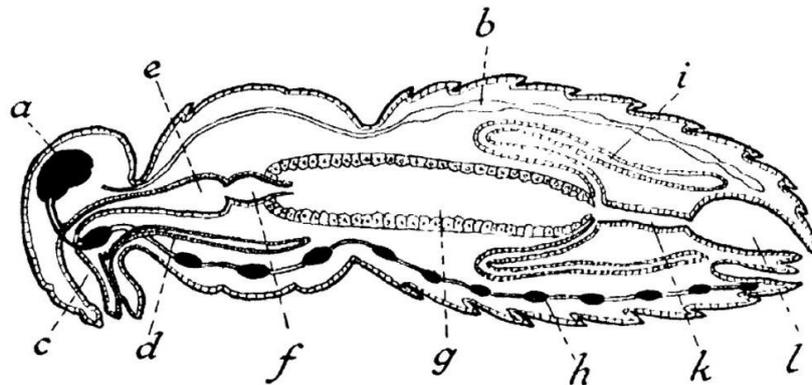


Figura 2-9: Diagrama do sistema alimentar de um inseto (WIGGLESWORTH, 1972). a: cérebro; b: coração; c: faringe; d: glândula salivar; e: papo; f, proventrículo; g: intestino médio; h, cordão nervoso central; i: túbulos de Malpighi; k: intestino posterior; l: reto.

O intestino anterior se inicia na boca e inclui a cavidade bucal, a faringe, o esôfago, o papo, onde se armazena momentaneamente o alimento realizando as primeiras transformações enzimáticas, e o proventrículo. O intestino anterior tem origem ectodérmica e apresenta uma fina camada de cutícula sobre suas células (WIGGLESWORTH, 1972).

O intestino médio é formado por um tubo simples, denominado ventrículo. O epitélio do intestino médio é formado por um tipo de célula colunar ou enterócito responsável pelos eventos mais significativos do processo digestivo em insetos, como por exemplo, a absorção de nutrientes e água, a secreção de água e enzimas digestivas e a digestão final do alimento. Frequentemente se observa, também, células regenerativas e endócrinas (TERRA, 1988).

Na região de transição entre o intestino médio e o posterior há um esfíncter (piloro), no qual se inserem os túbulos de Malpighi, que são órgãos do sistema excretor. Assim como o intestino anterior, o intestino posterior é de origem ectodérmica e também apresenta uma camada de cutícula sobre suas células. O intestino posterior inclui o íleo, o cólon e o reto, terminando no ânus (WIGGLESWORTH, 1972; TERRA, 1988). *Rhodnius prolixus*, assim como outras espécies de triatomíneos tem como característica do intestino anterior a ausência do papo sendo que o armazenamento do sangue após o repasto ocorre na região anterior do intestino médio, o “estômago”. O desempenho alimentar dos triatomíneos varia grandemente entre as espécies e é influenciado por inúmeros fatores, entre eles, as características do aparato alimentar e a composição salivar do inseto (GUARNERI *et al.* 2000, 2003) e a fisiologia do seu hospedeiro vertebrado.

Para realizar o repasto sanguíneo, os triatomíneos dispõem de um aparato bucal adaptado para retirar o sangue diretamente dos vasos (solenofagia). A probóscida (aparelho bucal) engloba o fascículo que é composto por um par de mandíbulas e um de maxilas que penetram na pele do hospedeiro. O par de maxilas compõe o feixe flexível, apresentando um canal salivar e um canal alimentar formados pela justaposição dos sulcos presentes em cada maxila. As mandíbulas serrilhadas perfuram e ancoram o aparato bucal na região superficial da pele enquanto as maxilas penetram até a derme. Imediatamente após a introdução do fascículo na pele do hospedeiro, inicia-se a fase de sondagem, em que as maxilas realizam movimentos oscilatórios até sua penetração em um vaso sanguíneo (LAVOPIERRE *et al.*, 1959), iniciando a fase de ingurgitamento, como mostra a Figura 2-10.

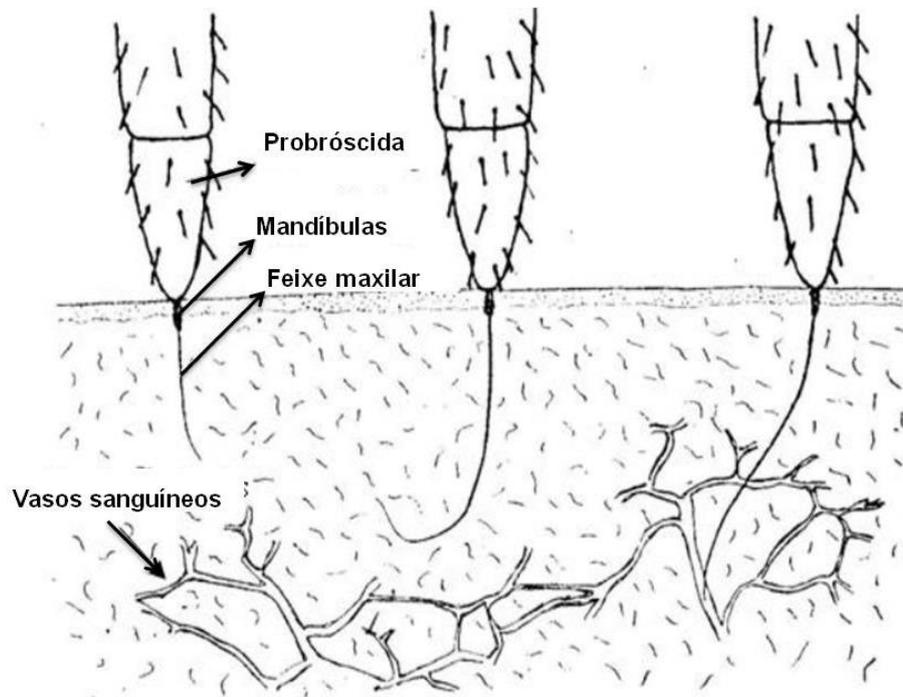


Figura 2-10:

Como um dos focos específicos deste trabalho é o cálculo do volume da faringe, o item a seguir trata de uma descrição mais detalhada deste órgão.

II.2.3.1 FARINGE

O conjunto de bombas alimentares tem como principal órgão a faringe e a sugação de sangue é uma estratégia de alimentação dos insetos hematófagos os triatomíneos. A modulação do desempenho alimentar dos vetores surgiu como estratégia evolutiva de parasitas sanguíneos para aumentar sua transmissão (Figura 2-11) em associações parasita-vetor e parasita-hospedeiro (HURD, 2003; SANT'ANNA, 2017). A faringe é a principal via de passagem do sangue contaminado com *Trypanosoma cruzi*. Suas características básicas foram descritas por BENNET-CLARK (1963a, b).

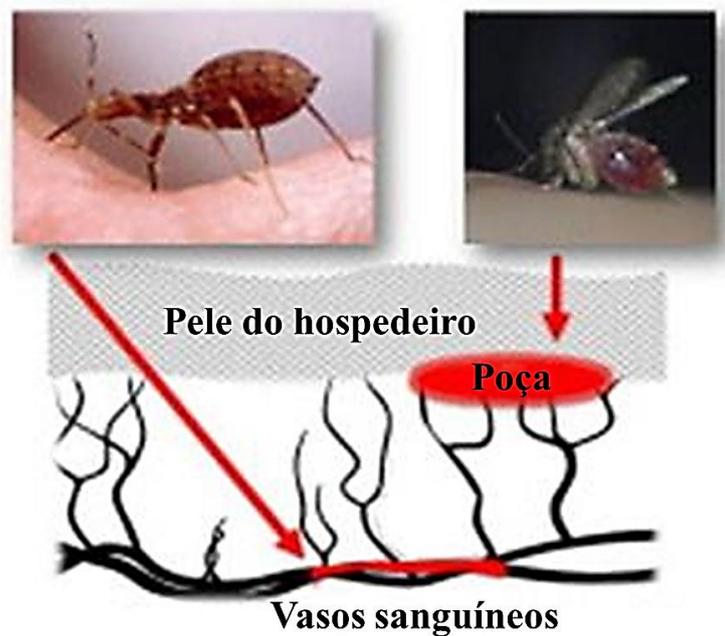


Figura 2-11: Mecanismo de alimentação de inseto hematófago (Adaptado de SANT'ANNA, 2017).

Uma das características anatômicas marcantes do inseto sugador *Rhodnius prolixus* é a bomba faringiana altamente desenvolvida. A bomba faringiana começa na base anterior das antenas e termina na margem posterior dos olhos. A faringe tem origem ectodérmica com as suas células recobertas por uma cutícula quitinosa que está relacionada com a dificuldade na absorção de nutrientes (RAMIREZ-PEREZ, 1969; COURA, 2006). Sua morfologia é um sulco em forma de U (Figura 2-12) com cerca de 3,5 mm altura e com largura de 0,28 mm (BENNET-CLARK, 1963a) formado por sua metade basal de uma quitina grossa, dura e muito fixa com uma placa de cobertura formada da parte dorsal de uma quitina fina e elástica, adaptando-se mais ou menos à forma do sulco (BARTH, 1952).

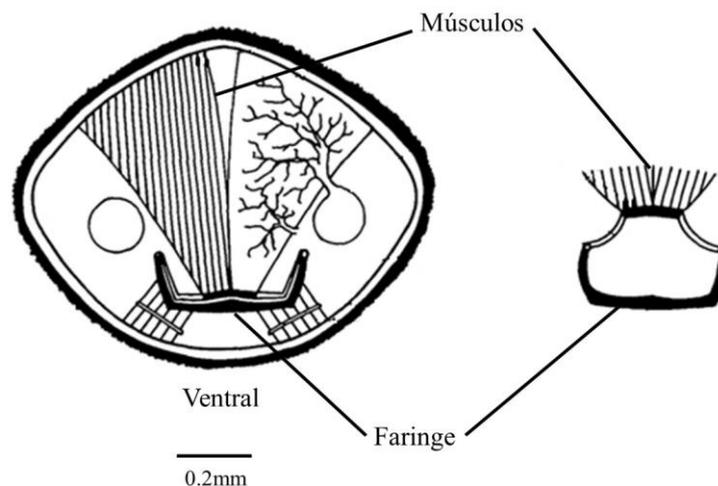


Figura 2-12: Diagrama da seção transversal da cabeça do *Rhodnius prolixus* em destaque a faringe (Adaptado de BENNET-CLARK, 1963a).

A forma de U tem na parte inicial ângulos quase retos, enquanto na parte posterior da cabeça o sulco é mais largo e a sua forma mais plana arredonda os ângulos. O teto da faringe está ligado a um grande conjunto de músculos (dilatadores faríngeos) cuja origem é a cutícula dorsal da cabeça. A contração desses músculos faz com que o teto da faringe seja levantado, reduzindo assim a pressão no lúmen. O diferencial de pressão resultante entre a faringe e o sangue no final do canal alimentar maxilar força o sangue a passagem pela faringe. O sangue flui para trás em direção ao esôfago e ao estômago quando o músculo relaxa, presumivelmente como resultado da energia armazenada nas paredes elásticas da bomba (SMITH, 1979).

II.2.4 SISTEMA TRAQUEAL

A respiração de insetos é um complexo sistema biomecânico, fisiológico e comportamental (BUCK, 1962; BRADLEY, 2007). O corpo de um inseto é completamente provido com um sistema de finos tubos chamados traqueias e traqueólas. Esse sistema abre-se para a atmosfera por meio de poros denominados espiráculos, localizados ao longo da superfície lateral de todo o corpo. As traqueias penetram para dentro do corpo a partir de cada espiráculo e ramificam-se repetidamente, alcançando todas as partes do animal através das finas estruturas formadas pelas traqueólas. Assim, o sistema respiratório dos insetos leva a própria superfície de trocas gasosas para perto de todas as células (RATHKE, 1862; LUBBOCK, 1862; LANDA, 1948; LACOMBE, 1962; WIGGLESWORTH, 1930, 1974; HILL *et al.*, 2011).

A figura 2-13 mostra um esquema da estrutura da traqueia. A traqueia de um inseto desenvolve-se como invaginações da epiderme revestidas com uma fina cutícula, a qual é lançada dentro de uma forma espiral, provendo resistência contra o colapso. O revestimento cutâneo das traqueias tem a mesma composição que cobre a superfície do inseto e os ductos das glândulas dérmicas. A estrutura e a formação da cutícula traqueal no *R. prolixus* foram descritas por LOCKE (1957, 1958). O crescimento e a muda do sistema traqueal em *R. prolixus* foram estudados por WIGGLESWORTH (1954). As traqueias se apresentam em forma de tubos, de calibre variável, e sua parede compõe-se de três camadas (CHAPMAN, 1998; LACOMBE, 1962):

- camada interna denominada íntima: consta de material cuticular quitinizado responsável pela formação do fio em espiral (tenídeo) encontrado no interior das traqueias;
- camada mediana ou matriz: formada por células achatadas da hipoderme que secretam a quitina, elemento formador da parede do tenídeo; e
- camada externa denominada membrana basal: onde repousam as células hipodérmicas, sendo uma formação típica dos tecidos ectodérmicos.

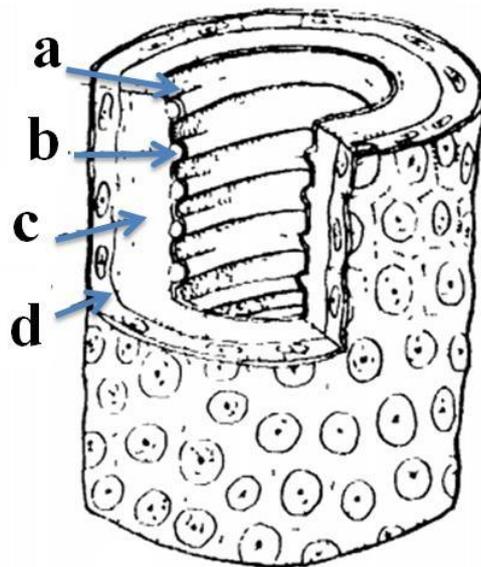


Figura 2-13: Ramo traqueal próximo ao espiráculo: a) íntima; b) tenídeo; c) matriz; d) membrana basal (Adaptado de WIGGLESWORTH, 1974).

As traqueias tornam-se finas com o aumento da distância do espiráculo e finalmente dão origem a túbulos finos terminais de paredes delgadas, denominados

traquéolas, que acredita-se serem os principais sítios de trocas de O₂ e CO₂ com os tecidos (WIGGLESWORTH, 1974; HILL *et al.*, 2011).

As traqueias despertam a atenção de diversos pesquisadores, seja do ponto de vista morfológico, embriológico ou fisiológico (ROCKSTEIN, 1973). A importância de seu estudo tem sido realçada pelo combate aos Triatomíneos, através dos inseticidas voláteis. Conhecer o sistema respiratório dos insetos é fundamental para compreender a penetração de gases tóxicos no seu corpo através do sistema traqueal (HOSKINS, 1940; GEROLT, 1983; DETTNER ETAL., 1992; HARRISON & BONNING, 2010).

CAPITULO III

III MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletados insetos, *Rhodnius prolixus*, de 5º estágio de ninfa da colônia no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Os insetos foram criados e mantidos a uma temperatura de 28 °C com umidade relativa entre 60% e 70% em câmara de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD). As ninfas foram alimentadas através de um adaptador artificial de alimentação desenvolvido no laboratório e descrito por GARCIA *et al.* (1984) como mostra a figura 3-1.



Figura 3-1: Adaptador artificial de alimentação para o *Rhodnius prolixus* (SILVA, 2012).

Os insetos escolhidos, aleatoriamente, foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo (1, 4, 10, 15 e 20 dias) após a alimentação. A nomenclatura utilizada estão descritas na tabela 3-1. Os dias para o sacrifício após a alimentação foram escolhidos considerando o processo de crescimento e muda desses insetos. O sacrifício foi realizado após imobilização a uma temperatura de 4 °C por 10 minutos. A fim de otimizar o processo de fixação dos tecidos, destacados neste trabalho como as estruturas

quitinizadas (faringe, traqueias e cabeça, os insetos foram então, previamente cortados transversalmente na junção entre o protórax e o segmento mesotórax do corpo (Figura 3-2). Para fixação dos tecidos, foi utilizada somente a parte anterior ao protórax de cada inseto. As amostras foram fixadas e mantidas à temperatura ambiente numa 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2.

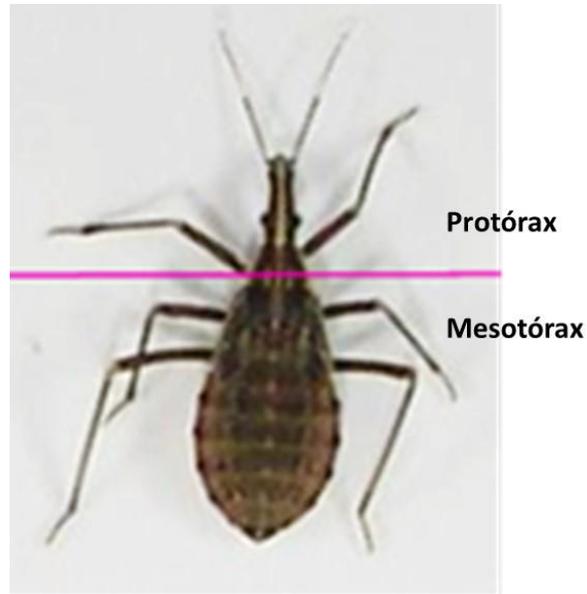


Figura 3-2: Região do corte realizado em ninfa de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* utilizado neste trabalho.

Tabela 3-1: Descrição das amostras do inseto *Rhodnius prolixus* (n=4 para cada grupo).

Amostras	Intervalos de tempo após alimentação (dias)
1D	1
4D	4
10D	10
15D	15
20D	20

III.2 MICROTOMOGRAFIA

III.2.1 MICROTOMÓGRAFO SKYSCAN 1172

Para a realização desse trabalho foi usado o microtomógrafo SkyScan-Bruker 1172 instalado no Laboratório de Análise por Raios X (LARX) da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa na Universidade Estadual de Londrina (UEL). O Skyscan 1172 é um microtomógrafo de bancada composto por (SKYSCAN, 2008):

- Fonte de raios X microfocos que opera no intervalo de de 20 kV até 100 kV, 10W de potência e *spot size* $<5\mu\text{m}$;
- Sistema de detecção composto por uma câmera 12-bit CCD (do inglês *Charge-Coupled Device*) de 11 Mp opticamente acoplada ao cintilador. A detectabilidade é de $1\mu\text{m}$ em alta resolução até $25\mu\text{m}$
- Mesa posicionadora de amostras com geometria adaptável à escolha da melhor magnificação para a medida. Nesta geometria flexível, a mesa pode ser movimentada em relação ao sistema fonte-detector.

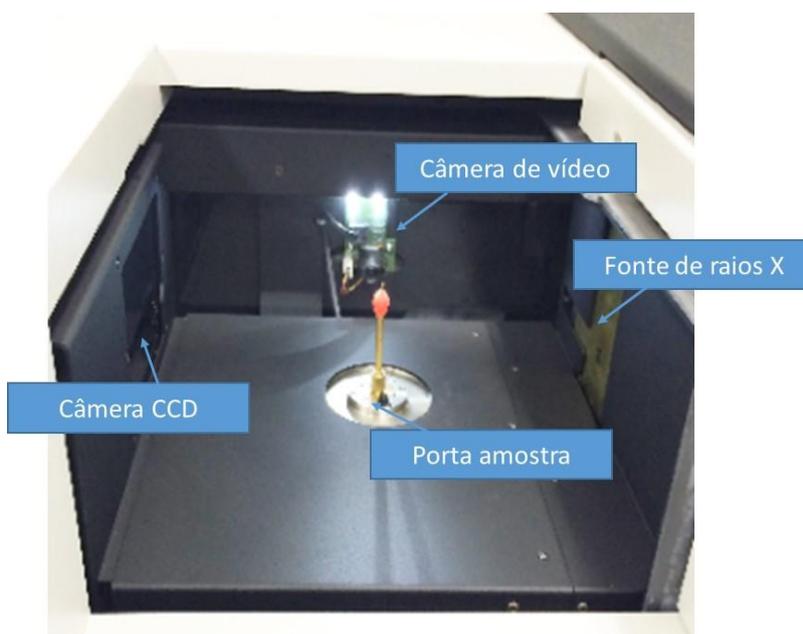


Figura 3-3: Vista interna do microtomógrafo SkyScan 1172 identificando os principais componentes. A câmera de vídeo é utilizada para controle do posicionamento da amostra.

Após a aquisição das imagens o programa NRecon (versão1.6.4.7) foi utilizado para o processo de reconstrução.

III.2.2 PROGRAMA NRecon

Esse programa é responsável por fazer as reconstruções das imagens através de um algoritmo de retroprojeção filtrada, baseado nas imagens microtomográficas adquiridas pelo microtomógrafo SkyScan 1172 (SKYSCAN 1172, 2013). O programa permite a visualização da imagem bidimensional reconstruída para que sejam ajustados alguns parâmetros de reconstrução. Na página principal (figura 3-4) o conjunto de dados é carregado, o intervalo de reconstrução axial é selecionado e o processo de reconstrução pode ser iniciado.

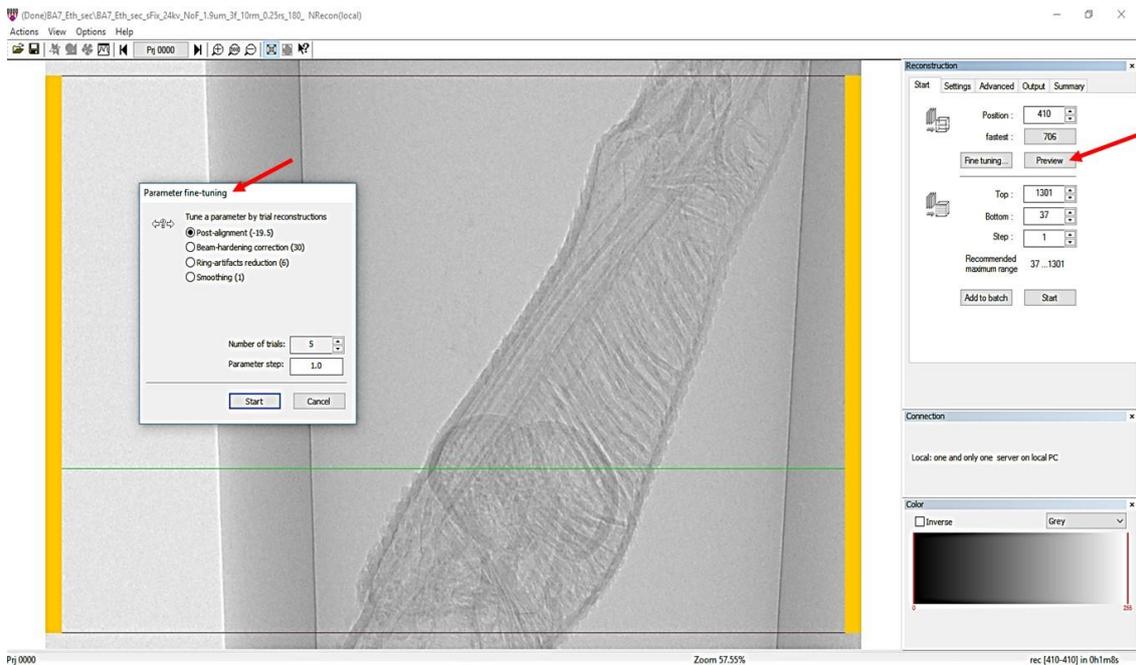


Figura 3-4: Interface do programa NRecon para alinhamento do centro de rotação da amostra. Funções *preview* e *fine-tuning* são indicadas pelas setas.

A função *preview* permite a reconstrução de uma fatia 2D a partir da qual parâmetros de reconstrução podem ser ajustados na função *fine tuning*. Esses parâmetros são:

- Filtro de suavização (*Smoothing*): este parâmetro é aplicado a projeção para suavizar cada pixel de acordo com os seus vizinhos $M \times N$, onde M é a dimensão horizontal e N é a dimensão vertical. Atua utilizando o cálculo da média dos pixels vizinhos, de forma a manter um padrão.
- Alinhamento: que corrige eventuais variações de posição da amostra durante a aquisição das imagens, ou seja, compensa possíveis desalinhamentos durante a

aquisição. É um parâmetro importante, pois o alinhamento errado causaria sombras, dobrando ou embaçando a imagem reconstruída. Compensa as possíveis diferenças entre a projeção atual e a projeção imediatamente oposta a 180°.

- Correção para endurecimento de feixe (*Beam Hardening*): compensa o efeito de endurecimento do feixe por transformação linear, ou seja, compensando a atenuação que ocorre no centro em relação as bordas. Os feixes de raios X são de natureza polienergética que correspondem a um valor de energia mínima até uma energia máxima que dependerá da tensão aplicada pelo sistema. A medida que esse feixe interage com determinados materiais esse se torna “duro”, pois sua energia efetiva aumenta, uma vez que fótons de baixa energia são absorvidos mais rapidamente que os de alta energia. O feixe de raios X ao passar pelo centro de determinada amostra se torna mais “duro” do que na borda da amostra, pois interage com mais materiais, por ser menos atenuado esse feixe chega ao detector mais intenso.

- Remoção de artefato de anel (*Ring Artifact*): corrige os artefatos de anel, provenientes das diferenças de resposta de cada detector da câmara CCD à radiação e *beam hardening*, que diminui o efeito do endurecimento do feixe causado por raios X de baixa energia que são absorvidos pela borda da amostra. Porém, para o objetivo desse trabalho, a janela onde se apresenta o histograma deve ser trabalhada com atenção como mostra a figura 3-5.

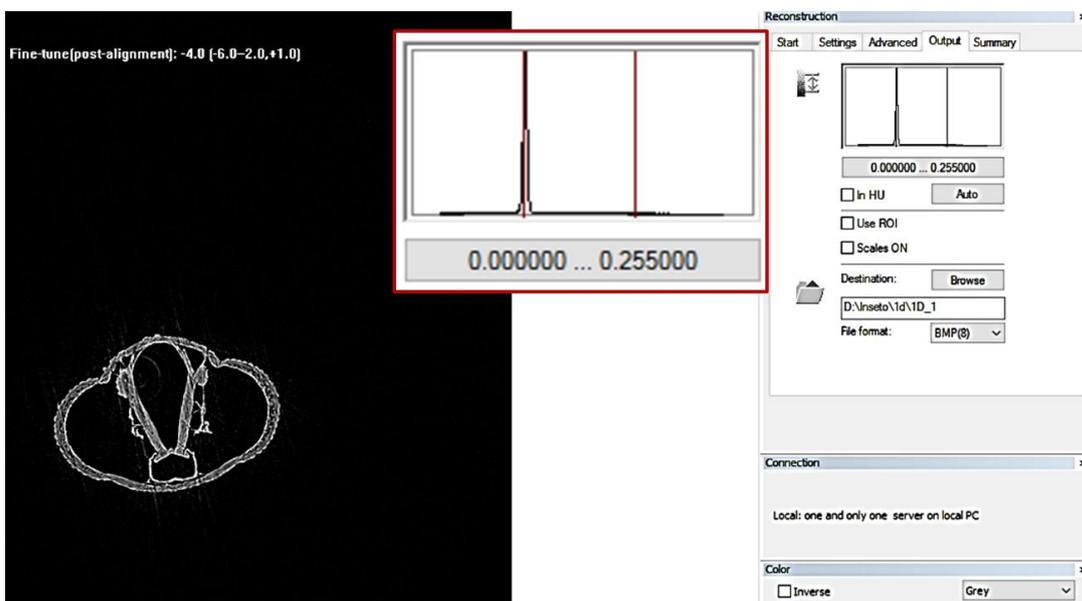


Figura 3-5: Janela do Nrecon com histograma em destaque.

O histograma serve como parâmetro para seleção do limiar das imagens que serão segmentadas. Esse histograma é baseado em apenas uma fatia e, por isso, não apresenta a informação da amostra como um todo. Para a reconstrução, há duas formas de se limitar o histograma: o próprio operador determina um mínimo e um máximo, de acordo com seu interesse ou deixar que o programa determine o máximo/mínimo automaticamente. Neste caso, o máximo/mínimo foram determinado pelo programa automaticamente.

Os passos deste padrão de reconstrução são descritos no fluxograma a seguir (figura 3-6) desde a transformada de Fourier até chegar a retroprojeção. Basicamente, o algoritmo de reconstrução, composto de uma sequência de instrução matemáticas converte os sinais medidos pelos detectores em uma imagem.

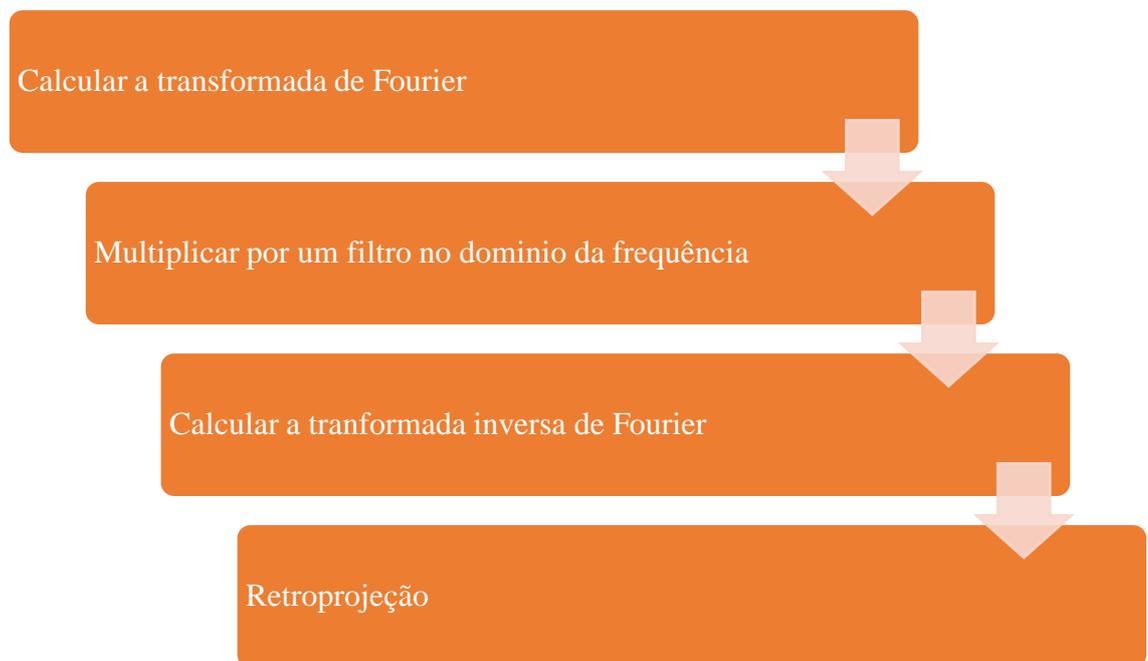


Figura 3-6: Processo de reconstrução tomográfica.

III.2.3 PROGRAMA DE ANALISE MORFOLÓGICA – CTAn

O programa CT Analyser (CTAn) versão 1.14.4.1 (SKYSCAN 1172, 2011), desenvolvido e comercializado pelo próprio fabricante, permite quantificar vários parâmetros como por exemplo, o volume referente as imagens. Nesse estudo ele foi utilizado para calcular o volume total no Volume de Interesse (VOI) da faringe e traqueia do inseto *Rhodnius prolixus*. A figura 3-7 apresenta um esquema evidenciando a sequência de aquisição, reconstrução e escolha da ROI.

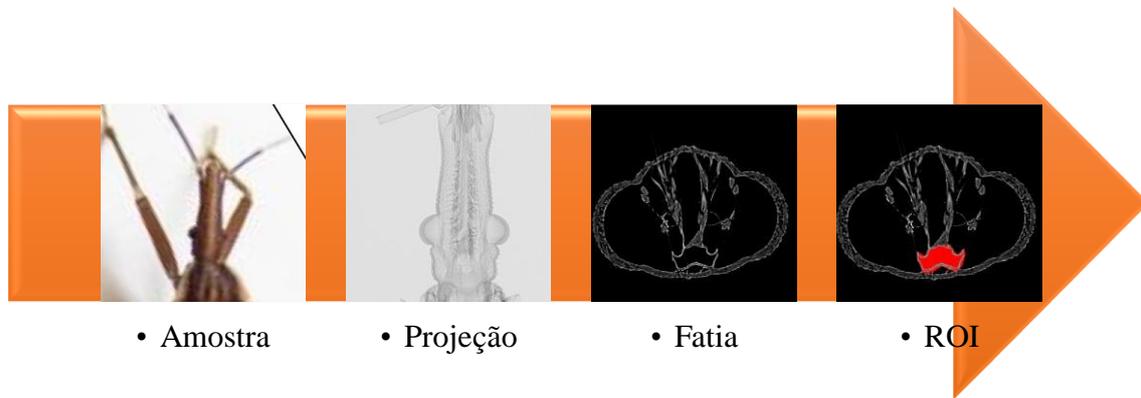


Figura 3-7: Sequência de aquisição até obtenção da ROI.

O CTAn é uma aplicação para medida de parâmetros quantitativos e construção de modelos visuais a partir dos dados 3D obtidos pelo SkyScan micro-CT. A medição quantitativa é feita pela morfometria, baseada na segmentação da imagem (preto e branco). A delimitação do volume de interesse (VOI) é possível através de ferramentas flexíveis, um ponto de partida para todas as análises quantitativas 3D. Conjuntos de dados modificados podem ser reescritos como novos conjuntos a partir do CT-An. A figura 3-8 mostra um fluxograma para a obtenção dos dados quantitativos.



Figura 3-8: Processo de aquisição dos dados da análise quantitativa 3D.

As imagens 2D são imagens das seções transversais da amostra, esse é considerado o dado bruto ou de entrada. O próximo passo é selecionar a ROI, como a faringe e traqueia, depois binarizar as estruturas, ou seja, transformar a imagem em

branco e preto. Na morfometria são obtidos os dados matemáticos da forma da amostra, enquanto no processo personalizado é selecionado os parâmetros do VOI como o volume.

III.2.3.1 SEGMENTAÇÃO BINÁRIA

A segmentação de imagens consiste em particionar uma imagem, de acordo com algum critério de uniformidade, em regiões ou partes homogêneas, o que pode representar um ou mais objetos de interesse. Aqui, uma ROI no plano transaxial reconstruído (x-y) deve ser designada, tornando possível a avaliação. Os métodos mais simples de limiarização utilizam um único ponto de corte também conhecido como *threshold* (TH). Em alguns casos, não se consegue apenas um limiar que resulte em uma boa segmentação para toda a imagem. Para esses casos existem técnicas de limiarização variáveis e multiníveis baseadas em medidas estatísticas (BRYAN, 2000). No caso deste trabalho, foram identificadas e quantificadas, as regiões do lúmen e parede das estruturas, faringe e traqueia. Como exemplo, a figura 3-9 mostra o histograma usado e o resultado da segmentação, com a respectiva ROI referente à faringe.

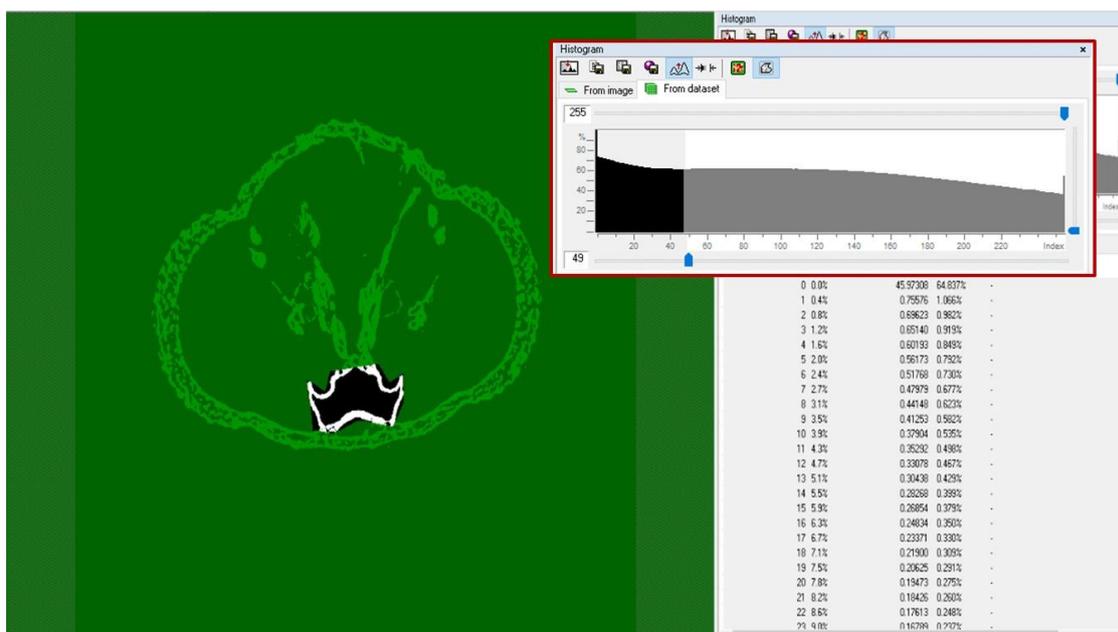


Figura 3-9: Janela do CTAn com histograma da segmentação da faringe.

Existem várias abordagens para a segmentação das imagens digitais, no entanto, não existe um método consagrado, assim, neste trabalho foi utilizado o TH global. O TH global é uma metodologia rotineira e usual que atribui valores aos pixels na imagem bidimensional (2D), seções transversais, é baseado na estimativa de um limiar global a

partir do histograma de intensidade da imagem, sendo um processo mais rápido (OTSU, 1979; VALA & BAXI, 2013).

Para a escolha do TH global, um estudo comparativo é realizado entre as imagens originais, em tons de cinza, e as novas imagens já binarizadas, em preto e branco. Matematicamente, TH global pode ser definido pela equação 23.

$$G(x,y) = \begin{cases} 1, & \text{se } f(x,y) \geq T \\ 0, & \text{Contrário} \end{cases} \quad (32)$$

Onde: $f(x,y)$ – imagem de entrada; T – valor do limiar (TH) e $g(x,y)$ – imagem de saída, segmentada. Quando T for encontrado, a imagem será transformada numa imagem binária, e assim o conjunto de dados será capaz de ser avaliado (GONZALES & WOODS, 2010).

Dessa forma, é possível separar lúmen em preto e parede em branco, permitindo assim a quantificação do volume da faringe e traqueia, a figura 3-10 é um exemplo desta segmentação.

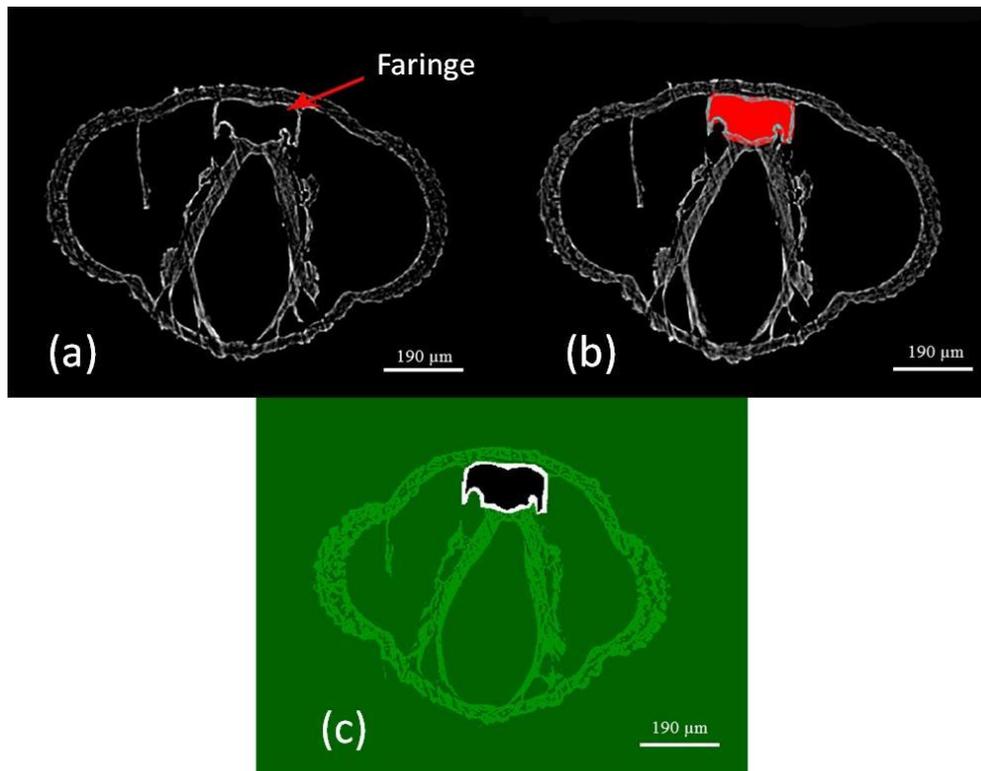


Figura 3-10: Esquema para as análises quantitativas da faringe. (a) Fatia 598 da amostra da faringe; (b) Em vermelho ROI selecionada; (c) Binarização da faringe.

Qualquer objeto pode ser escolhido para ser evidenciado na binarização através do método global, desde que tenha contraste suficiente na imagem. Desta forma, foram destacadas a região de maior densidade, a parede da estrutura da faringe, apresentados através dos pixels brancos e o lúmen na imagem foi representada por pixels pretos, sendo este a matriz remanescente.

III.2.3.2 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

Os parâmetros morfométricos *bone volume* (BV) e o *total volume* (TV) foram calculados pelo programa CTAn[®]. Estes parâmetros dependem do volume a ser estudado totalmente contido dentro de uma região bem definida.

Para a definição da ROI, é escolhido o intervalo de fatias a ser considerado, o que é realizado através da definição dos parâmetros *Top* e *Bottom*. Como padrão, definiu-se *Top* como a primeira fatia selecionada, escolhida passando 10 fatias acima dos olhos composto do inseto, e *Bottom*, 20 fatias abaixo do olho composto. A ROI foi composta de uma quantidade de 300 fatias e depois disso, uma figura geométrica na forma de um polígono foi selecionada (figura 3-11) para propiciar a interpolação das ROIs para fazê-las unidas em uma só estrutura, para permitir o cálculo dos índices volumétricos.

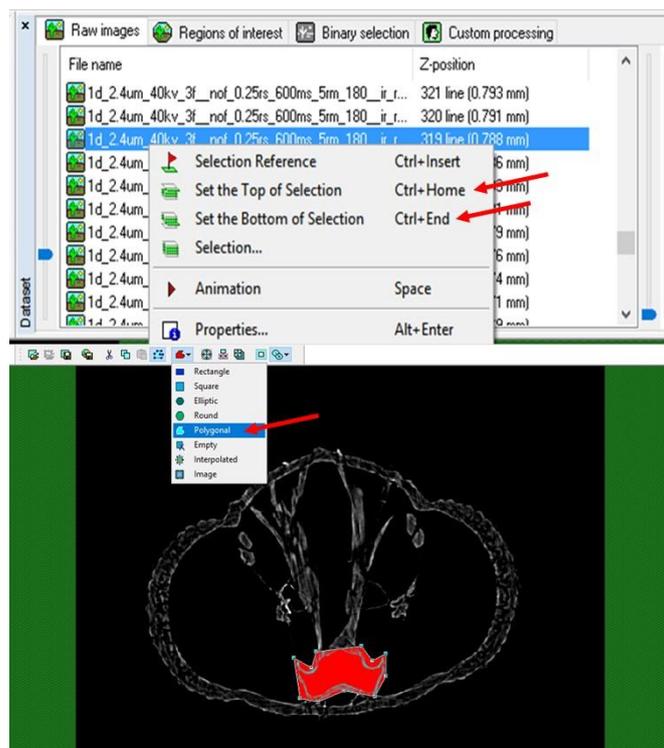


Figura 3-11: Janela do CTAn com setas indicando os parâmetros *Top* e *Bottom* e com a seleção da geometria da ROI.

Foi criada uma lista de tarefas (*task list*), onde constam todos os passos para a obtenção de todos os dados de quantificação. Na figura 3-12 apresentam a lista utilizada neste trabalho.

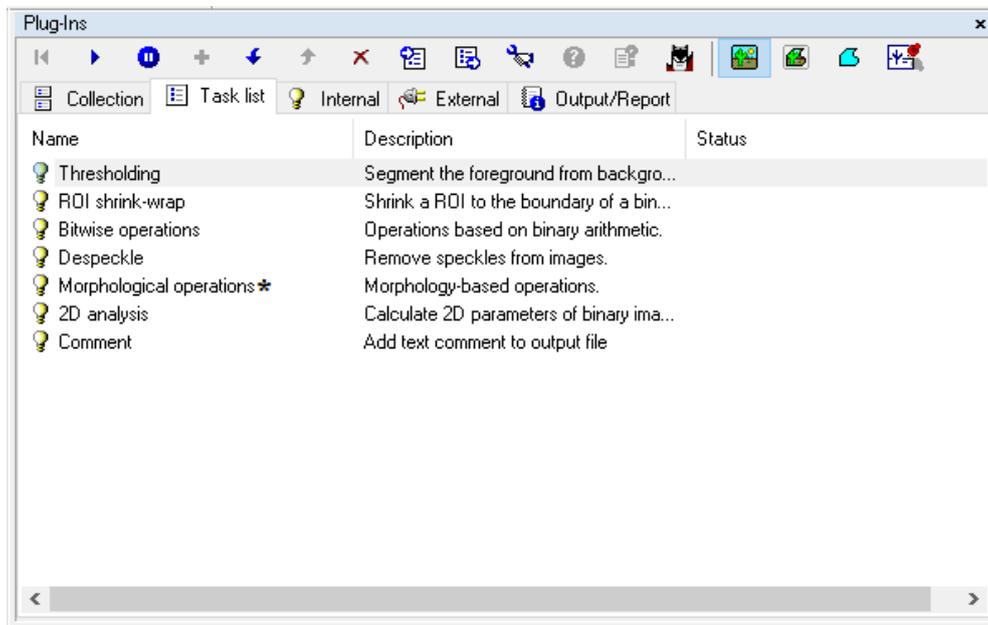


Figura 3-12: Lista de tarefas aplicada com a função *Morphological operations* apenas na traqueia.

Neste passo é importante ressaltar que como as amostras serem irregulares, utilizou-se o plug-in ROI *shrink-wrap*. Esse *plug-in* oferece uma maneira de fazer a ROI/VOI exatamente seguindo o contorno do objeto segmentado. Isto permite, usar o perímetro do objeto como região de referência, como o volume.

Os modelos 3D para as análises qualitativas foram gerados utilizando o programa Avizo versão 8 (AVIZO, 2013). Esse programa trabalha com a renderização de volume, que é uma técnica de visualização 3D que trabalha diretamente sobre os dados de volume.

CAPÍTULO IV

IV RESULTADOS E DISCUSSÕES

Desde 2012, estruturas internas do *Rhodnius prolixus* têm sido identificadas utilizando microtomografia por contraste de fase usando luz síncrotron (ALMEIDA et al, 2012a, 2012b, 2014; ALMEIDA, 2013; SENA et al 2014, 2015, 2016; SENA, 2015). Como continuidade dessa linha de pesquisa, neste capítulo serão apresentados os primeiros resultados qualitativos e quantitativos referentes à observação da faringe e traqueia do *Rhodnius prolixus*. As imagens tridimensionais foram obtidas utilizando o microtomografo SkyScan 1172 (BRUKER, 2015) com feixe de raios X policromático em geometria cônica com resolução de 2,47 μm . A tabela 4-1 apresenta os parâmetros otimizados utilizados para a aquisição das imagens.

Tabela 4-1: Principais parâmetros escolhidos para realização das tomografias.

Parâmetros	Unidade	Valor
Tensão	kV	40
Corrente	μA	250
Distância Fonte-Objeto	mm	46,69
Distância Fonte-Detector	mm	339,88
Tamanho do Pixel nas Seções Transversais	μm	2,47
Resolução das Seções Transversais	pixel	1000x1000
Tamanho do Pixel Câmera	μm	8,99
Duração do Escaneamento	minuto	41

As imagens apresentadas foram obtidas através da reconstrução de 720 projeções (passo angular igual a $0,25^\circ$) usando o programa NRecon. Para reconstrução de cada volume 3D foram geradas 1333 imagens transversais (slices) no formato TIF/8 bits com resolução de 2,47 μm .

As imagens tomográficas obtidas sofreram um processo de segmentação binária para a estimativa dos volumes das regiões claras e, posteriormente, selecionando-se uma região de interesse (ROI) para a obtenção dos volumes (VOI) da faringe e traqueia. A ROI se refere a uma fatia transversal enquanto que o VOI se refere a soma de todas as fatias transversais representando um volume a partir do qual as avaliações foram feitas (SKYSCAN 1172, 2013). Os volumes 3D foram gerados utilizando o programa Avizo versão 8 (AVIZO, 2013).

IV.1 VOLUME DA FARINGE

Em 2014, SENA *et al.* observaram qualitativamente a variação na dimensão da faringe considerando insetos sacrificados após 4 e 10 dias da alimentação em comparação com os de controle (não alimentados). Para avaliar quantitativamente essa variação, neste trabalho, o conjunto de imagens 2D de cada tomografia foi agrupado em pilhas contendo um total de 1333 fatias gerando a imagem 3D que foram reconstruídas para todos os insetos. O programa CT Analyser (CTAn) versão 1.14.4.1 (SKYSCAN 1172, 2011) foi utilizado para calcular o volume total da faringe de cada grupo de amostras. A figura 4-1(a) mostra, como exemplo, o volume reconstruído da cabeça de um inseto do grupo 4D. As figuras 4-1(b) e (c) mostram a faringe destacada após o processo de binarização da imagem.

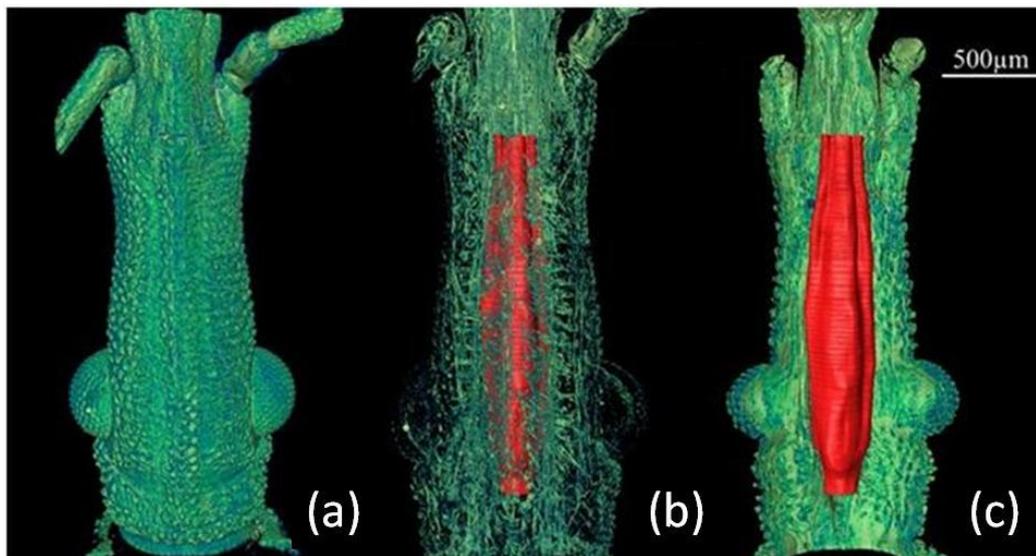


Figura 4-1: Volume 3D renderizado da cabeça de um inseto do grupo 4D: (a) visualização da estrutura externa, (b) identificação da faringe em transparência e (c) vista dorsal com faringe em destaque na cor vermelha.

A figura 4-2(a) mostra a seção virtual transversal da cabeça do mesmo inseto realçando (em vermelho) a estrutura da faringe dentro da cápsula da cabeça. O volume reconstruído da faringe é apresentado, isoladamente, na figura 4-2(b).

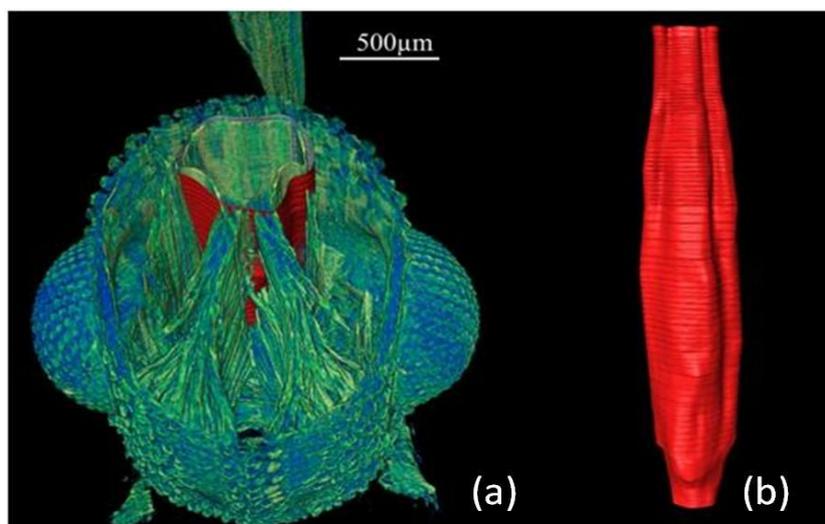


Figura 4-2: (a) Vista transversal da cabeça de um inseto do grupo 4D com realce da faringe em vermelho. (b) Volume renderizado da faringe em destaque.

Os valores calculados para o volume da faringe de cada inseto em cada grupo são mostrados na tabela 4-2. A Figura 4-3 mostra graficamente os resultados encontrados para os valores médios (\pm desvio padrão) calculados por grupo em função do tempo após a alimentação. Para todas as amostras foram utilizados os testes estatísticos ANOVA e pós teste Tukey com diferença significativa de $p < 0,10$ (nível de significância $\alpha = 10\%$).

Tabela 4-2: Volumes (mm^3) calculados da faringe (média \pm desvio padrão) de cada inseto por grupo ($n=4$).

Insetos	Grupos				
	1D	4D	10D	15D	20D
1	0,0528	0,0252	0,0576	0,0058	0,0012
2	0,0419	0,0712	0,0903	0,0361	0,0015
3	0,0661	0,0403	0,0767	0,0059	0,0810
4	0,0686	0,0809	0,0265	0,0146	0,0022
Média	0,0574	0,0544	0,0628	0,0156	0,0215
Desvio padrão	0,0124	0,0261	0,0276	0,0143	0,0397

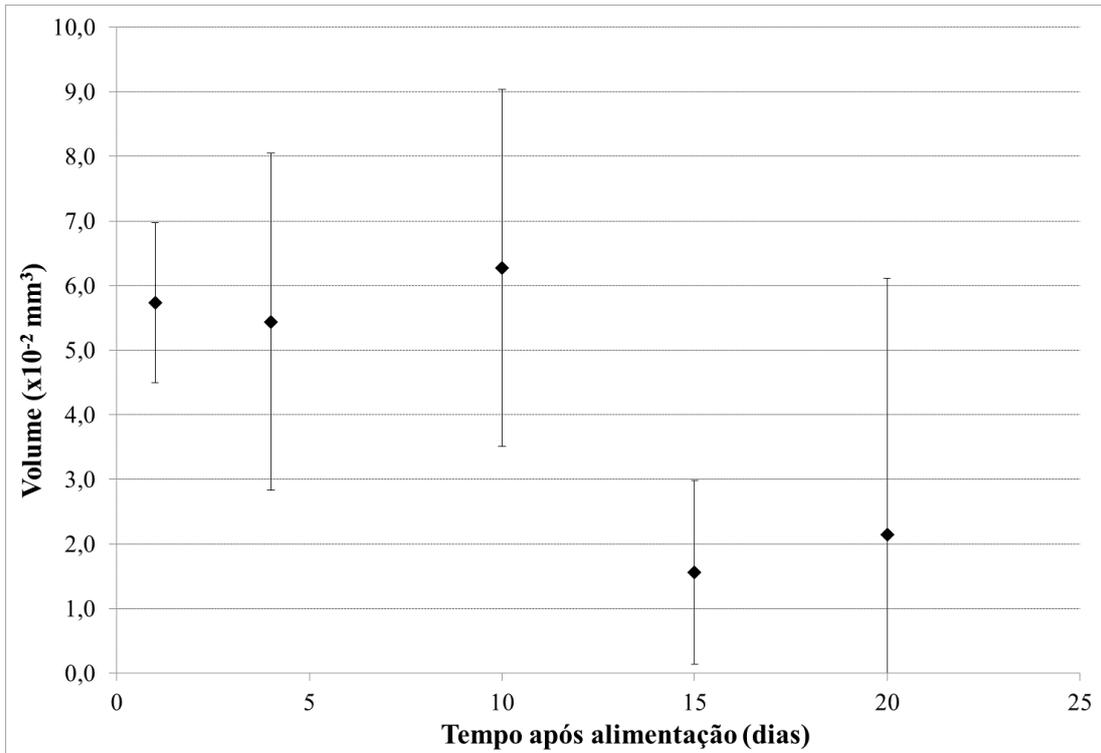


Figura 4-3: Volume médio calculado (mm³) da faringe em função do tempo (em dias) após a alimentação.

Não se verificou diferença significativa ($p=0,87$) entre os três primeiros grupos (1D, 4D e 10D) e nem entre os dois últimos (15D e 20D) ($p=0,79$). No entanto, os resultados mostram que os volumes médios da faringe diminuíram cerca de 3,8 vezes entre os grupos 1D e 15D, com $p=0,06$. Pode-se relacionar essa variação entre os volumes médios calculados com o ciclo biológico do inseto e o pico de produção da ecdisona, conforme descrito no item II.2.2. Assim, este comportamento pode estar relacionado com um pico de ecdisona no meio do processo de muda, por volta do 11^o dia (BAHER *et al.*, 1978).

IV.2 VOLUME DA TRAQUEIA

Em 2015, SENA *et al.* observaram a traqueia do *Rhodnius prolixus*, pela primeira vez, usando radiação síncrotron e feixe policromático. O estudo das modificações da estrutura da traqueia é muito importante para compreender as transformações deste órgão durante processo de muda do inseto (WIGGLESWORTH, 1990, 1991; SOCHA, FORSTER & GREENLEE, 2010; SNELLING, 2011). Neste trabalho, a possível variação do volume da traqueia em função de diferentes intervalos de tempo após a alimentação foi avaliada quantitativamente.

A figura 4-4(a) mostra, como exemplo, o volume reconstruído da cabeça de um inseto do grupo 10D destacando os dois troncos da traqueia segmentados em azul. As figuras 4-4(b) e (c) mostram os troncos direito e esquerdo da traqueia, respectivamente, em corte sagital da mesma cabeça.

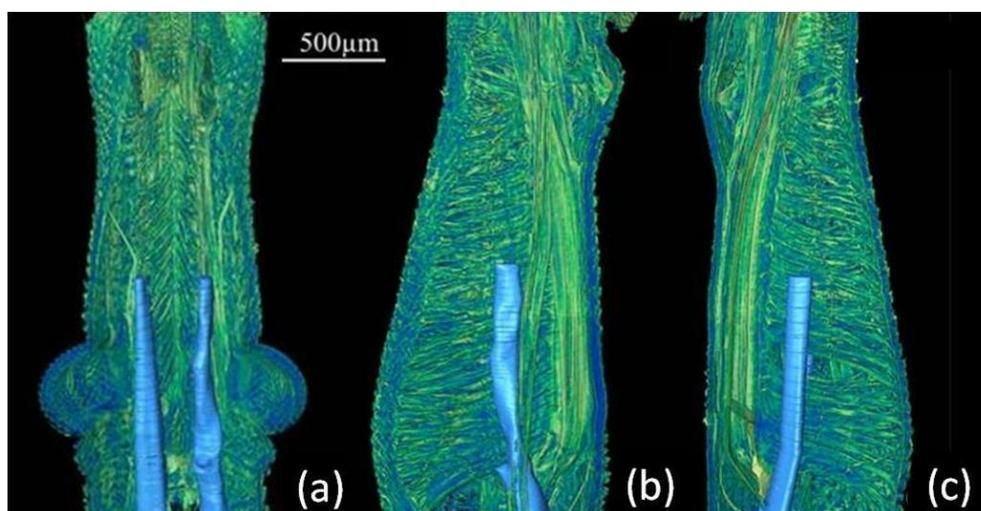


Figura 4-4: (a) Vista dorsal do volume 3D renderizado da cabeça de um inseto do grupo 10D com traqueia em azul. Corte sagital com realce da traqueia direita (b) em (c) esquerda.

A figura 4-5(a) mostra a seção virtual transversal da cabeça do mesmo inseto indicando a estrutura da faringe dentro da cápsula da cabeça. O volume reconstruído das traqueias direita e esquerda são apresentados, isoladamente, na figura 4-5(b).

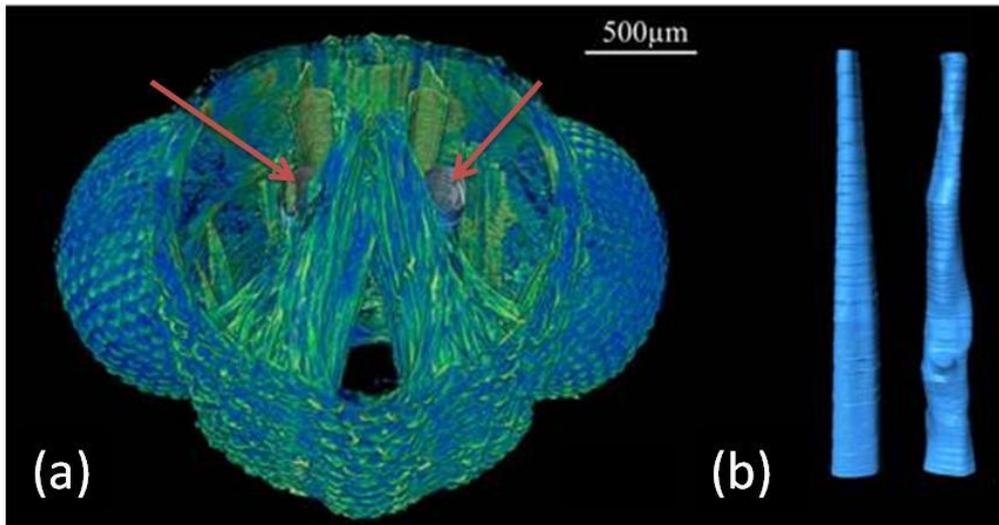


Figura 4-7: (a) Vista transversal da cabeça de um inseto do grupo 10D com traqueias indicadas pelas setas. (b) Volume renderizado da traqueia em destaque.

As tabelas 4-3 e 4-4 mostram os resultados calculados, respectivamente, para o volume dos troncos da traqueia direita e esquerda de cada inseto em cada grupo. A Figura 4-5 mostra graficamente os resultados encontrados para os valores médios (\pm desvio padrão) dos volumes de ambos os troncos traqueais calculados por grupo em função do tempo após a alimentação.

Tabela 4-3: Volumes (mm^3) calculados da traqueia direita (média \pm desvio padrão) de cada inseto por grupo (n=4).

Insetos	Grupos				
	1D	4D	10D	15D	20D
1	0,0056	0,0066	0,0082	0,0104	0,0115
2	0,0091	0,0048	0,0136	0,0218	0,0126
3	0,0062	0,0114	0,0075	0,0199	0,0156
4	0,0122	0,0180	0,0095	0,0166	0,0164
Média	0,0083	0,0102	0,0097	0,0172	0,0140
Desvio padrão	0,0030	0,0059	0,0027	0,0050	0,0023

Tabela 4-4: Volumes (mm³) calculados da traqueia esquerda (média ± desvio padrão) de cada inseto por grupo (n=4).

Grupos					
Insetos	1D	4D	10D	15D	20D
1	0,0096	0,0053	0,0065	0,0104	0,0114
2	0,0099	0,0066	0,0138	0,0188	0,0126
3	0,0107	0,0146	0,0079	0,0192	0,0147
4	0,0116	0,0171	0,0117	0,0159	0,0137
Média	0,0105	0,0109	0,0100	0,0161	0,0131
Desvio padrão	0,0009	0,0058	0,0034	0,0040	0,0014

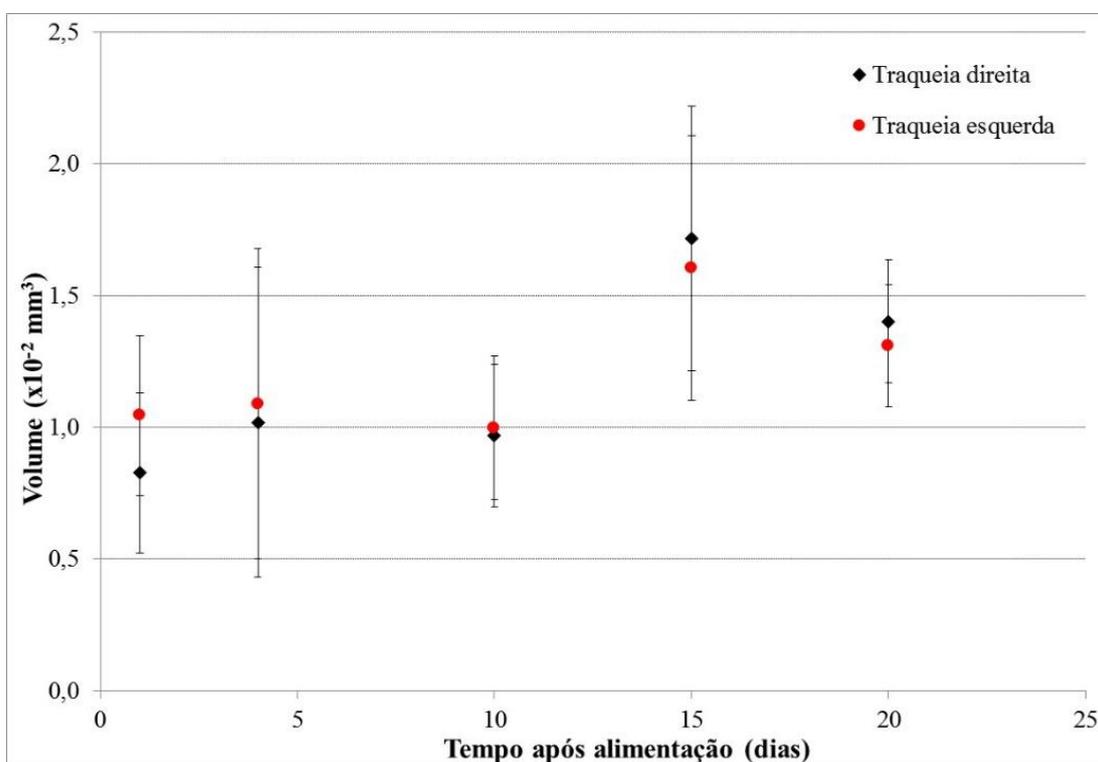


Figura 4-8: Volume médio calculado (mm³) das traqueias direita e esquerda em função do tempo (em dias) após a alimentação.

Observando os resultados apresentados nas tabelas 4-3 e 4-4 e na figura 4-8 pode-se notar que os valores dos volumes médios das traqueias direita e esquerda não apresentam diferenças significativas ($p > 0,20$). Além disso, assim como para faringe, não se verificou diferença significativa ($p = 0,80$) entre os três primeiros grupos (1D, 4D e 10D) nem entre os dois últimos (15D e 20D) ($p = 0,30$). No entanto, ao contrário do

que se observou para faringe, os resultados mostram que os volumes médios da traqueia aumentaram cerca de 1,78 vezes entre os grupos 1D e 15D, com $p=0,06$. Novamente, pode-se supor que esse comportamento esteja relacionado com o pico de ecdisona após o período crítico cerebral que varia entre o 6º e o 9º dia, dependendo da duração do estágio ninfal (STOKA & NORIEGA, 1987; GONZALEZ, 1992).

As variações de volume encontradas podem ser devidas à metamorfose que ocorre na cutícula, uma fina camada extracelular de proteínas e quitina recobrimo as células epidermais. Estas células, quando estimuladas pela 20-hidroxi-ecdisona (20-OH-Ec), ativam-se metabolicamente, crescem e secretam enzimas degradativas que dissociam os componentes da cutícula (cerca de 10 dias após a alimentação). As proteínas e a quitina são então, reabsorvidas e recicladas (COUDRON *et al.*, 1981), resultando na eliminação da cutícula velha e síntese de uma nova cutícula mais ampla que permite o crescimento corpóreo do inseto (WIGGLESWORTH, 1972). A discussão mais detalhada sobre o ciclo biológico do *Rhodnius prolixus* foi feita no item II.2.2.

Os resultados obtidos para os volumes médios da faringe e traqueia desses insetos confirmam as observações de WIGGLESWORTH (1972). Diferentes partes do corpo possuem diferentes capacidades de crescimento e, ainda que as diferenças locais na atividade de crescimento estão correlacionadas com as diferenças na absorção de hormônio de modo que, a forma visível do organismo é precedida por um padrão invisível de "capacidade de crescimento". Mas não é o suprimento de hormônio sozinho que limita a quantidade de crescimento. Existem muitos outros fatores nutricionais que podem fixar um limite para a quantidade de crescimento que pode ser alcançado em um determinado período. Todos esses fatores estão igualmente disponíveis para todas as partes do corpo, proporcionalmente à sua capacidade de crescimento. Assim, se qualquer um desses fatores estabelecer um limite para a quantidade de crescimento, ele terá um efeito integrado ou proporcional em todas as partes do corpo (GONZALEZ, 1992).

Certas leis parecem governar a mudança de tamanho ou proporções do corpo que ocorrem na muda e metamorfose. A primeira dessas leis foi proposta por DYAR (1890), que apontou que a largura da cabeça nas lagartas aumenta com uma proporção bastante constante em cada muda, uma proporção que varia de espécie para espécie, mas geralmente é de 1,4. Este método foi aplicado de forma bastante geral a muitas partes de larvas de insetos.

Deste modo, optou-se, neste trabalho, por buscar uma relação de proporcionalidade (se houver) entre os volumes calculados para faringe e traqueia e o volume total da cabeça do *Rhodnius prolixus*.

IV.3 VOLUME TOTAL DA CABEÇA

Análises morfométricas do *Rhodnius prolixus* têm sido amplamente estudadas para a diferenciação populacional, reclassificação de indivíduos de cada espécie, vigilância entomológica, dimorfismo sexual, variações ontogenéticas (DUJARDIN *et al.*, 1997; JARAMILLO *et al.*, 2002; SCHACHTER-BROIDE *et al.*, 2004; FELICIANGELI *et al.*, 2007; GURGEL-GONÇALVES, 2008; RIAÑO *et al.*, 2009; OROPEZA *et al.*, 2017). A tabela 4-5 mostra os valores calculados para o volume total da cabeça de cada inseto para cada grupo analisado. A figura 4-9 mostra o resultado gráfico dessas medidas.

Tabela 4-5: Volumes (mm³) calculados da cabeça (média ± desvio padrão) de cada inseto por grupo (n=4).

Insetos	Grupos				
	1D	4D	10D	15D	20D
1	0,5984	0,3001	0,3599	1,3145	1,3789
2	0,7746	0,6303	0,4654	1,2222	1,3041
3	0,7407	0,5663	0,5344	1,0657	0,5784
4	0,5528	0,2025	0,5684	1,0262	0,5784
Média	0,6666	0,4248	0,4820	1,1571	0,9599
Desvio padrão	0,1076	0,2059	0,0920	0,1348	0,4416

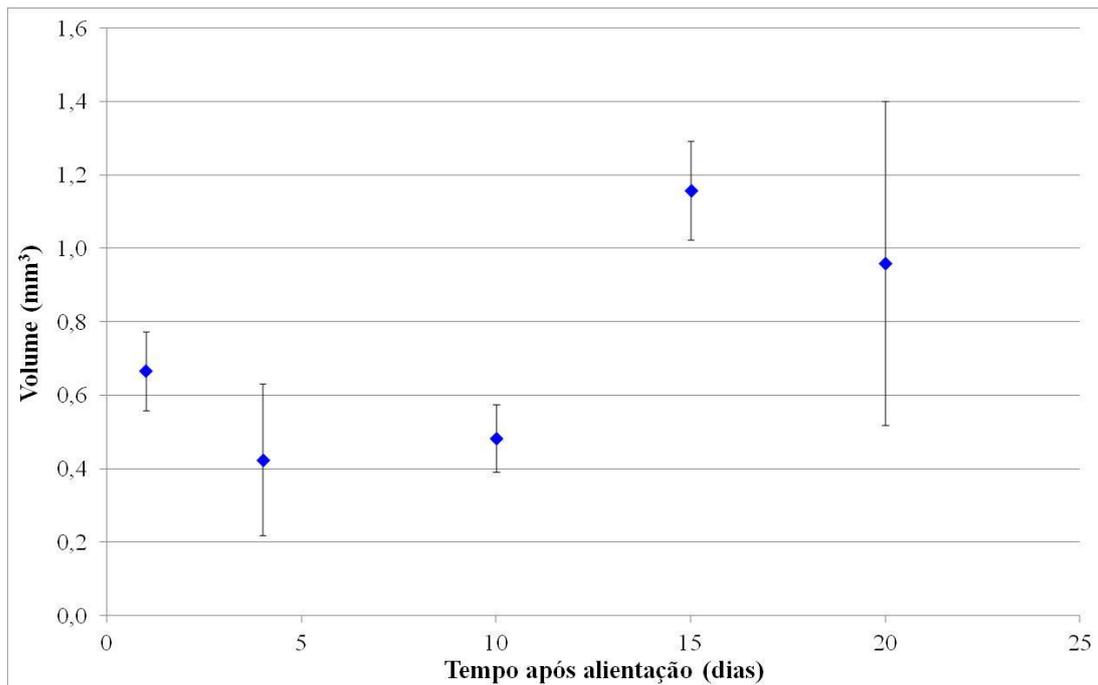


Figura 4-8: Volume total médio calculado (mm³) da cabeça em função do tempo (em dias) após a alimentação.

Esses resultados mostram que o volume total da cabeça dos insetos analisados se comporta similarmente ao volume das traqueias, isto é, os volumes totais médios da cabeça aumentaram cerca de 1,73 vezes entre os grupos 1D e 15D, com $p < 0,01$. Assim como para as estruturas anteriores, não se verificou diferença significativa ($p < 0,10$) entre os três primeiros grupos (1D, 4D e 10D) nem entre os dois últimos (15D e 20D) ($p = 0,42$).

Uma observação interessante pode ser feita a partir da razão calculada entre os volumes das estruturas e o volume total da cabeça. Para faringe, a razão diminuiu em cerca de 15% entre o 1º e o 15º dia após a alimentação ($p > 0,05$). Logo, pode-se sugerir que houve variação na proporção entre a faringe e a cabeça do inseto. Esse resultado pode estar relacionado com fato que, durante o ato da alimentação, o diâmetro do canal da faringe varia em função da atividade de sucção exercida pela bomba faringiana (BENNET-CLARK, 1963; SMITH, 1979). Neste sentido, há necessidade da plasticidade do canal, o que pode ser visualizado na figura 4-9.

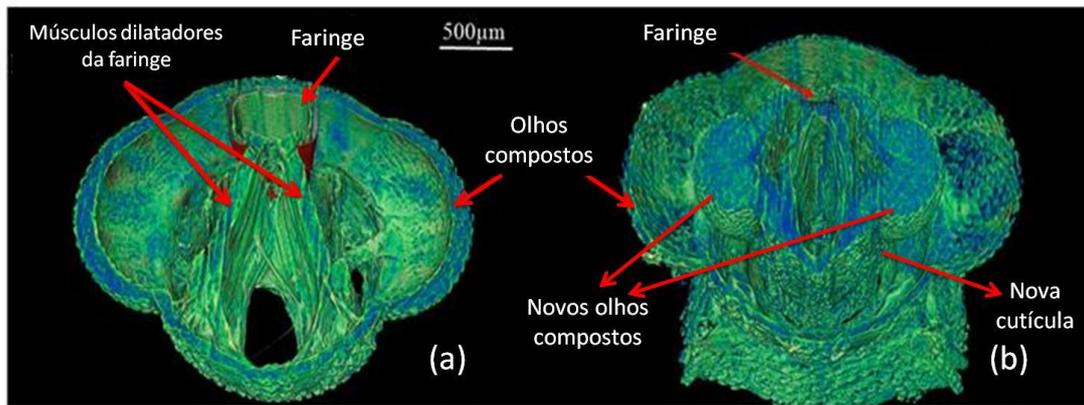


Figura 4-9: Corte transversal do volume 3D renderizado da cabeça do inseto indicando a variação da dimensão da faringe para um inseto típico do grupo (a) 1D e (b) 15D. Setas indicam outras importantes estruturas que podem ser visualizadas.

Para traqueia, a razão se manteve constante por todo o período analisado ($p=0,47$), isto é, cabeça e as traqueias aumentaram na mesma proporção. A figura 4-10 mostra esse comportamento para insetos típicos dos grupos 1D e 15D.

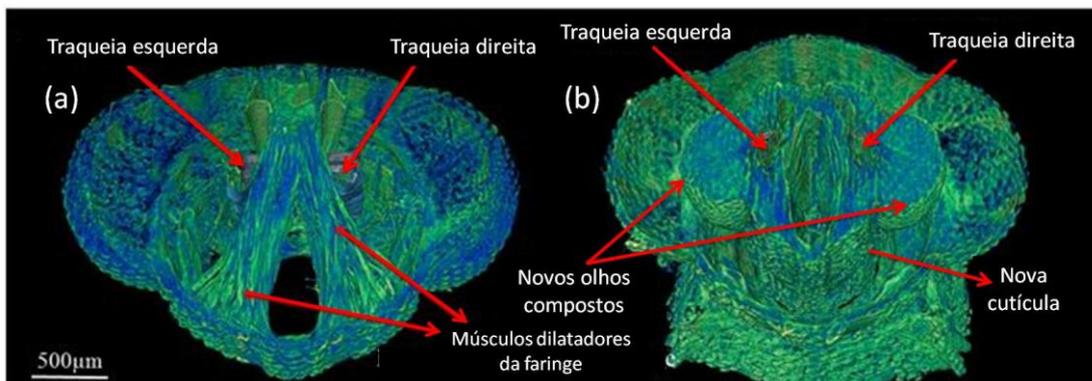


Figura 4-10: Corte transversal do volume 3D renderizado da cabeça do inseto indicando as traqueias para um inseto típico do grupo (a) 1D e (b) 15D. Setas indicam outras importantes estruturas que podem ser visualizadas.

Observando as figuras 4-9(b) e 4-10(b) nota-se a presença da nova cutícula e os novos olhos compostos. A cutícula (exoesqueleto) e a epiderme anexada são alguns dos maiores e mais importantes órgãos do corpo dos insetos. A cutícula é definida como uma montagem supramolecular de quitina, proteína, minerais, lipídios, pigmentos, água e outros componentes que determinam a forma do corpo e permitem que o inseto cresça, se mova, se comunique, se reproduza e enfrente de perigos ambientais como predadores, patógenos e substâncias tóxicas. Como consequência da rigidez do exoesqueleto, os insetos devem formar novas cutículas, eliminando as antigas

periodicamente para crescer e se desenvolver em larvas maiores, pupas ou adultos. A estabilização de uma nova cutícula e a desestabilização da antiga são eventos críticos no processo de muda (WIGGLESWORTH, 1933; CARVAVALHO *et al.*, 1997; WIGGLESWORTH, 1972; KRAMER & KOGA, 1986; GONZALEZ, 1992). O período intermuda foi visto pela primeira vez para o *Rhodnius prolixus* usando microtomografia por SENA *et al.* (2016b).

CAPÍTULO IV

IV CONCLUSÃO

Rhodnius prolixus é uma das 140 espécies de insetos de triatomíneos encontrados na América Latina e no sul dos Estados Unidos, que atuam como vetores dos parasitas protozoários hemoflagelados, *Trypanossoma cruzi* e *Trypanossoma rangeli*. A infecção por *T. cruzi* ocorre após uma refeição de sangue pelo inseto vetor e resulta na transmissão da doença de Chagas ao hospedeiro humano, uma condição devastadora e muitas vezes fatal do coração e intestino. *R. prolixus* também é um bom modelo de laboratório para doença de Chagas e estudos biológicos básicos por causa da facilidade com que é criado, ciclo de vida comparativamente curto e mudanças bioquímicas e fisiológicas notáveis após uma refeição de sangue.

A microtomografia computadorizada se apresenta como uma técnica não destrutiva eficiente para análise quantitativa e qualitativa da estrutura e anatomia de organismos biológicos. Neste trabalho, pela primeira vez, um microtomógrafo de bancada foi utilizado para determinação quantitativa dos volumes de duas importantes estruturas internas do *R. prolixus*: faringe e traqueia. O alto teor de quitina dessas estruturas facilita um melhor contraste nas imagens, revelando bordas detalhadas o que permitiu a segmentação e, em consequência, o cálculo dos volumes da faringe e dos dois troncos traqueais visualizados.

O processo cíclico de crescimento, muda, metamorfose, desenvolvimento ovariano e da capacidade reprodutiva nos insetos é basicamente controlado por diferentes hormônios tais como o protoracicotrópico (hormônio cerebral), o juvenil (hormônio inibidor) e ecdisona (hormônio da muda) (WIGGLESWORTH, 1972). No *R. prolixus* são observados dois picos de ecdisona antes de cada muda. O primeiro ocorre um dia após a alimentação, com um pequeno aumento da concentração de ecdisona na hemolinfa, enquanto que o segundo, bem maior, ocorre no meio do processo de muda.

Os valores calculados para os volumes médios da faringe e dos dois troncos traqueais não apresentaram diferenças significativas entre os três primeiros grupos (1D, 4D e 10D) e nem entre os dois últimos (15D e 20D). O mesmo comportamento foi verificado para o volume total da cápsula da cabeça dos insetos. Importante ressaltar a

necessidade de aumento do tamanho de amostra (n) com o objetivo de diminuir o desvio padrão encontrado.

Os resultados mostram ainda que os volumes médios da faringe diminuíram cerca de 3,80 vezes entre os grupos 1D e 15D ($p=0,06$). No entanto, ao contrário do que se observou para faringe, os resultados mostram que os volumes médios da traqueia aumentaram cerca de 1,78 vezes entre os grupos 1D e 15D ($p=0,06$). Os volumes totais médios da cabeça aumentaram cerca de 1,73 vezes entre os grupos 1D e 15D ($p<0,01$), similarmente ao comportamento observado para a traqueia. Esses resultados sugerem o que a variação nos volumes médios da faringe e da traqueia pode estar relacionada com o ciclo biológico do inseto e o pico de ecdisona no meio do processo de muda, por volta do 11º dia.

Considerando que o crescimento proporcional das várias partes geralmente seguem a lei da alometria, isto é, as partes crescem a taxas próprias, maiores ou menores do que as taxas de crescimento do corpo como um todo (HUXLEY, 1932), resolveu-se buscar uma relação de proporcionalidade entre os volumes calculados para faringe e traqueia e o volume total da cabeça dos insetos analisados. Para faringe, a razão diminuiu em cerca de 15% entre o 1º e o 15º dia após a alimentação ($p>0,05$). Para traqueia, a razão se manteve constante por todo o período analisado ($p=0,47$). Logo, pode-se sugerir que houve variação na proporção entre a faringe e a cabeça do inseto e, ao contrário, cabeça e as traqueias aumentaram na mesma proporção.

As estruturas da cabeça não são apenas de grande importância em termos de coordenação do sistema nervoso central, percepção sensorial e processamento de alimentos, mas também fornecem muita informação filogenética devido à sua complexidade. Como sugerido por SENA *et al.* (2015), o uso de feixe de raios X policromático realça estruturas mais densas de insetos, principalmente aquelas compostas por quitina, em comparação com o feixe monocromático. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o uso da microtomografia convencional com tubo de raios X não compromete a eficácia do método na identificação de estruturas internas quitinizadas do *R. prolixus*. E, além disso, permitem a quantificação do volume de importantes estruturas para o melhor conhecimento da fisiologia, do comportamento e da evolução de insetos.

TRABALHOS FUTUROS

O crescimento no corpo animal é sempre mais ou menos cíclico, períodos de descanso alternados com períodos de atividade. Mas em nenhum grupo isso é tão evidente como nos insetos, em que o desenvolvimento é pontuado por uma série de mudas, cada uma precedida por um período de crescimento ativo seguido por um período em que o crescimento verdadeiro pode estar totalmente ausente (WIGGLESWORTH, 1972) . Existem dois aspectos do problema da muda: (i) o início do processo de crescimento e a formação da cutícula, e (ii) a determinação das mudanças na forma que ocorrem durante a ecdise.

R. prolixus, por ser de hábito alimentar descontínuo, tem como vantagem, o fato de que uma única alimentação sanguínea por estágio é capaz de deflagrar sincronicamente eventos fisiológicos relacionados ao seu desenvolvimento além das facilidades de manipulação e criação em larga escala (GARCIA *et al.*, 2012).

Como trabalhos futuros, sugere-se:

- obter imagens tridimensionais em diferentes estádios ninfais do *R. prolixus*. A partir das novas imagens, obter quantitativamente os volumes das mesmas estruturas quitinizadas estudadas neste trabalho de modo a avaliar sua plasticidade, e
- comparar as proporções anatômicas obtidas com insetos de diferentes espécies e gêneros de triatomíneos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA A. P., SOARES J., MENESES A. A. M., *et al.* 2012, “Phase Contrast X-ray Synchrotron for Assessing External and Internal Morphology of *Rhodnius prolixus*”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 70, n. 7 (Jul), pp. 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*, v. 8, C07004.
- ALMEIDA A. P., 2013, *Microtomografia Usando Recuperação de Fase como Ferramenta de Avaliação e Determinação das Estruturas Internas do Rhodnius prolixus*. Tese de DSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- 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*, v. 95 (Fev), pp. 243-246.
- ALT, V., KÖGELMAIER, D.V., LIPS, K.S., *et al.* 2011 “Assessment of Angiogenesis in Osseointegration of a Silica-collagen Biomaterial Using 3D-nano-CT”, *Acta Biomaterials*, v. 7, n. 10 (Out), pp. 3773–3779.
- ANBARJAFARI, G. “Digital Image Processing”, University of Tartu: Online course, 2014. Disponível em: <https://sisu.ut.ee/imageprocessing/avaleht>, pesquisado em 10/12/2016.
- ANDERSON, R. S., HOLMES, B., GOOD, R. A. 1973, “In Vitro Bactericidal Capacity of *Blaberus craniifer* Hemocytes”, *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 22, n. 1 (Jul), pp. 127-135.
- ARAUJO R. N., CAMPOS I. T., TANAKA A. S., *et al.* 2007, “Brasiliensin: a Novel Intestinal Thrombin Inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an Important Role in Blood Intake”, *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 12 (Out), pp.1351-1358.
- AVINASH, C. K.; SLANEY M., 1999, *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. IEEE PRESS, New Yourk.

- AVIZO. 2013 “Avizo 3D Software User Guide”. Disponível em: <https://www.fei.com/software/avizo-user-guide>, pesquisado em 10/10/2016.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S., 1991a, “Development and Interactions of *Trypanosoma cruzi* Within the Insect Vector”, *Parasitology Today*, v. 7, n.9 (Set), pp. 240-244.
- AZAMBUJA, P., FEDER, D., GARCIA, E.S., 1993, “Effects of Erythrocyte Component Diets on Ecdysteroid Production and Ecdysis of *Rhodnius prolixus* Nymphs”, *Journal. Insect Physiology*, v. 39, pp. 13-16.
- AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S., 1995, “Care and Maintenance of Triatomine Colonies. In: The Molecular Biology of Insect Disease Vector: A Methods Manual”. Eds Crampton, J. M, Beard, c. b. & LOUIS, K., WHO/TDR.
- AZAMBUJA P. GARCIA E.S. RATCLIFFE N. A., *et al.* 1991, “Immune-depression in *Rhodnius prolixus* Induced by the Growth Inhibitor, Azadirachtin”, *Journal Insect Physiology*, v. 37, n.10 (Fev), pp. 771-777.
- BAEHR, J. C., PORCHERON, C., DRAY, F., 1979 “Dosages Radioimmunologiques des Ecdysteroides et des Hormones Juveniles au Cours des Deux Derniers Stades Larvaires de *Rhodnius prolixus* (Stål)”, *Academic Science Paris*, v. 19, n. 6 (Fev), pp. 523-525.
- BANHART, J., 2008, *Advanced Tomographic Methods in Materials Research and Engineering*. Oxford, Oxford University Press.
- BADEA, C. T., DRANGOVA, M., HOLDSWORTH, D. W., *et al.* 2008, “In Vivo Small-animal Imaging Using Micro-CT and Digital Subtraction Angiography”. *Physics Medical Biology*, v. 53, n. 19 (Ago), R319-R350.
- BARTH R. 1952 “Estudos Anatômicos e Histológicos sobre a Subfamília Triatominae (Heteroptera-Reduvidae). 1ª Parte: A cabeça do *Triatoma infestans*”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 50, pp. 70-196.
- BARUCHEL, J., BUFFIERE, J.-Y. MAIRE, E., *et al.*, 2000, *X-ray Tomography in Material Science*. Hermes science publications; Paris, França.

- BENNET-CLARK H. C., 1963a, "Negative Pressures Produced in the Pharyngeal Pump of the Blood-sucking Bug, *Rhodnius prolixus*", *Journal of Experimental Biology*, v. 40, pp. 223-229.
- BENNET-CLARK H. C., 1963b, "The Control of Meal Size in the Blood Sucking Bug, *Rhodnius prolixus*". *Journal of Experimental Biology* v. 40, pp. 741-750.
- BATES R. H. T. & PETERS T. M., 1971, "Towards Improvements in Tomography", *New Zealandy Journal Science*, v. 14, pp. 883-896.
- 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 Millimeter-sized Arthropod Structure", *Journal Microscopy*, v. 227, n. 1 (Jul), pp. 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*, v. 24, pp. 270-298.
- BONSE, U., BUSCH, F., 1996, "X-ray computed microtomography (μ CT) using synchrotron radiation (SR)", *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 65, n. 1/2, pp. 133-69.
- BRACEWELL, R. N., 1956, "Strip Integration in Radioastronomy", *Journal Physics*, v. 9, pp. 198-217.
- BRACEWELL, R. N., RIDDLE, A. C., 1967, "Inversion of Fan-beam Scans in Radio Astronomy", *Astrophysical Journal*, v. 150, pp. 427-34.
- BRADLEY, T. J., 2007, "Control of the Respiratory Ppattern in Insects". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 618, pp. 211-220.
- BROOKS, R. A., DI CHIRO, G., 1976, "Principles of Computer Assisted Tomography (CAT) in Radiographic and Radio Isotopic Imaging", *Physic in Medicine and Biology*, v. 21, n. 5 (Set), pp. 689-732.
- BRUNKE, O., BROCKDORF, K., DREWS, S., *et. al.* 2008, "Comparison Between X Ray Tube-based and Synchrotron Radiation-based μ CT". *Proceedings of SPIE*, 7078.

- BUCK J. 1962 “Some Physical Aspects of Insect Respiration”, *Annual Review of Entomology*, v. 7, pp. 27–56.
- BURSTEIN, P., BJORKHOLM, P. J., CHASE, R. C., SEGUIN, F. H. 1984 “The Largest and the Smallest X-ray Computed Tomography Systems”. *Nuclear Instruments and Methods A*, v. 221, pp. 207–12.
- BUTENANDT, A., KARLSON, P., 1954, “Über die Isolierung Eines Metamorphosehormons der Insekten in Kristallisierter Form”, *Zeitschrift für Naturforschg B*, pp. 389-391.
- BUXTON, P. A., 1930, “The Biology of Blood-sucking Bug, *Rhodnius prolixus*”, *Transactions of the Royal Entomological Society London*, v. 78, n.2 (Dez), pp. 227-236.
- CASTRO, C. R. F., BARROSO, R. C., OLIVEIRA, L. F., *et al.* 2005, “Coherent Scattering X-ray Imaging at the Brazilian National Synchrotron Laboratory: Preliminary Breast Images”, *Nuclear Instruments and Methods A*, v. 548, n. 1/2(Ago), pp. 116-122.
- CHAPMAN, R.F., 1998, “The Insects: Structure and Function”. New York: Elsevier.
- CHERRY, S. R., SORENSON, J. A., PHELPS, M, E., 2012, *Physics in Nuclear Medicine*. 4 ed. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier.
- CORMACK, A. M., 1963, “Representation of a Function by its Line Integrals, with Some Radiological Applications”, *Journal of Applied Physics*, v. 34, n. 9 (Jun), pp. 2722-2727.
- COUDRON T. A., LAW J. H., KOEPPE J. K., 1981, “Insect Hormones”, *Trends in Biochemical Sciences*, v. 6, n. 9 (Fev), pp. 248-251.
- COURA, J. R., 2006, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias Vol. I e II*. In Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 2096.
- CULLITY, B. D. 1978, *Elements of X-ray Diffraction*. 1 ed. Reading, Massachusetts, Addison-Wesley.
- DEL PONTE, E., 1921, “Contribución ao Studio del Gênero Triatoma Lap. II Parte: Anatomia Interna”. *Revista del Instituto Bacteriologico del Departamento Nacional de Higiene*, v. 3, n. 1 (Fev), pp. 133-186.

- DETTNER, K., FETTKOTHER, R., ANSTEEG, O. *et al.* 1992, "Insecticidal Fumigants from Defensive Glands of Insects—a Fumigant Test with Adults of *Drosophila Melanogaster*", *Journal of Applied Entomology*, v. 113, n. 1/5 (Jan), pp. 128–137.
- DIAS, J. C. P., 2001, "Doença de Chagas: Ambiente, Participação e Estado", *Cadernos de Saúde Pública*, v. 17, pp. 165-169.
- DING, M., ODGAARD, A., HVID, I., 1999, "Accuracy of Cancellous Bone Volume Fraction Measured by Micro-CT Scanning", *Journal of Biomechanics*, v. 32, n. 3 (Mar), pp. 323-326.
- DUJARDIN, J. P., BERMUDEZ H., CASINI C., *et al.* 1997, "Metric Differences Between Sylvatic and Domestic *Triatoma Infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia", *Journal of Medical Entomology*, v. 34, n. 5 (Fev), pp. 544–551.
- DYAR, H. G., 1890, "The Number of Molts in Lepidopterous Larvae", *Psyche: A Journal of Entomology*, v. 5, n. 175-176 (Fev), pp. 420- 422.
- 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 Structure & Development*, v. 39, n. 4 (Jul), pp. 230-241.
- FELDKAMP, L. A., DAVIS, L. C., KRESS, J. W., 1984 "Practical Cone-beam Algorithm", *Journal Optical Society of America*, v. 1, pp. 612-619.
- FELICIANGELI, M. D., SANCHEZ-MARTIN M., MARRERO R., *et al.* 2007 "Morphometric Evidence for a Possible Role of *Rhodnius prolixus* from Palm Trees in House Reinfestation in the State of Barinas (Venezuela)", *Acta Tropica*, v. 101, n. 2 (Fev), pp. 169–177.
- FITZGERALD, R., 2000, "Phase-Sensitive X-Ray Imaging", *Physics Today*, v. 53, n. 7 (Jul), pp. 23–27.
- FRIEDRICH F., BEUTEL R. G., 2008, "Micro-computer Tomography and a Renaissance of Insect Morphology", *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, v. 7078, pp. 70781U.
- FRIEND, W. G., 1965, "The Gorging Response in *Rhodnius prolixus* Stal", *Canadian Journal of Zoology*, v. 43, n. 1 (Fev), pp. 125-132.

- FURTADO, A. F., REGIS, L. N., FALCÃO, P. H., 1990, “Monoclonal Antibodies Against Brain Neurosecretory a Cells of *Panstrongylus megistus* Inhibit Moulting and Egg Production in Triatomines”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 85, n. 1 (Mar), pp. 113–114
- GARCIA E. S., MACARINI J. D, GARCIA M. L., *et al.* 1975, “Feeding of *Rhodnius prolixus* in the Laboratory”. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 47, n. 3-4, pp. 537-545.
- GARCIA, E. S., AZAMBUJA, P. 1984 “Large-scale rearing of *Rhodnius prolixus* and Preparation of Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*”. In: CM Morel - Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 43-46.
- 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”, *Journal Insect Physiology*, v. 23, pp. 11-21.
- GARCIA E. S., CASTRO D. P., MARCELA B., *et al.* "O Sistema Neuroendócrino de Insetos". In: INCT Molecular Entomology, *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, capítulo 10, 2012.
- GEROLT, P., 1983, “Insecticides: their Route of Entry, Mechanism of Transport and Mode of Action”, *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 58, n. 2 (Fev), pp. 233–274.
- GLASSER, O., 1995, “WC Roentgen and the Discovery of the Roentgen Rays”, *American Journal of Roentgenology*, v. 165, n. 5, pp. 1033-1040.
- GONZALES, R. C., WOODS, R. E., 1992, *Digital Image Processing*. Addison-Wesley Publishing Company, INC.
- GONZALES, R., WOODS, R. 2010, “Digital Images Processing”, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 74, pp. 51-66.
- GONZALEZ, M. S., 1992, *Efeito da Azadiractina no desenvolvimento do Trypanosoma cruzi (Clone DM-28C) em Rhodnius prolixus STAL, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)*, Dissertação de MSc., UFRRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- GONZALEZ, M.S., SOUZA, M., GARCIA, E., 2013, “*Trypanosoma cruzi* TcSMUG Lsurface Mucins Promote Development and Infectivity in the Triatomine Vector *Rhodnius prolixus*”, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, pp. 1-10.
- GORDON, R., BENDER, R., HERMAN, G. T., 1970, “Algebraic Reconstruction Techniques (ART) for Three-dimensional Electron Microscopy and X-ray Photography”, *Journal of Theoretical Biology*, v. 29, n. 3 (Dez), pp. 471–82.
- GUARNERI A. A., DIOTAIUTI L., GONTIJO N. F., *et al.* 2000, “Comparison of Feeding Behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in Different Hosts by Electronic Monitoring of the Cibarial Pump”. *Journal of Insect Physiology*, v. 46, n.7 (Jul), pp. 1121-1127.
- GUARNERI A. A., DIOTAIUTI L., GONTIJO N. F., *et al.* 2003, “Blood-feeding Performance of Nymphs and Adults of *Triatoma brasiliensis* on Human Hosts”, *Acta Tropica*, v. 87, n. 3 (Ago), pp. 361-370.
- GULLBERG, G. T., HUESMAN, R. H., MALKO, J. A., *et al.* 1986 “An attenuated Projector-backprojector for Iterative SPECT Reconstruction”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 30, n. 8 (Ago), pp. 799-816.
- GUREYEV, T. E., STEVENSON, PAGANIN D., *et al.* 2000, “Quantitative Methods in Phase-contrast X-ray Imaging”, *Journal of Digital Imaging*, v. 13, n. 1 (Mai), pp. 121–126.
- GURGEL-GONÇALVES, R., ABAD-FRANCH, F., FERREIRA, J. B., *et al.* 2008, “Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) Invading Houses in Central Brazil?”. *Acta Tropica*, v. 107, n.2 (Ago), pp. 90–98.
- HANNAH, K. M., THOMAS, C. D. L., CLEMENT, J. G., *et al.* 2010, “Distribution of Osteocyte Lacunar Size in the Human Femoral Cortex as Revealed by Micro-CT”. *Bone*, v. 47, n. 5 (Nov), pp. 866-871.
- HARRISON, R. L., BONNING, B. C., 2010, “Proteases as Insecticidal Agents”. *Toxins*, v. 2, n. 5 (Mai), pp. 935-953.
- HEETHOFF, M., NORTON, R. A., 2009, “New use for Synchrotron X-ray Microtomography: Three-dimensional Biomechanical Modeling of Chelicerate

- Mouthparts and Calculation of Theoretical Bite Forces”, *Invertebrate Biology*, v. 128, n. 4, pp. 332-339.
- HERMAN, G. T., LENT A., ROWLAND, S. 1973 “ART: Mathematics and Applications (A Report on the Mathematical Foundations and on the Applicability to Real Data of the Algebraic Reconstruction Techniques)” *Journal of Theoretical Biology*, v. 42, n. 1 (Nov), pp. 1–18.
- HILL, R.W., WYSE, G. A., ANDERSON, M. 2011, *Fisiologia Animal*. 2 ed. Artimed.
- HOHEISEL M.; BERNHARDT P.; LAWACZECK R.; *et. al.* 2006, “Comparison of Polychromatic and Monochromatic X-rays for Imaging”, *Medical Imaging*, v. 6142, pp. 614209.
- HOSKINS, W. M., 1940, “Recent Contributions of Insect Physiology to Insect Toxicology and Control”, *Hilgardia*, v. 13, pp. 307–386.
- HOUNSFIELD, G., 1973, “Computeried Transversal Axial Scanning(tomography): Part I. Description of System”. *The British of Journal Radiology*, v. 46, n. 552 (Dez), pp. 1016-1022.
- HÖNNICKE, M. G., CUSATIS, C., RIGON, L., *et al.* 2010, “External and Internal Structure of Weevils (Insecta: Coleoptera) Investigated with Phase-contrast X-ray Imaging”, *Nuclear Instruments and Methods A*, v. 620, n. 2-3 (Ago), pp. 589-593.
- HÖRNSCHEMEYER, T., BEUTEL, R.G., PASOP, F., 2002, “Head Structures of *Priacma serrata* Leconte (Coleoptera, Archostemata) Inferred from X-ray Tomography”, *Journal of Morphology*, v. 252, pp. 298-314.
- HÖRNSCHEMEYER, T., GOEBBELS, J., WEIDEMANN, G., *et al.* 2006, “The Head Morphology of *Ascioplaga mimeta* Neboiss (Coleoptera, Archostemata) in the Context of Archostematan Phylogeny”, *European Journal of Entomology*, v. 103, n. 2 (Abr), pp. 409-423.
- HURD, H., 2003, “Manipulation of Medically Important Insect Vectors by their Parasites”, *Annual Review of Entomology*, v. 48, pp. 141-161.
- HUXLEY, J. S., 1932, *Problems if Relative Growth*. Londres, Methuen Co. LTD.
- ITO, M., NAKAMURA, T., MATSUMOTO, T., *et al.* 1998, “Analysis of Trabecular Microarchitecture of Human Iliac Bone Using Microcomputed Tomography in

- Patients with Hip Arthrosis with or without Vertebral Fracture”, *Bone*, v. 23, n. 2 (Ago), pp. 163-169.
- IWAN, D., KAMIŃSKI M. J., RAŚ M., 2015, “The Last Breath: A μ CT-based Method for Investigating the Tracheal System in Hexapoda”, *Arthropod Structure & Development*, v. 44, n 3 (Mai), pp. 218-227.
- JAHNE, B., 2001, *Digital Image Processing*. 5 ed., Springer.
- JAKUBEKA J, GRANJA C, DAMME J., *et al.* 2007, “Phase Contrast Enhanced High Resolution X-ray Imaging and Tomography of Soft Tissue”, *Nuclear Instruments and Methods A*, v. 571, n. 1-2 (Fev), pp. 69-72.
- JARAMILLO N., CASTILLO D., WOLF M., 2002, “Geometric Morphometric Differences Between *Panstrongylus geniculatus* from Field and Laboratory”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5 (Jul), pp. 667–673.
- JONES, J. R., TSIGKOU, O., COATES, E. E., *et al.* 2007 “Extracellular Matrix Formation and Mineralization on a Phosphate-free Porous Bioactive Glass Scaffold Using Primary Human Osteoblast (HOB) Cells”. *Biomaterials*, v. 28, n. 9 (Mar), pp. 1653-1663.
- KAK, A. C. & SLANEY, M., 1988, *Principles of computerized tomographic imaging*. New York, IEEE Press Electronic Copy (c).
- KALENDER, W. A., 2006, “X-ray Computed Tomography”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 51, pp. R29-R43.
- KIM B. H., SEO E. S., LIM J. H., *et al.* 2012, “Synchrotron X-ray Microscopic Computed Tomography of the Pump System of a Female Mosquito”, *Microscopy Research and Technique*, v. 75, n. 8 (Ago), pp. 1051-1058.
- KIM, J. G. JIN S. O., CHO M. H., *et al.* 2011, “Inter-Plane Artifact Suppression in Tomosynthesis Using 3D CT Image”, *Data Bio Medical Engineering On-Line*, v. 10, pp. 106.
- KÓPEC, S., 1917, “Experiments on Metamorphosis of Insects”. *Bulletin International de l'Académie des Sciences de Cracovie B*, pp. 57-60.

- KUHL, E., EDWARDS, R. Q., 1963, "Image Separation Radioisotope Scanning Radiology", *Hospital of the University of Pennsylvania*, v. 80, n. 4 (Abr), pp. 653–61.
- KRAMER K. J. & KOGA D., 1986, "Insect Chitin: Physical state, Synthesis, Degradation and Metabolic Regulation", *Insect Biochemistry*, v. 16, n. 6, pp. 851–877.
- LACOMBE, D., 1962, "Estudos Anatômicos e Histológicos sobre a Sub-família Triatomae (Heteroptera-Reduviidae). Parte XVIII: Sistema Traqueal do *Triatoma infestans*". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 60, n. 3, pp. 365-387.
- LANDA, V., 1948, "Contributions to the Anatomy of Ephemeropterid Larvae. I: Topography and Anatomy of Tracheal System", *Acta Societatis Entomologicae Czechosloveniae*, v. 12, pp. 25-82.
- LAVOPIERRE, M. M., DICKERSON, G., GORDON, R. M., 1959, "Studies on the Methods of Feeding of Bloodsucking Arthropods. I. The Manner in Which Triatomine Bugs Obtain their Blood-Meal, as Observed in the Tissues of the Living Rodent, with Some Remarks on the Effects of the Bite on Human Volunteers". *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, v. 53, pp. 235-250.
- LENT, H., VALDERRAMA, A., 1977, "Observações, em Laboratório, sobre o Ciclo Evolutivo de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, *R. pictipes* Stal, 1872 e *R. neivai* Lent, 1953". *Ver Brasileira Biologia*, v. 37, pp. 325-333.
- LENT, H., 1948, "O Gênero Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)", *Revista Brasileira de Biologia*, v. 8, pp. 319.
- LEO, W. R., 1994, *Technique for Nuclear and Particle Physics Experiments*. 2 ed. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, p. 378.
- LOCKE, M., 1957, "The Structure of Insect Tracheae", *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. 98, n. 4, pp. 487-492.
- LOCKE, M., 1958, "The Formation of Tracheae and Tracheoles in *Rhodnius prolixus*". *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. 99, n. 1, pp. 29-46.
- LUBBOCK, J., 1862, " II. On the Distribution of the Tracheae in Insects". *Transactions of the Linnean Society of Zoology*, v. 23, n. 1 (Nov), pp. 23-50.

- LUSSANI F. C., VESCOVI R. F., SOUZA T. D., *et al.* 2015 “A Versatile X-ray Microtomography Station for Biomedical Imaging and Materials Research”. *Review of Scientific Instruments*, v. 86, n. 6 (Jun), pp. 063705.
- MARGARITONDO, G., 1988, *Introduction to Synchrotron Radiation*. New York: Oxford Univ. Press.
- MINOT, C. S., 1976, “Recherches histologiques sur les traces de l’Hydrophilus piceus”, *Archives of Physiology*, v. 1, pp. 1-10.
- MIZUTANI R., SUZUKI Y., 2012, “X-ray Microtomography in Biology” *Micron*, v. 43, pp. 104-115.
- MOHOROSHI S., IIJIMA T., 1969, “Induction of Supernumerous Ecdysis by the Injection of Ecdysone in *Bombyx mori*”, *Proceedings of the Japan Academy*, v. 45, pp. 314-317.
- MÜLLER, R., VAN CAMPENHOUT, H., VAN DAMME, B., *et al.* 1998, “Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: a Quantitative Structural Comparison of Histological Section and Micro-computed Tomography”, *Bone*, v. 23, n. 1, pp. 59-66.
- NOGUEIRA, L.P., 2008, *Quantificação Histomofométrica Óssea a partir de Microtomografia 3D por Contraste de Fase e Transmissão de Raios X Utilizando Luz Síncrotron*. Dissertação de M.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- NOGUEIRA L. P., BRAZ D., BARROSO, R. C., *et al.* 2010, “3D Histomorphometric Quantification of Trabecular Bones by Computed Microtomography Using Synchrotron Radiation”, *Micron*, v. 41, n. 8 (Dez), pp. 990-996.
- NOGUEIRA, L.P., BRAZ, D., BARROSO R.C. 2012, “Dependence of Threshold Variations on the Assessment of Histomorphometric Indices from Computed Microtomography Using Synchrotron Radiation”, *Micron*, v. 43, n. 6 (Jun), pp. 739–745.
- NOGUEIRA, L. P., ALESSIO, R., MANTUANO, A., *et al.* 2017, “Synchrotron Microtomography to Evaluate Effects of Different Polychemotherapy Drugs to Cortical Bone Structure”. *International Journal of Radiation Biology*, v.94, pp. 1-21.

- OKASHA, A. Y. K., 1964, “Effects of High Temperature in *Rhodnius prolixus*”, *Nature* v. 204, pp.1221-1222.
- OKUNO, E.; YOSHIMURA, E., 2010, *Física das radiações*. 1 Ed. São Paulo, Ed. Oficina de Textos.
- OLDENDORF, W. H., 1961, “Isolated Flying Spot Detection of Radiodensity Discontinuities —Displaying the Internal Structural Patterns of a Complex Object”. *IRE Transactions on Bio-medical Electronics*, v. 8, pp. 68–72.
- OROPEZA A. M. et al., 2017, “Head Geometric Morphometrics of two Chagas Disease Vectors from Venezuela”, *Zoological Systematics*, v. 42, n. 1, pp. 65–70.
- OTSU, N., 1979, “A Threshold Selection Method from Gray-level Histograms”, *IEEE Transactions on Systems Man Cybernetcs*, v. 9, n. 1, pp. 62–66.
- PAIM, M. M. R., 2014, *Genômica Funcional de Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae): Avaliação da Persistência do Silenciamento (RNAi) e Caracterização in vivo de Cenas Importantes na Interação do Inseto do Hospedeiros e Parasitos*. Tese de D.Sc., UFMG, Minas Gerais, Brasil.
- PEYRIN, F., 2009, “Investigation of Bone with Synchrotron Radiation Imaging: from Micro to Nano”, *Osteoporos International*, v. 20, n. 6 (Jun), pp. 1057–1063.
- PEYRIN, F., DONG, P., PACUREANU, A., et al. 2014, “Micro- and Nano-CT for the Study of Bone Ultrastructure”, *Current Osteoporosis Reports*, v. 12, n. 4 (Dez), pp. 465–474.
- PINHEIRO, C. J. G., 2008, *Desenvolvimento de um Algoritmo para Quantificação de Micro-estruturas em Tomografias 3D de Objetos Complexos Obtidas com Radiação Síncrotron*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PINHO, P. A., GONÇALVES, M. C. T., MANGIA, H. R., 1998, “The Occurrence of *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, Naturally Infected by *Trypanosoma cruzi* in the State of Rio de Janeiro, Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, pp. 141-143.
- POUECH, J., MAZIN, J., TAFFOREAU, P., 2010, “High Quality 3D Imaging of Vertebrate Microremains Using X-ray Synchrotron Phase Contrast Microtomography”, *Comptes Rendus Palevol*, v. 9, n. 6-7 (Nov), pp. 389-395.

- PRATT, W. K., 2001, *Digital image processing*. 3 ed. John Wiley & Sons, Inc.
- RADON, J. H. 1917, “Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte Längs Gewisser Mannigfaltigkeiten”, *Berichte der Sächsischen Akademie der Wissenschaften*, v. 69, pp. 262-277.
- RAMÍREZ-PÉREZ, J., 1969, “Estudio sobre la Anatomía de *Rhodnius prolixus*”, *Revista Venezolana de Sanidad y Asistencia Social*, v. 34, pp. 10-98.
- RATHKE, H., 1862, “Anatomico-physiological Investigations Process in Insects”, *Annals and Magazine of Natural History*, v. 9, n. 3, pp. 81-106.
- RIAÑO, H. C., JARAMILLO, N., DUJARDIN, J. P., 2000, “Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions”, *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, pp. 162–168.
- RIEDEL, A., ROLO, T. D. S., CECILIA, A, VAN, K. T., 2012, “Sayrevilleinae Legalov, a Newly Recognized Subfamily of Fossil Weevils (Coleoptera, Curculionoidea, Attelabidae) and the Use of Synchrotron Microtomography to Examine Inclusions in Amber”, *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 165, pp. 773-794.
- RITMAN, E. L., 2004, “Micro-computed Tomography - Current Status and Developments”, *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 6, pp. 185–208.
- ROCHE, B., DAVID, V., VANDEN-BOSSCHE, A., *et al.* 2012, “Structure and Quantification of Microvascularisation within Mouse Long Bones: What and How Should We Measure?”, *Bone*, v. 50, pp. 390–399.
- RÖNTGEN, W. C., 1898, “On a New Kind of Rays”, *Annual Physical Chemistry*, v. 64, n. 1, pp. 1–37.
- ROCKSTEIN, M., 1974, *The Physiology of Insecta*. 2 ed., Volume IV, Academic Press Inc.
- RUSS, J. C., DEHOFF, R. T., 1999, *Practical Stereology*. 2 ed. New York, Published by Plenum Press, NY (ISBN 0-306-46476-4).
- RUSS, J., 2011, *The Image Processing Handbook*. 6 ed. Hardcover, CRC Press.

- SANT'ANNA, V. R. M., SOARES, C. A., ARAUJO, N. R., 2017, "Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) Blood Intake: Physical Constraints and Biological Adaptations", *Journal of Insect Physiology*, v. 97, pp. 20-26.
- SANTOS, A. L., GARCIA, E. S., 1980 "Some Effects of a Juvenile Hormone Analogue of *Rhodnius prolixus*", *Pesquisa Básica Doença de Chagas*, V7.
- SATO, T., IKEDA, O., YAMAKOSHI, Y., TSUBOUCHI, M., 1981, "X-ray Tomography for Microstructural Objects", *Applied Optics*, v. 20, n. 22, pp. 3880-3883.
- SCHACHTER-BROIDE, J., DUJARDIN, J. P., KITRON, U., *et al.* 2004, "Spatial Structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera Reduviidae) Populations from Northwestern Argentina Using wing Geometric Morphometry", *Journal of Medical Entomology*, v. 41, n. 4 (Jul), pp. 349–643.
- SCHOFIELD, C. J., JANNIN, J., SALVATELLA, R., 2006, "The Future of Chagas Disease Control", *Trends Parasitology*, v. 22, pp. 583-588.
- 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*, v. 499, 012018.
- SENA, G., ALMEIDA, A. P., BRAZ, D., *et al.* 2015 "On the Possibilities of Polychromatic Synchrotron Microtomography for Visualization of Internal Structures of *Rhodnius prolixus*". *Radiation Physics and Chemistry*, v. 115, pp. 179-182.
- SENA, G., 2015, *Microtomografia Usando Radiação Síncrotron (SR-MicroCT) como Técnica não Invasiva para Identificação de Estruturas Externas e Internas do Rhodnius prolixus*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SENA, G., NOGUEIRA, L. P., ALMEIDA, A. P., *et al.* 2016a, "Effects of Different Fixation Methods on the Study of *Rhodnius prolixus* Head Using 3D MicroCT Imaging", *AIP Conference Proceedings*, 1764, 030007.
- SENA, G., NOGUEIRA, L. P., BRAZ, D. *et al.* 2016b, "Ecdysis Period of *Rhodnius prolixus* Head Investigated Using Phase Contrast Synchrotron Microtomography", *Physica Medica*, v. 32, pp. 812-817.

- SHAHA, R. K., VOGT, J. R., HAN, C. S., *et al.* 2013, “A Micro-CT Approach for Determination of Insect Respiratory Volume”. *Arthropod Structure & Development*, v. 42, pp. 437-442.
- SHEPP, L. A., LOGAN, B. F., 1974, “The Fourier Reconstruction of a Head Section IEEE”, *Transactions on Nuclear Science*, v. 21, pp. 21–43.
- SKYSCAN 1172. 2011 “NRecon User Guide”. Disponível em: <http://www.skyscan.be>, pesquisa realizada em 13/10/2016.
- SKYSCAN 1172. 2013 “Morphometrics Parameters in CT-Analyser”. Disponível em: <http://www.skyscan.be>, pesquisa realizada em 02/10/2016.
- SKYSCAN. 2008 “Method Notes, Skyscan 1172 Desktop Micro-CT”. Skyscan, Ed. Kontich.
- SMITH, J. J. B., 1979, “Effect of diet Viscosity on the Operation of the Pharyngeal Pump in the Blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*”, *Journal of Experimental Biology*, v. 82, pp. 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*”, *Journal Insect Physiology*, v. 57, n. 9 (Set), pp. 1312-1316.
- SOCHA, J., FORSTER, T., GREENLEE, K., 2010, “Issues of Convection in Insect Respiration Insights from Synchrotron X-ray Imaging and Beyond”, *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 173, pp. S65-S73.
- SOCHA J. J., WESTNEAT M. W., HARRISON J. F., *et al.* 2007, “Real-time Phase-Contrast X-ray Imaging: A New Technique for the Study of Animal form and Function”, *BMC Biology*, v. 5, pp. 6.
- STEEL, C. G. H., BOLLENBACHER, W. E., SMITH, S. L., *et al.* 1982, “Haemolymph Ecdysteroid Titres During Larval-adult Development in *Rhodnius prolixus*: Correlations with Moulting Hormone Action and Brain Neurosecretory Cell Activity”, *Journal of Insect Physiology*, v. 28, pp. 519–525.

- STEEL, C. G. H. & AMPLEFORD, E. J., 1984, *Circadian Control of Hemolymph Ecdysteroid Titres and the Ecdysis Rhythm in Rhodnius prolixus*. In: Photoperiodic Regulation of Insect and Molluscan Hormones. PITMAN., pp. 150, London.
- STEVENSON, A.W., GUREYEV, A. T. E., PAGANIN, A. B. D., *et al.* 2003, “Phase Contrast X-ray Imaging with Synchrotron Radiation for Materials Science Applications”, *Nuclear Instruments and Methods B*, v. 199, pp. 427-435.
- STOCK, S. R., 1999, “X-ray Microtomography of Materials”, *International Materials Reviews*, v. 44, pp. 141-164.
- STOCK, S. R., 2008, “Recent Advances in X-ray Microtomography Applied to Materials”. *International Materials Reviews*, v. 53, n. 3, pp. 129-181.
- STOCK, S. R., 2009, *Microcomputed Tomography: Methodology and Applications*, 336 Boca Raton, FL, CRC Press.
- STOKA, A., NORIEGA, F. G., 1982, “Ecdysteroids: Biochemical Mechanism of 20-Hydroxyecdysone Inactivation in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae)”, *Acta Physiologica Latino Americana*, v. 32, n. 4, pp. 321-329.
- SVOBODA, J. A. Kaplanis, J. N., Robbins, W. E., *et al.* 1975, “Recent Developments in Insect Steroid Metabolism”, *Annual Review of Entomology*, v. 20, pp. 205-220.
- TERRA, W. R., 1988, “Physiology and Biochemistry of Insect Digestion: an Evolutionary Perspective”, *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v. 21, pp. 675-734.
- TURNER, J. E., 2007, *Atoms, Radiation, and Radiation Protection*. 3 ed. Wiley-VHC.
- URIBE, C., 1927, “On the Biology and Life History of *Rhodnius prolixus* Stal”, *Journal Parasitology*, v. 13, pp. 129-136.
- VALA, M. H. J.; BAXI, A., 2013, “A review on Otsu Image Segmentation Algorithm”, *International Journal of Advanced Research in Computer Engineering & Technology*, v. 2, n. 2, pp. 387-389.
- VALLEJO, G. A., GUHL, F., SCHAUB, G. A., 2009, “Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector–parasite Interactions”, *Acta Tropica*, v. 110, pp. 137-147.

- VARGA, P., PACUREANU, A., LANGER, M., SUHONEN, H., HESSE, B., GRIMAL, Q., *et al.* 2013, “Investigation of the Three-dimensional Orientation of Mineralized Collagen Fibrils in Human Lamellar Bone Using Synchrotron X-ray Phase Nano-tomography”, *Acta Biomaterial*, v. 9, pp. 8118–8127.
- WATERS, J. S., LEE, W. K., WESTNEAT, M. W., *et al.* 2013, “Dynamics of Tracheal Compression in the Horned Passalus Beetle”, *Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 304, pp. 621–627.
- WAGNER, R., VAN LOO, D., HOSSLER, F., *et al.* 2010, “High Resolution Imaging of Kidney Vascular Corrosion Casts with Nano-CT”, *Microscopy Microanalysis*, v. 2, pp. 1–5.
- WESTNEAT, M. W., BETZ, O., BLOB, R., *et al.* 2003 “Tracheal Respiration in Insects Visualized with Synchrotron X-ray Imaging”, *Science*, v. 299, pp. 558-60.
- WESTNEAT, M. W., SOCHA, J. J., LEE, W. K., 2008 “Advances in Biological Structure, Function, and Physiology using Synchrotron X-ray Imaging”. *Annual Review of Physiology*, v. 70, pp. 119-142.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015, *Control of Chagas Disease*. 2 ed. Report of the WHO expert committee. World Health Organization, Geneva.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1930, “A Theory of Tracheal Respiration in Insects”, *Proceeding of the Royal Society of London B*, v. 106, pp. 229–250.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1933, “The Physiology of the Cuticle and of Ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae, Hemiptera); with Special Reference to the Function of the Oenocytes and of the Dermal Glands”, *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. 76, pp. 269-318.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1940 “The Determination of Characters at Metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera)”, *Journal of Experimental Biology*, v. 17, pp. 201–223.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1954, “Growth and Regeneration in the Tracheal System of an Insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera)”, *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. 95, n. 1, pp. 115-137.

- WIGGLESWORTH, V. B., 1970, *Insect hormones*. Oliver and Boyd R. and Clack R., Edinburgh.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1972, *The principles of insect physiology*. 7 ed. London, Chapman & Hall.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1990, "The Properties of the Lining Membrane of the Insect Tracheal System", *Tissue Cell*, v. 22, n. 2, pp. 231-238.
- WIGGLESWORTH, V. B., 1991, "The Distribution of Aeriferous Tracheae for the Ovaries of Insects", *Tissue Cell*, v. 23, n. 1, pp. 57-65.
- WILDENSCHILD, D., SHEPPARD, A. P., 2013, "X-ray Imaging and Analysis Techniques for Quantifying Pore-Scale Structure and Processes in Subsurface Porous Medium Systems", *Advances in Water Resources*, v. 51, pp. 217-246.
- WILKINS, S. W., GUREYEV, T. E., GAO, D., *et al.* 1996 "Phase-contrast Imaging Using Polychromatic Hard X-rays", *Nature*, v. 384, n. 6607, pp. 335-338.
- ZASLANSKY, P., ZABLER, S., FRATZL, P., 2010 "3D Variations in Human Crown Dentin Tubule Orientation: A Phase-contrast Microtomography Study". *Dental Materials*, v. 26, pp. e1-e10.
- ZHANG, K., LI, D., ZHU, P., *et al.* 2010, "3D Visualization of the Microstructure of *Quedius beelsoni* Cameron Using Micro-CT", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, pp. 2143-2148.