

Universidade do Estado do Rio de Janeiro Centro de Tecnologia e Ciências Instituto de Física Armando Dias Tavares

Samara Cristina Santos de Oliveira

# Aperfeiçoamento da obtenção e processamento de imagem por microtomografia síncrotron para estudo morfométrico cerebral da *Drosophila melanogaster*

Rio de Janeiro 2024 Samara Cristina Santos de Oliveira

Aperfeiçoamento da obtenção e processamento de imagem por microtomografia síncrotron para estudo morfométrico cerebral da *Drosophila melanogaster* 

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Física, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius Colaço Gonçalves Coorientador: Dr. Liebert Parreiras Nogueira

> Rio de Janeiro 2024

#### CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/ REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/D

O48a Oliveira, Samara Cristina Santos de. Aperfeiçoamento da obtenção e processamento de imagem por microtomografia síncrotron para estudo morfométrico cerebral da Drosophila melanogaster / Samara Cristina Santos de Oliveira. - 2024. 135 f. : il. Orientador: Marcos Vinicius Colaço Gonçalves. Coorientador: Liebert Parreiras Nogueira. Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Física Armando Dias Tavares. 1. Microtomografia por raio-X - Teses. 2. Radiação sincrotrônica - Teses. 3. Drosophila melanogaster - Processamento de imagens - Teses. 4. Preparo de amostras (Química) – Microtomografia por raio-X – Teses. I. Gonçalves, Marcos Vinicius Colaço (Orient.). II. Nogueira, Liebert Parreiras (Coorient.). III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Física Armando Dias Tavares. IV. Título. CDU 616-73.7

Bibliotecária: Teresa da Silva CRB7/5209

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Samara Cristina Santos de Oliveira

# Aperfeiçoamento da obtenção e processamento de imagem por microtomografia síncrotron para estudo morfométrico cerebral da *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Física, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 7 de março de 2024. Banca examinadora:

> Prof. Dr. Marcos Vinicius Colaço Gonçalves (orientador) Instituto de Física Armando Dias Tavares – UERJ

> > Dr. Liebert Parreiras Nogueira (coorientador) University Of Oslo

Prof. Dr. Eduardo Inocente Jussiani Universidade Estadual de Londrina – UEL

> Prof. Dr. Juliano Marimoto Borges University of Aberdeen

Prof. Dr. André Pereira de Almeida Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Profa. Dra. Camila David Cupello Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

# DEDICATÓRIA

À Deus e Nossa Senhora. À Leila e Lielson, meus pais, por todo amor e por indicarem que a educação era o caminho para eu alcançar meus objetivos. Ao Ricardo, meu companheiro de vida e incentivador em cada sonho.

#### AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, não poderia deixar de agradecer a Deus e Nossa Senhora da Conceição e Nossa Senhora Aparecida, por toda intercessão e por nunca me deixarem só.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Vinicius Colaço e ao meu coorientador Dr. Liebert Parreira Nogueira por terem dedicado parte de seus trabalhos à minha orientação e por todo suporte, compreensão e incentivo para alinharmos as ideias ao longo desses dois anos que cheguei na UERJ. Em especial à Dr<sup>a</sup> Regina C. Barroso, por todo carinho, ajuda, incentivo e por ser inspiração.

Aos amigos do LabFisMed/UERJ: Thaina, Tayane, Katrine, Pedro, Núbia, Gabriela Sena, Gabriel, Renan. Muito obrigada por compartilharem seus conhecimentos e partilhar bons momentos.

Agradeço também à família, à minha mãe por nunca medir esforços para me proporcionar as melhores coisas. Por ser sempre meu suporte, me apoiar em todas as decisões.

Ao meu pai, por sempre vibrar com minhas conquistas e dizer palavras de conforto quando eu me cobrava demais e me trazia para a realidade que era possível.

Ao meu noivo, Ricardo, agradeço por todo incentivo, companheirismo, por embarcar nas minhas ideias, ser meu alicerce e torcer por mim e não me deixar desistir.

Aos amigos que a universidade me apresentou, Júlia, Felipe, Augusto, cada um teve uma grande participação no meu processo de formação.

Às minhas amigas que sempre me incentivaram, Yvea, Thayná e M. Giovanna e Carol.

À UERJ por disponibilizar ferramentas de qualidade e por todo acolhimento e suporte durante o mestrado, junto aos servidores da secretaria do PPGF/UERJ, Ranna e Samir, por serem sempre solícitos.

Ao CNPEM pelo auxílio financeiro para realizar as medidas na linha de luz MOGNO e CARNAÚBA/SIRIUS.

Ao ICTP/IAEA pelo financiamento da bolsa para realizar medidas no laboratório Elettra/Itália.

À CAPES pelo apoio e financiamento da bolsa que recebi durante este presente trabalho que foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, a todos os envolvidos nesse processo minha grande gratidão.

A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a todo esforço, deve ser alcançada.

#### RESUMO

OLIVEIRA, S. C. S. Aperfeiçoamento da obtenção e processamento de imagem por microtomografia síncrotron para estudo morfométrico cerebral da Drosophila melanogaster. 2024. 135 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física Armando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A microtomografia com contraste de fase por radiação síncrotron (SR-PhC-µCT) tem emergido como uma técnica poderosa nas ciências biomédicas para visualização não destrutiva das estruturas internas de uma amostra que apresentam absorções muito semelhantes, sem a necessidade de marcação química e com alta resolução. Essa abordagem elimina a necessidade de preparações de amostras que poderiam alterar e/ou danificar estruturas em micro e nanoescala. Neste trabalho, utilizamos a linha de luz SYRMEP no síncrotron de Elettra, na Itália, para investigar as estruturas internas de Drosophila melanogaster, comumente conhecida como mosca-da-fruta, que é reconhecida como um modelo ideal para o estudo de doenças neurodegenerativas devido à sua correspondência genética com genes causadores de doenças humanas. Empregamos um regime de contraste de fase de distância única combinado com técnicas de recuperação de fase pioneiras por Paganin (2002). As amostras foram medidas em duas configurações, uma com energia média de 16,7 keV e outra com 25 keV, ambas com a utilização de um feixe de raios X policromático filtrado. O hidrogel Plurônico (F-127) e o etanol 100% foram utilizados para estabilização dentro do porta amostra e foram comparados entre si. Diferentes parâmetros para recuperação de fase foram testados e avaliados para alcançar o contraste ideal entre o cérebro e estruturas vizinhas. Nossos resultados demonstram a eficácia do SR-PhC-µCT em visualizar e diferenciar o cérebro da mosca, além de permitir uma boa segmentação da área de interesse, neste trabalho foi realizada pelo método de interpolação e por deep learning, possibilitando uma quantificação precisa do volume cerebral. Olhando para o futuro, o potencial da utilização de fontes síncrotron de última geração como na linha de luz MOGNO no Sirius (Brasil) apresenta perspectivas promissoras.

Palavras-chave: radiação sincrotron, micro-CT, amostra biológica, processamento de imagem, segmentação, *deep learning*, volume.

#### ABSTRACT

OLIVEIRA, S. C. S. Improvement of image acquisition and processing by synchrotron microtomography for brain morphometric study of Drosophila melanogaster. 2024. 135 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física Armando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Synchrotron radiation phase-contrast microtomography (SR-PhC-µCT) has emerged as a powerful technique in biomedical science for non-destructive visualization of internal structures with very similar densities without the need for chemical staining and with high resolution. This approach eliminates the need for sample preparations that could potentially damage micro and nanoscale structures. In this work, we utilized the SYRMEP beamline at Elettra synchrotron in Italy to investigate the internal structures of Drosophila melanogaster, commonly known as the fruit fly, renowned as an ideal model for studying neurodegenerative diseases due to its genetic correspondence with human disease-causing genes. We employed a single distance phase-contrast regimen combined with phase retrieval techniques pioneered by Paganin (2002). The samples were measured in two configurations, one with an average energy of 16.7 keV and the other with 25 keV, both using a filtered polychromatic X-ray beam and a 16-bit air/water-cooled sCMOS camera in combination withappropriate optics, obtaining pixel sizes of 1.5 and 0.9 µm. The samples, mounted on Pluronic hydrogel (F-127) and 100% ethanol for stabilization, were positioned at two sample-detector distances, one of 100 mm and the other of 150 mm. 1200 and 1800 projections around 180° were acquired. Different parameters for phase retrieval have been tested and evaluated to achieve optimal contrast between the brain and neighboring structures. Reconstruction was performed using the filtered back projection (FBP) algorithm, with careful parameter selection to guarantee the best contrast while minimizing information loss. Our results demonstrate the effectiveness of SR-PhC-µCT in visualizing and differentiating the fly's brain, as well as allowing for a precise quantification of the brain's volume. Looking forward, the potential of utilizing advanced synchrotron sources like the MOGNO beamline at Sirius (Brazil) presents exciting prospects.

Keywords: synchrotron radiation, micro-CT, biological sample, image processing, segmentation, deep learning, volume.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dipolos magnéticos	. 21
Figura 2 – Processos de produção da radiação sincrotron	. 22
Figura 3 - Ossos da mão da esposa de Röntgen, Bertha	. 23
Figura 4 – Tubo de raios X	. 24
Figura 5 – Radiação de fretamento	. 24
Figura 6 - Região de predominância das interações de acordo com o número atômico (Z) e a energi	ia
	. 27
Figura 7– Atenuação da radiação em um material	. 27
Figura 8 – Queda exponencial da intensidade da radiação ao atravessar o material	. 28
Figura 9 - Efeito fotoelétrico	. 30
Figura 10 - Espalhamento Rayleigh	. 32
Figura 11 - Espalhamento Compton	. 33
Figura 12 – Representação da microtomografia computadorizada	. 34
Figura 13 – Representação de projeções de objetos cilíndricos em diferentes ângulos	. 35
Figura 14 – Processo captação dos sinais analógicos para a imagem digita.	. 37
Figura 15 – Representação de pixel e voxel	. 38
Figura 16 – Resolução espacial	. 38
Figura 17 – Relação entre resolução espacial e tamanho de pixel	. 39
Figura 18 – Contraste de fase por absorção	. 40
Figura 19 - Contraste de fase por propagação	. 40
Figura 20 – Atuação do contraste de fase por propagação	. 41
Figura 21 – Atuação dos parâmetros $\delta$ e $\beta$ na água	. 43
Figura 22 - Representação formação de projeções após os raios-soma atravessarem a amostra	. 44
Figura 23 – Seção transversal atravessada por raios X paralelos	. 44
Figura 24 – Generalização da seção transversal do coeficiente de atenuação	. 45
Figura 25 – Representação do Teorema da fatia de Fourier	. 47
Figura 26 – Representação do sinograma	. 49
Figura 27 - Representação do processo fatias 2D para uma imagem em 3D	. 50
Figura 28 - Aquisição da imagem até a reconstrução	. 50
Figura 29 – Processo de normalização de uma projeção	. 51
Figura 30 - Valores de projeções em diferentes ângulos	. 54
Figura 31 - Utilização do filtro Sheep-Logan	. 57
Figura 32 – Processo de segmentação da imagem	. 57
Figura 33 - Segmentação semântica	. 58
Figura 34 – Interface do programa Dragonfly	. 59
Figura 35 - Interface da aba Segmentation Wizard	. 60
Figura 36 – Região definida pela homogeneidade das estruturas	. 61
Figura 37 – Drosophila melanogaster	. 61
Figura 38 – Representação do macho e da fêmea da D. melanogaster	. 62
Figura 39 – Ciclo de vida da Drosophila melanogaster	. 62
Figura 40 – Cromossomos da Drosophila melanogaster	. 63
Figura 41 – Fluxograma das etapas do processamento digital	. 65
Figura 42 – D. melanogaster coletadas	. 67
Figura 43 - D. melanogaster na bancada experimental	. 67
Figura 44 – Vista superior das linhas de luz do Elettra	. 68

Figura 45 – Trajetória do feixe de raios x da fonte ao detector	69
Figura 46 – Monocromador de Si (111) da SYRMEP	69
Figura 47 - Sistema de detecção da SYRMEP	70
Figura 48 – Estação experimental da microtomografia computadorizada	71
Figura 49 – Painel de controle de posição da amostra da linha SYRMEP	71
Figura 50 – Painel de controle para aquisição tomográfica da linha SYRMEP	72
Figura 51 – Painel de controle da linha de luz na SYRMEP	73
Figura 52 - Interface do STP	75
Figura 53 – Aba de Pré-processamento do STP	76
Figura 54 – Aba de Recuperação de fase do STP	77
Figura 55 – Representação da recuperação de fase	77
Figura 56 – Aba de reconstrução do STP	78
Figura 57 – Aba da Run Complete Reconstruction	80
Figura 58 – Interface do ImageJ	80
Figura 59 - Visualização da fatia em diferentes planos ortogonais	81
Figura 60 – Representação do plot profile	81
Figura 61 – Cérebro da D. melanogaster adulta	82
Figura 62 – Etapas da segmentação da ROI	82
Figura 63 – Representação da interpolação	83
Figura 64 – Visão 2D e 3D da segmentação por Interpolação	83
Figura 65 - Rede <i>U-Net</i> com informações de entrada e saída	84
Figura 66 – Visão 2D e 3D da segmentação por DL	85
Figura 67 – Visualização em 3D da D. melanogaster	86
Figura 68 – Análise da região crítica da borda com 8 bits e com 32 bits	88
Figura 69 – Comparação visual da região de interesse com a variação da razão $\delta/\beta$	90
Figura 70 – Região crítica do cérebro	91
Figura 71- Observação de uma imagem com 8 bits e com 32 bits	92
Figura 72 – Região crítica entre cérebro e olho	93
Figura 73 – Região entre cérebro e parte da vizinhanca dentro da cabeca	94
Figura 74 – Região entre a amostra e o meio externo	95
Figura 75 – Nível de contraste da região entre o meio externo e a amostra	96
Figura 76 - Comparação visual da região de interesse com a variação da razão $\delta/\beta$	
Figura 77 – Região crítica da borda do cérebro.	
Figura 78 – Observação de uma imagem com 8 e com 32 bits	99
Figura 79 – Região crítica entre cérebro e olho	100
Figura $80 - Região entre cérebro e parte da vizinhança dentro da cabeça$	101
Figura 81 – Região entre a amostra e a região externa cabeca	102
Figura 82 - Nível de contraste da região entre o mejo externo e a amostra	103
Figura 83 - Região entre a amostra e o meio externo (continua)	104
Figura 84 - Região entre a amostra e o meio externo (conclusão)	105
Figura 85 – Região entre a amostra e o meio externo com análise gráfica (continua)	106
Figura 86 – Região entre a amostra e o meio externo com análise gráfica (conclusão)	100
Figura 87 – Gabarita do método 1 (internolação)	100
Figure 88 – Regiões com erro de interpolação	110
Figure 80 – Regultado da internolação em 3D	110
Figura 07 – Resultado entregue palo método do interpoloção	1 10
Figura 20 - Resultado entregue pero metodo da interpolação	I I I 110
Figure 91 – Gabarnos fornecidos para os modelos com 11% e 21% de treinamento	۲۱۱۵. ۱۹۸۸
rigura 92 – Resultado da segmentação automática com 11 %	114

Figura 93 – Visualização em 3D do resultado da segmentação por DL com 11%	115
Figura 94 - Resultado da segmentação automática com 21 %	117
Figura 95 – Visualização 3D do modelo DL com 21%	118
Figura 96 - Comparação entre os resultados dos testes em mesmas fatias no modelo de 11%	123
Figura 97 - Comparação entre os resultados dos testes em mesmas fatias no modelo com 21%	124

# LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico do DSC para interpolação.	119
Gráfico 2 - Gráfico do DSC para DL 11%	120
Gráfico 3 – Gráfico do DSC para DL 21%	120
Gráfico 4 - Valores do DSC para cada um dos testes realizados no modelo de 11%	123
Gráfico 5 - Valores do DSC para cada um dos testes realizados no modelo de 21%	125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Configurações experimentais da aquisição da medida	74
Tabela 2 - Configurações experimentais da aquisição da medida	74
Tabela 3 - Valores dos parâmetros usados no STP para reconstrução	79
Tabela 4 – Resultado do DSC para interpolação.	112
Tabela 5 - Resultado do DSC para segmentação automática com 11%	116
Tabela 6 – Resultado do DSC para DL com 21% de treinamento	118
Tabela 7 – Volume do cérebro e DSC para cada método de segmentação.	121
Tabela 8 - Parâmetros para cada um dos testes aplicados para os modelos com 11% o	e 21%
com DL.	122

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Charge-Coupled Device
CNN	Convolutional Neural Network
DA	Doença de Alzheimer
DL	Deep Learning
DP	Desvio Padrão
DSC	Dice Similarity Coefficient
FOV	Field of View
Lab_FisMed	Laboratório de Física Aplicada às Ciências Biológicas e Ambientais
LINAC	Linear Acelerator
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Micro-CT	Microcomputed Tomography
ORS	Object Research Systems
PhC	Phase-contrast
PhRt	Phase Retrieval
ROI	Region of the Interest
SDD	Sample-to-Detector Distance
SYRMEP	SYnchrotron Radiation for MEdical Physic
TC	Tomografia computadorizada
TIE	Transport of Intensity Equation

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
1.1 Radiação Síncrotron	20
1.1.1 Descoberta dos raios X	22
1.1.2 Imagens coerentes por raios X	25
1.2 Interação da radiação com a matéria	26
1.2.1 Efeito fotoelétrico	30
1.2.2 Espalhamento dos raios X	31
1.2.2.1. Espalhamento Rayleigh ou coerente	31
1.2.2.2 Espalhamento Compton ou incoerente	32
1.3 Microtomografia computadorizada	34
1.3.1 Pixels	
1.3.2 Regimes de contraste	
1.3.2.1 Matemática dos princípios de contraste de fase por propagação	42
1.4 Projeções	43
1.4.1. Transformada de Radon	45
1.5 Sinograma	48
1.6 Reconstrução	50
1.6.1 Normalização das projeções	51
1.6.2 Recuperação de fase (Phase Retrieval - PhRt)	52
1.6.3 Retroprojeção filtrada (filtered back projection)	54
1.7 Segmentação	57
1.8 Drosophila melanogaster	61
2 MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1 Preparo das amostras	66
2.2 Linha de luz SYRMEP	68
2.3 Aquisição de imagens	70
2.4 Reconstrução	75
2.5 Segmentação da região de interesse	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	87
3.1 Etapa I	88
<b>3.2</b> Etapa 2	108
REFERÊNCIAS	130

#### INTRODUÇÃO

Os avanços na área do imageamento digital por raios X utilizando fontes cada vez mais coerentes, espacialmente e temporalmente, melhoram os resultados de imagens internas de diferentes materiais. Com isso, os raios X tornaram-se uma ferramenta de grande potencial e foi ampliada para o estudo de estruturas em diferentes áreas, como biologia, materiais, entre outras (Tamal *et al.*, 2022).

Na incidência da radiação eletromagnética ionizante em um meio material os fenômenos de interação atômica variam de acordo com a energia da radiação, número atômico do meio e sua densidade (Okuno; Yoshimura, 2016), parte do feixe é espalhada, parte é absorvida e uma fração atravessa o material sem interagir (Tauhata *et al.*, 2013). As informações que chegam ao detector representam as intensidades dos fótons resultantes dessas interações (Paganin; Pelliccia, 2021).

A microtomografia é uma técnica de imagem em que projeções individuais (radiografias digitais são registradas em diferentes direções. Posteriormente, essas projeções são transformadas em cortes transversais através de algoritmos de reconstrução de imagem e utilizadas para visualização da estrutura interna de uma amostra em duas ou três dimensões, com resolução da ordem de micrômetros até nanômetros. A técnica fornece um mapa da interação dos raios X dentro de um objeto, independentemente de haver ou não subestrutura bem definida de diferentes fases, além de uma vantagem adicional, para os parâmetros de imagem, oferece uma análise não destrutiva da amostra (Rivers, 1998).

Para ser possível atingir uma ordem de grandeza micrométrica é necessário um nível de precisão que equipamentos de microtomografia convencionais aproveitam das vantagens da utilização de fontes de radiação síncrotron. A luz síncrotron é uma radiação eletromagnética emitida quando partículas aceleradas com velocidades bem elevadas, na ordem da velocidade da luz, em virtude da atuação de intensos campos magnéticos têm sua trajetória desviada dando origem a radiação (Saccomano *et al.*, 2018).

Essa radiação apresenta feixes de raios X extremamente intensos, com grande brilho, colimados e com um alto grau de coerência espacial, alto nível de polarização e amplo espectro eletromagnético. Dentre os diversos métodos para aquisição das imagens, essa técnica permite

a obtenção de imagem por contraste de fase (PhC, em inglês, phase-contrast) de raios X (Gureyev *et al*, 2000).

Por se tratar de imagens biológicas, torna-se difícil diferenciar algumas estruturas, devido às densidades serem similares entre as muitas estruturas presentes (Eberhard, 2010). Sobre um regime de contraste de fase, realiza-se o procedimento de recuperação da fase após a interação da radiação com a matéria, com ajustes dos parâmetros relacionados a fase, e do parâmetro  $\beta$ , que está ligado ao coeficiente de atenuação. Isso é feito por meio do algoritmo de recuperação de fase desenvolvido por Paganin (Paganin *et al.*, 2002).

A amostra analisada neste trabalho foi a *Drosophila melanogaster*, classificada como um inseto holometábolo, de pequeno porte (Lynch *et al.*, 2013), conhecida popularmente por "mosca de fruta". Considerada um modelo ideal para estudos de doenças neurodegenerativas, oferece vantagens na investigação de mecanismos moleculares e celulares adjacentes às doenças humanas devido à conservação das funções fisiológicas em relação aos humanos, ao curto ciclo de vida e por possuir DNA bem caracterizado, além de serem fáceis de cultivar e manter (Jeibmann *et al.*, 2009). Segundo Bier (2005), entre 60 e 75% dos genes causadores de doenças humanas têm uma correspondência reconhecível no código genético da *D. melanogaster*.

Após a aquisição das imagens, ocorre a etapa de reconstrução das fatias através de algoritmos matemáticos. Neste trabalho foi utilizado o algoritmo de retroprojeção filtrada (FBP, em inglês, *filtered back projection*) juntamente com o filtro *Shepp-logan* através do software STP, desenvolvido na linha de luz SYRMEP (Elettra - Itália), com parâmetros adaptados às especificações de cada amostra. A reconstrução foi visualizada usando o software ImageJ e a etapa seguinte de segmentação, foi realizada utilizando o programa *Dragonfly*, finalizando com as análises morfométricas do cérebro segmentado.

Este trabalho tem como objetivo analisar o impacto da razão  $\delta/\beta$  no aperfeiçoamento do contraste de fase, ajustar parâmetros para uma melhor definição de borda de estruturas moles, como é o caso do cérebro do modelo estudado neste trabalho, observar a atuação de diferentes estabilizadores para as amostras durante o preparo e aquisição das imagens para aprimorar a segmentação automática (*deep learning*) e semiautomática (interpolação) com o uso da técnica de tomografia computadorizada de resolução micrométrica, aplicado ao estudo morfométrico do cérebro da *D. melanogaster* utilizando radiação síncrotron.

O corpo da dissertação está organizado conforme as 3 seguintes seções. A primeira apresenta brevemente uma contextualização histórica sobre a radiação síncrotron e sua aplicação, incluindo discussões sobre os aspectos gerais da produção desta radiação e como esta tecnologia apresenta características que aprimoram a obtenção das microtomografias por contraste de fase. Há uma abordagem sobre os efeitos probabilísticos resultantes da interação quando a radiação atravessa a matéria, que dentre eles, podem ser de espalhamento ou absorção. Em seguida, é apresentada a relação entre a atenuação da intensidade dos feixes de raios X após atravessarem materiais com diferentes espessuras e número atômico, com a lei de Beer-Lambert. São apresentados aspectos históricos da técnica de micro-CT, seus principais conceitos e a matemática envolvida na aquisição e reconstrução das imagens microtomográficas. Além disso, é abordado o regime de contraste de fase por propagação e suas implicações matemáticas, aplicado neste trabalho com amostra biológica de tecidos moles. Após é apresentada a etapa de reconstrução das imagens microtomográficas, o algoritmo utilizado e os principais conceitos envolvidos junto a ferramentas matemáticas no processo de recuperação de fase. Concluído o pré-processamento e reconstrução, os aspectos apresentados são da segmentação como uma grande aliada aos resultados quantitativos e qualitativos das análises morfométricas desta pesquisa. A segunda seção é dedicada aos materiais e métodos que serão apresentados: a amostra utilizada como modelo dessa pesquisa, seu preparo, a aquisição das imagens tomográficas, os recursos utilizados e em seguida, os parâmetros de reconstrução dessas imagens. Os resultados e discussões serão apresentados em duas etapas na terceira seção. A primeira etapa analisa os parâmetros utilizados com a finalidade de obter imagens com melhor contraste de fase para ser possível diferenciar as estruturas moles e proporcionar uma melhor segmentação do cérebro. Além da observação dos resultados apresentados com a utilização de estabilizadores para amostra na aquisição das medidas em diferentes setups. A segunda etapa visa analisar métodos de segmentação e a sua eficácia em quantificar volumétricamente a região de interesse.

#### 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 1.1 Radiação Síncrotron

A radiação síncrotron é uma radiação eletromagnética extremamente brilhante, que se expande a um amplo espectro que vai do infravermelho aos raios X de alta energia. Foi observada pela primeira vez, de forma experimental, em um pequeno síncrotron no General Electric Laboratory em 1946 (Elder, 1987). Ao passar dos anos, com as melhorias técnicas e tecnológicas, os laboratórios síncrotron foram classificados por gerações.

Na primeira geração os aceleradores eram usados para a física de partículas e a radiação síncrotron foi inserida com a radiação do ímã de dobra sendo extraída por perfurações nas câmaras de vácuo. O brilho dos fótons produzidos estava na faixa de 10<sup>12</sup> fót/seg/mm<sup>2</sup> /mrad<sup>2</sup>. A segunda geração foi marcada pela construção de máquinas dedicadas à entrega de radiação sincrotron de fato, obtentendo como fonte de radiação síncrotron um anel de armazenamento com 240 MeV em Wisconsin, 1968.

A terceira geração com base nos onduladores<sup>1</sup> e na emitância<sup>2</sup> o brilho dos fótons atingiu uma ordem de 10<sup>20</sup> nas primeiras instalações e abriu novas possibilidades para áreas como por exemplo a biologia estrutural permitindo o desenvolvimento de novas técnicas como o espalhamento inelástico de raios X moles e duros. Já a quarta geração é baseada em anéis de armazenamento de emitância muito baixa (100 pm.rad), permitem atingir alguns 10<sup>22</sup> fót/seg/mm<sup>2</sup>/mrad<sup>2</sup>. Estas novas fontes são: MAX IV (3 GeV, Suécia, em operação), Sirius (3 GeV, Brasil, 2019), ESRF (6 GeV, França, 2020). O termo quarta geração também é usado para designar laser de raios X de elétrons livres, baseado em aceleradores lineares (8 - 20 GeV) e onduladores muito longos (100/150 m).

A luz síncrotron oferece um auxílio de grande importância para a melhoria na qualidade de imagens, possibilita penetrar a matéria e revelar características de sua estrutura molecular e atômica para a investigação de diversos materiais com análises rápidas e com riqueza de detalhes utilizando as diferentes radiações que a compõem. Para atingir a ordem de grandeza micrométrica utilizada neste trabalho, restringe-se, de certa forma, a utilização dos raios X

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Dispositivos magnéticos que permitem ganhar mais de 3 ordens de magnitude em brilho.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Resultado do produto do tamanho do feixe de elétrons pela divergência de alguns nanômetros.radianos.

convencionais, por necessitar que a fonte de raio X tenha um foco bem pequeno para obter maior precisão e um melhor contraste das imagens, abrindo espaço para a radiação síncrotron.

No mundo existem mais de 50 fontes de luz síncrotron, operacionais ou em construção, dedicadas em explorar suas qualidades, desempenham um papel vital para a infraestrutura científica global, aumentando as colaborações internacionais e exercendo seu papel multidisciplinar (Lightsources, 2024)

Os aceleradores de elétrons mantêm as partículas circulando em órbitas estáveis por várias horas em ultra vácuo. O processo de produção desta radiação começa com o aquecimento de uma liga metálica em um canhão de elétrons no acelerador linear, (LINAC, em inglês, *Linear Acelerator*), que emite um feixe de elétrons com velocidades bem elevadas, na faixa da velocidade da luz.

Em seguida, os elétrons são direcionados ao acelerador injetor ou *Booster*, para realizarem muitas voltas aumentando a energia, a fim de chegarem ao acelerador principal. É neste acelerador, normalmente chamado de anel de armazenamento, onde ocorre a produção da radiação síncrotron, que acontece através da atuação de intensos campos magnéticos que ocasionam a deflexão dos elétrons desviando sua trajetória na forma curvilínea, como pode ser observado na Figura 1.



Figura 1 – Dipolos magnéticos

Legenda: Síncrotron de dipolo magnético.

Fonte: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)/CPNEM, 2023. Adaptada pela autora.

Essa radiação é emitida sempre na direção tangente à curva causada pelos elétrons e são direcionados para as chamadas linhas de luz, onde as pesquisas são feitas na cabana experimental, conforme a Figura 2 (Willmott, 2019).



Figura 2 – Processos de produção da radiação sincrotron

Legenda: (a) Representação das etapas de produção da radiação síncrotron; (b) Vista da cabana experimental da linha de luz SYRMEP – Elettra.
Fonte: Kamp, *et. al*, 2013, p.149. Adaptada pela autora.

A tecnologia pode gerar um feixe de raios X extremamente intensos, colimados e com um alto grau de coerência espacial. Estas características são perfeitas para obtenção das microtomografias no processo de produção de projeções radiográficas por contraste de fase (Nogueira, 2011).

#### 1.1.1 Descoberta dos raios X

Durante o século XIX, uma pesquisa experimental sobre a condução elétrica através de gases em tubos de vácuo alinhada a pressupostos técnicos e teóricos, hipóteses feitas pelo físico experimental Wilhelm Conrad Röntgenr em seu laboratório na universidade de Wurzburg (Alemanha), indicou a existência de um fenômeno físico não observado anteriormente na literatura científica (Martins, 1998).

Guiado pelos estudos acerca dos raios catódicos das ampolas de Crookes, em 1895, nomeou essa descoberta, como raios X, acredita-se que em virtude de sua natureza desconhecida (Pereira, 2012). Röntgen seguiu em seu laboratório, com suas investigações a fim de desvendar as propriedades desta nova radiação e motivado, fez as primeiras publicações com as observações do seu trabalho que rendeu a ele o prêmio Nobel em 1901, em reconhecimento aos extraordinários serviços prestados pela sua descoberta (Nobel Prize, 2022).

Dentre as descobertas, observou que os raios propagavam retilineamente, apresentavam sensibilização de placas fotográficas, detinham o poder de penetração sobre alguns materiais (Martins, 1998). Atraiu a atenção de investigadores médicos, dada a capacidade dos novos "raios" de penetrar sob a pele, e possibilitou a utilização da radiação na medicina após obter a radiografia da mão de sua esposa, Anna Bertha Ludwing, apresentada na Figura 3, onde concluiu que era possível observar anatomicamente os detalhes e os diferentes tons de cinza entre os ossos e os tecidos moles.

Figura 3 - Ossos da mão da esposa de Röntgen, Bertha



Fonte: Röntgen, 1895.

Ao contar a revelação, Röntgen possibilitou grandes avanços ao mundo científico. Com o auxílio de novas tecnologias e dedicação de estudiosos posteriores tornou-se possível a aquisição de imagens por aparelhos digitais e analógicos com tratamento digital, o que implicou numa maior qualidade e menor tempo de exposição à radiação, evitando uma interação da radiação com a matéria além do necessário (Okuno; Yoshimura, 2016).

Raios X são considerados uma radiação indiretamente ionizante, já que não possuem carga. Resumidamente, as radiações ionizantes possuem energia suficiente para ionizar e/ou excitar elétrons. Os raios X representam um conjunto de ondas eletromagnéticas que podem ser originadas nas transições eletrônicas dos orbitais atômicos em decorrência de uma diferença de potencial que ocorre entre o catodo e o anodo quando os elétrons retirados do cátodo são acelerados até o alvo metálico, conforme a Figura 4. (Yoshimura, 2009).

#### Figura 4 – Tubo de raios X



Legenda: Produção de raios X – ampola de vidro com seu interior mantido a vácuo, apresenta um catodo que ao passar corrente elétrica gera calor no filamento e há emissão de elétrons na direção do anodo, onde sofrem uma desaceleração e formação dos raios X.

Fonte: Tauhata et al., 2013, p 48.

Ao atingir o anodo, o feixe de elétrons é freado pela estrutura atômica do elemento metálico. Se a energia dos elétrons é suficientemente alta, quando interage com o alvo é desacelerado, e esta desaceleração provoca a emissão da radiação na faixa dos raios X, denominada radiação de fretamento, como visto na Figura 5. Também conhecida como *bremsstrahlung*, formada pela junção, em alemão, de bremse (freio) e strahlung (radiação), (Quoirin, 2004). Existe uma relação diretamente proporcional entre o número atômico do elemento com o qual os elétrons estão interagindo e a parcela de energia que o elétron perderá em forma de radiação de frenagem (Santos, 2019). Essa radiação apresenta propriedades físicas semelhantes às da luz visível: propaga-se em linha reta, pode ser polarizada, refratada, difratada e refletida (Okuno; Yoshimura, 2016).

Figura 5 - Radiação de fretamento



Legenda: Geração de radiação X pela desaceleração de um elétron rápido no campo de Coulomb de um núcleo atômico.

Fonte: Dozieres, 2016, p. 9. Adaptada pela autora.

Os raios X são caracterizados por fótons de alta energia, com comprimentos de onda curtos e, portanto, frequência muito alta, grandeza diretamente proporcional à energia do fóton. Classificam-se de acordo com a energia, a maioria dos raios X tem um comprimento de onda variando de 0,01 a 10 nanômetros, o que leva a uma frequência entre  $3 \times 10^{16}$  Hz e  $3 \times 10^{19}$  Hz, correspondendo a energias na faixa de 100 eV a 100 keV (Connor, 2020).

A emissão de raios X característicos também é um fenômeno que há na formação de raios X. Um elétron energético ao interagir com um elétron de uma camada interna da eletrosfera de um átomo, uma vacância pode ser gerada após a colisão. E logo ela é preenchida por algum elétron de uma camada mais externa do átomo, e gera a emissão de um fóton de raios X característico. Que recebe este nome por sua energia ser particular daquela reação, ou seja, uma característica do material alvo (Tauhata *et al.*, 2013).

#### 1.1.2 Imagens coerentes por raios X

A coerência para as imagens de raios X pode ser temporal (longitudinal) onde um feixe de luz é descrito pela coerência do seu comprimento de onda ( $\lambda$ ), fornece uma distância longitudinal para que uma onda  $\Psi$  (t) e outra onda  $\Psi$  (t +  $\Delta$ t) que tenham a mesma direção de propagação alterem sua fase. A distância percorrida pela onda durante um período de tempo no qual a correlação permanece elevada é chamado o comprimento de coerência longitudinal (*lt*):

$$lt = \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \tag{1}$$

Pode ser também espacial (transversal), quando realiza o grau da correlação da amplitude da onda em diferentes pontos transversais à direção de propagação, e entrega a uniformidade da fase da frente de onda  $\Psi$  (x) e onda  $\Psi$  (x +  $\Delta$ x), é expressa pelo comprimento de coerência espacial (*le*):

$$le = \frac{\lambda}{2 \alpha} \tag{2}$$

onde  $\alpha = S/L$ ,

S: dimensão transversal da fonte

L: distância fonte-detector

#### 1.2 Interação da radiação com a matéria

A radiação pode ser considerada uma energia em movimento emitida por uma fonte e propagada tanto em um meio material quanto no vácuo. Apresenta-se com caráter corpuscular, como no caso de partículas  $\alpha$ , ou ondulatório, como ocorre com as ondas eletromagnéticas (Okuno; Yoshimura, 2016). Ela interage com a matéria de tal forma que toda, nenhuma ou parte de sua energia pode ser transferida para os átomos e elétrons do meio por onde elas se propagam.

Na incidência da radiação eletromagnética ionizante em um meio material, o princípio é baseado no contraste da imagem produzido por variações na atenuação dos raios X que incluem absorção e espalhamento (Schoeman *et al.*, 2016), parte do feixe é espalhada, parte é absorvida e uma fração atravessa o material sem interagir (Tauhata *et al.*, 2013). Quando feixe de raios X passa através de uma amostra, ele é atenuado e as informações que chegam ao detector representam as intensidades dos fótons resultantes dessas interações (Paiva *et al.*, 2022). Essas interações são localizadas, dependem das diferenças de densidade, da composição do material e da energia envolvida, o que torna uma relação probabilística e o nível de transmissão dos raios X é determinado pela massa e pelo coeficiente de absorção de uma amostra.

Dentre as interações quando a matéria é excitada pela radiação, há três que serão utilizadas como referência para esse trabalho, em virtude da faixa de energia: o efeito fotoelétrico, o espalhamento Compton e o espalhamento coerente, também conhecido como espalhamento Rayleigh, como visto na Figura 6 (Menezes, 2008).

Figura 6 – Região de predominância das interações de acordo com o número atômico (Z) e a energia



: Tauhata et al., 2013, p.85. Adaptado pela autora.

A intensidade I do feixe que incide no detector depois de atravessar o material com espessura D está associada à intensidade Io do feixe que incide, pela relação matemática conhecida como lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \tag{3}$$

onde x é a trajetória retilínea do feixe e em  $e^{-\mu x}$  contém o fator de atenuação  $\mu$ , conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7- Atenuação da radiação em um material



Fonte: Als-Nielsen; McMorrow, 2011, p. 20.

Essa intensidade, número de fótons por unidade de tempo, é diretamente dependente se a radiação é monocromática ou policromática, em virtude da variação da faixa de energia do espectro, dos fótons do espalhamento coerente que podem influenciar a detecção do sinal e da absorção no próprio material dos fótons de baixa energia, de acordo com a Figura 8 (Als-Nielsen; McMorrow, 2011).

Figura 8 – Queda exponencial da intensidade da radiação ao atravessar o material



Fonte: Tauhata et al., 2013, p.86.

O coeficiente de atenuação é o fator responsável pela diminuição na intensidade da radiação. É definido através do somatório das seções de choque ( $\sigma$ ) relativos ao efeito fotoelétrico, espalhamento Compton e Rayleigh, e formação de pares. Tal valor depende da energia do fóton incidente e número atômico constituinte do material (Okuno; Yoshimura, 2016).

A seção de choque é a representação numérica da probabilidade do processo de interação entre radiação e matéria por unidade de fluência de partículas, o número de partículas de radiação ionizante que passa por unidade de área, sendo a unidade no sistema internacional  $m^2$ , ou barn (b), onde  $1b = 1028 m^2 = 10^2 \text{ fm}^2$ . Torna-se comum tabelar os valores dos coeficientes de atenuação de acordo com densidade do material, tornando-os independentes de sua fase (Okuno; Yoshimura, 2016).

Para a energia utilizada neste trabalho a interação com maior probabilidade de acontecer é a absorção fotoelétrica, podendo ainda ocorrer o espalhamento Compton, mas esse efeito não é muito favorável, devido ao seu desvio, visto que algum sinal pode chegar em um ponto não desejado no detector e causar ruído na imagem (Als-Nielsen; McMorrow, 2011).

Para tomógrafos ou radiação sincrotron, as faixas de energia baixas, inferiores a 200 keV, são filtradas. Enquanto as altas energias, não atingem o limiar, fótons com energia mínima de 1,022 MeV de energia, para produção de pares (Okuno; Yoshimura, 2016). Sendo assim, é

possível expressar o coeficiente de atenuação linear ( $\mu$ ) como a soma das probabilidades da ocorrência destes efeitos, de tal forma que:

#### μ = absorção fotoelétrica + espalhamento Compton + espalhamento Rayleigh

No caso de amostras homogêneas esse coeficiente não varia significativamente ao longo de toda a estrutura do material, o que torna as análises matemáticas mais simples. Todavia, se o material apresenta características heterogêneas, regime onde opera esse trabalho, o valor do coeficiente de atenuação altera-se ao passar por toda espessura do corpo (Okuno; Yoshimura, 2016).

Esta alteração implica em uma generalização da Equação 3, que pode ser escrita como um somatório desses diferentes valores para o coeficiente de atenuação, o que nos permite descrever a lei na forma integral ao longo do caminho linear percorrido pelo feixe de raios X, como apresentado a seguir.

$$I = I_0 e^{-(\sum_n \mu_n x_n)} \tag{4}$$

Integrando esse somatório, temos:

$$I = I_0 e^{-\int_{x_0}^{x_n} \mu \, dx}$$
(5)

Aplicando as propriedades logarítmicas em ambos os lados da equação, tem-se

$$\ln I = \ln I_0 - \int_{x_0}^{x_n} \mu \, dx \tag{6}$$

Daí,

$$\int_{x_0}^{x_n} \mu \, dx = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) \tag{7}$$

A equação 7 representa o cálculo do coeficiente de atenuação para as imagens tomográficas. O termo  $\ln \left(\frac{l_0}{l}\right)$  é chamado de raio-soma, e caracteriza a soma dos coeficientes

de atenuação do feixe de raios X.

#### 1.2.1 Efeito fotoelétrico

O estudo sobre o efeito fotoelétrico começou quando foi observado que alguns resultados experimentais não conseguiam mais ser interpretados apenas em termos do comportamento ondulatório da luz. Já que ao incidir um feixe de luz sob uma superfície metálica, em condições experimentais convenientes, esse feixe pode arrancar elétrons dessa superfície e no mesmo instante torna-se visível uma corrente (Oguri, 2016).

Essa interação causa a transição de um elétron de uma camada superior para a camada do elétron ejetado, o que gera a emissão de radiação característica. Esta radiação, no entanto, é geralmente absorvida pelo meio atenuante (Quoirin, 2004), conforme a Figura 9.

Figura 9 - Efeito fotoelétrico



Legenda: Fóton incidente sobre um fotoelétron. Fonte: Quoirin, 2004

Dessa forma, Einstein propôs em 1905 a descrição de "quanta de luz" ou fótons, e como eles poderiam explicar esse efeito sugerido, encarando-o como uma "colisão" entre um fóton e um elétron. Percebeu que ao aumentar a intensidade da radiação luminosa a energia fotoelétrica não variava, somente o número de fotoelétrons, mostrando que a energia cinética dos fotoelétrons dependia da frequência. Além disso, ele concluiu que cada fóton libera toda sua energia ao interagir com o elétron e que essa interação acontece de um para um. Determinando que o quantum de energia é definido pela equação 8.

$$E = hv - B_e \tag{8}$$

onde, E é a energia cinética do elétron, h é a constante de Planck e v é a frequência luminosa e  $B_e$  é a energia de ligação do elétron.

A seção de choque por átomos para o efeito fotoelétrico ( $\sigma_{fot}$ ), integrada sobre todos os ângulos de emissão do fotoelétron, está apresentada na equação 2 (Conceição, 2013), onde k é uma constante.

$$\sigma_{fot} \cong k \; \frac{Z^n}{(hv)^m} \tag{9}$$

#### 1.2.2 Espalhamento dos raios X

O espalhamento da radiação X ocorre quando um fóton de raios X interage com os elétrons dos elementos químicos, sem que haja os fenômenos quantizados de absorção/emissão de energia pelo átomo. Assim, esses efeitos acontecem concomitantemente ao efeito fotoelétrico, sendo o efeito de espalhamento mais acentuado para os elementos que apresentam baixos coeficientes de absorção para a radiação X.

A radiação ionizante espalhada geralmente resulta em dois picos de espalhamento: um estreito, por conta dos fótons espalhados elasticamente, e um mais largo de baixas energias representando os fótons que tiveram perdas de energias devido ao espalhamento incoerente no material. O pico estreito está associado ao espalhamento Rayleigh, elástico ou coerente, enquanto o pico mais largo corresponde ao espalhamento Compton, inelástico ou incoerente (Okuno; Yoshimura, 2016).

#### 1.2.2.1. Espalhamento Rayleigh ou coerente

No espalhamento Rayleigh fótons são espalhados sem que haja excitação do átomo alvo, ou seja, as energias dos fótons incidentes e espalhados são a mesma, o que varia é apenas a direção, de acordo com a Figura 10. O espalhamento é denominado coerente devido à superposição coerente das ondas eletromagnéticas difratadas pelas diferentes partes da distribuição de carga atômica (Araújo, 2005).

#### Figura 10 - Espalhamento Rayleigh



Fonte: Salicio, 2016.

A interação entre os fótons da fonte de excitação e os elétrons das camadas externas do átomo é elástica, ou seja, quando não há perda de energia durante o processo de colisão. Todos os átomos espalham fótons de raios X pelo processo Rayleigh a uma maior ou menor extensão, embora a intensidade do espalhamento dependa do número atômico. Para aumentar a probabilidade de acontecer esse espalhamento é necessário que os fótons possuam baixo número atômico (Okuno; Yoshimura, 2016).

A seção de choque do espalhamento rayleigh ( $\sigma_{coe}$ ) é definida pela equação 2 (Okuno; Yoshimura, 2016), onde é possível concluir que o espalhamento Rayleigh tem maior probabilidade de ocorrência para materiais com elevados números atômicos e menores energias.

$$\sigma_{coe} = \alpha \left(\frac{z}{hv}\right)^2 \tag{10}$$

onde Z é o número atômico, h a constante de Plank e v a frequência do fóton incidente.

#### 1.2.2.2 Espalhamento Compton ou incoerente

No espalhamento Compton um fóton é absorvido por um elétron atômico, que emite um fóton secundário, Figura 11. Esta radiação tem comprimento de onda menor e direção de propagação diferente daquela do fóton original. O elétron ativo é promovido a um estado livre, produzindo uma vacância no átomo original (Araújo, 2005). Segundo Compton, os raios espalhados sofrem mudanças no comprimento de onda, caracterizadas por um aumento no seu tamanho (Compton, 1929).

#### Figura 11 - Espalhamento Compton



Fonte: Quoirin, 2004

A variação de comprimento de onda está relacionada com o ângulo de espalhamento (θ). E este apresenta uma relação diretamente proporcional à mudança de comprimento de onda. Conforme expressa na equação de Compton:

$$\lambda_f - \lambda_i = \Delta \lambda = \frac{h}{m_e c} \left( 1 - \cos \theta \right) \tag{11}$$

onde  $\lambda_f$  é o comprimento de onda no estado final,  $\lambda_i$  é o comprimento de onda no estado inicial, h é a constante de Planck, m<sub>e</sub> é a massa do elétron, c é a velocidade da luz.

Para uma dada energia fixa do fóton é possível colocar em movimento elétrons com energia variável. Além disso, a probabilidade de ocorrência do efeito aumenta quando a energia de ligação dos elétrons orbitais se torna desprezível comparada à energia do fóton incidente (Okuno; Yoshimura, 2016). Essa probabilidade pode ser representada por elétron pela equação de Klein-Nishina, que leva em consideração o raio clássico do elétron ( $r_e$ ), tomando a seção de choque de Klein-Nishina como função da seção de choque clássica, teremos:

$$\left(\frac{d_e \sigma_{comp}}{d\Omega}\right)_{KN} = \left[\left(\frac{d_e \sigma_{comp}}{d\Omega}\right)_{Cl}\right] F_{KN} = \\ = \left(\frac{d_e \sigma_{comp}}{d\Omega}\right)_{Cl} \left[\frac{1}{1+\alpha \left(1-\cos\theta\right)}\right]^2 \left\{1 + \frac{\alpha^2 \left(1-\cos\theta\right)^2}{\left[1+\alpha + \alpha \left(1-\cos\theta\right)\right]+\alpha \left(1-\cos^2\theta\right)}\right\}$$
(12)

onde  $\alpha = \left(\frac{hv}{m_e c^2}\right)^2$  e  $F_{KN}$  é o fator de forma de Klein-Nishina e  $\left(\frac{d_e \sigma_{comp}}{d_\Omega}\right)_{Cl} = \frac{r_e^2}{2} (1 + \cos^2 \theta)$ é a seção de choque clássica. Integrando a seção de choque clássica, teremos a seção de choque total para o espalhamento Compton por elétrons livres:

$$\sigma_{comp} = \int \frac{d_e \sigma_{comp}}{d\Omega} \, d\Omega \tag{13}$$

Com isso, pela equação 13 podemos definir a seção de choque atômica para o espalhamento Compton:

$$\sigma_{comp(a)} = Z_e \sigma_{comp} \tag{14}$$

Os efeitos citados anteriormente podem contribuir na atenuação da intensidade de um feixe de raios X. Cada um pode ser caracterizado por um coeficiente de atenuação, em função da energia do feixe de raios X e do número atômico do material.

#### 1.3 Microtomografia computadorizada

A microtomografia computadorizada (micro-CT, em inglês *microcomputed tomography*) é semelhante à tomografia convencional, onde informações tridimensionais sobre objetos podem ser obtidas, a diferença está no tamanho do foco do tubo de raios X e a resolução espacial do detector. No modo convencional, o equipamento que gira e o corpo examinado permanece parado já na micro-CT, além de possibilitar visualizar pequenas estruturas em alta resolução, configura-se pela rotação da amostra durante a passagem do feixe de raios X, como pode ser visto na Figura 12.





Fonte: Barcellos, 2022, p. 33.

Historicamente, a tomografia computadorizada (CT, em inglês *computed tomography*) teve início de sua utilização em meados de 1970, já a micro-CT surgiu poucas décadas depois.

Dentre os trabalhos que mais impactaram e contribuíram para o desenvolvimento da técnica foram os elaborados por Johann Radon e Allan Cormack (Carvalho, 2007).

A técnica realiza a avaliação de materiais através do princípio físico de atenuação de raios X. Com a utilização dos feixes de raios X cada vez mais coerentes amplia a possibilidade de produzir imagens internas de diversos materiais, essa radiação tornou-se uma ferramenta de grande potencial e facilmente foi ampliada para os estudos de estruturas na pesquisa científica atual (Mizutani; Suzuki, 2011).

Fundamentalmente, a micro-CT é uma tomografia de alta resolução que apresenta um Fundamentalmente, a micro-CT é uma tomografia de alta resolução composta por um emissor de raios X, um colimador, um suporte para a amostra e um detector de raios X que apresenta um método de imagem a partir de um conjunto de projeções individuais, radiografias, registradas de diferentes ângulos em torno de um eixo de rotação comum, como na Figura 13. A radiação após interagir com a matéria e atingir o detector é transformada em fótons que são identificados pelo dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês) e geram um sinal eletrônico que é digitalizado e enviado ao computador. Combinando, computacionalmente, essa série informações são geradas imagens em duas dimensões que são usadas para reconstrução tridimensional do objeto investigado, é possível obter informações sobre a estrutura interna numa faixa micrométrica a submicrométrica de resolução espacial (Bartels, 2013).

Figura 13 - Representação de projeções de objetos cilíndricos em diferentes ângulos



Fonte: Kak, et al., 1984, p. 2.

A técnica oferece a vantagem adicional, para os parâmetros de interesse físicos, evita uma preparação invasiva da amostra e não apresenta uma interação destrutiva (Schoeman *et al*,

2016). Ela avalia a estrutura interna de uma amostra por meio de uma fonte de raios X e um detector para obter informações de uma fatia projetada (Kotwaliwale *et al.*, 2014). O mesmo componente pode ser reinstalado após a inspeção ou a amostra pode ser interrogada várias vezes durante os testes e em distintas condições, dependendo do interesse do estudo (Stock, 2009).

A micro-CT de raios X também permite a varredura de toda a amostra devido ao seu grande campo de visão (Léonard *et al.*, 2008). Envolve alguns processos para obtenção do resultado esperado, um modelo tridimensional do material em estudo. O primeiro passo consiste na definição do objetivo, depois é feita a aquisição de imagens bidimensionais, são geradas projeções, através dos sinais captados no detector após a interação da radiação com a amostra. Em seguida, essas projeções, que representam imagens longitudinais, em tons de cinza, passam por um processamento digital, onde são reconstruídas com a utilização de algoritmos matemáticos e finalmente são segmentadas e analisadas.

#### 1.3.1 Pixels

O pixel pode receber diferentes definições que são atreladas à literatura adotada. Para este trabalho foram utilizadas duas definições, ele pode ser utilizado de acordo com as especificações do fabricante e do detector, onde há normalmente uma matriz de pixels na ordem de 1024x1204 ou 2048x2048 pixels. E também pode ser definido como o menor elemento da imagem, no qual é nomeado como pixel efetivo (Pecharsky, Zavalij, 2008; Kropscot, 2013).

A representação de uma imagem digital bidimensional, f(x,y), cujos valores em cada coordenada (x,y) são as amplitudes desta função, indicam o nível de cinza da imagem naquele ponto e demanda um modelo matemático adequado, que depende da função da intensidade luminosa, da fonte de luz, e do objeto em cena (Kak; Slaney, 2001).

$$f(x, y) = i(x, y) r(x, y)$$
 (15)

A radiação após interagir com a amostra e chegar no detector e passar pela matriz de pixels é convertida em um pulso de carga que é lido pelo dispositivo eletrônico e convertido em imagem no sistema binário. A imagem digital é armazenada através de dígitos binários, denominados bits, que podem assumir valores 0 ou 1. A escolha do número de 'bits', por pixel, a serem digitalizados num sistema de aquisição de imagem está relacionada com a capacidade de diferenciação, em escala de cinza, que ela tem e com a capacidade de armazenamento dos
mesmos (Figura 14). Quanto mais bits por pixel, maior será a quantidade de detalhes distinguíveis e maior será o tempo de transmissão até o aparelho de exibição de imagem. Por exemplo, uma imagem com profundidade de bits igual a 8 tem 2<sup>8</sup>,ou seja, 256 tons de cinza possíveis, que corresponde a 1 bytes.

Figura 14 - Processo captação dos sinais analógicos para a imagem digita.



Fonte: Med.web, 2010. Adaptado pela autora.

A escolha adequada dos tamanhos pixels apresenta uma relação direta com a melhor resolução espacial, que representa o quanto é possível distinguir visualmente detalhes finos das estruturas, principalmente entre a vizinhança, ou seja, mede quão nítida é a imagem. Desta forma, quanto maior a resolução espacial, mais detalhes podem ser capturados. A definição do pixel utilizado é realizada computacionalmente pelo operador e seus limites dependem da geometria e características do equipamento. Em relação a micro-CT, essa resolução é geralmente expressa em termos do tamanho dos *voxels* (volumes de pixels) na imagem, conforme a Figura 15.

### Figura 15 – Representação de pixel e voxel



Fonte: O-scan, 2020.

A dimensão do voxel é definida pela espessura da camada, pelo campo de visão (FOV, em inglês, *Field of View*) na aquisição, sendo a grandeza que determina as dimensões da área na qual o sistema adquire informações e a dimensão da matriz (que representam uma estrutura simples de armazenamento, manipulação e visualização de dados). A capacidade de apresentar fielmente pequenos detalhes ou variações de uma imagem, determina a grandeza das unidades de informação que a constituem indica a resolução de um dispositivo ou sistema (Kak; Slaney, 2001).

Ao distinguir pontos próximos no espaço, evidenciando os detalhes com a possibilidade de, visualmente, discernir duas regiões próximas, representa a resolução espacial, que está associada diretamente à densidade de pixels da imagem, conforme a Figura 16. É importante ressaltar que uma imagem que contenha um grande número de pixels não necessariamente terá uma maior resolução, já que esta deve ser escolhida de modo a atender ao grau de detalhes discerníveis e quantidade de informações contidas em uma imagem.

Figura 16 - Resolução espacial



Fonte: Quoirin, 2004.

As primeiras linhas são facilmente distinguíveis, ao caminhar para a direita, os pares de linha tornam-se cada vez mais próximos, a frequência espacial da aumenta. Como consequência, torna-se mais difícil distinguir uma linha de outra linha vizinha. Neste método, a resolução é geralmente expressa em pares de linha/mm (Quoirin, 2004). Para uma melhor resolução espacial, é preciso uma menor matriz de pixel utilizada no detector, a fim de captar detalhes em alto nível nas imagens (Ribeiro, 2007), conforme a Figura 17.





Alguns processos além da escolha de pixel fazem parte da digitalização da imagem, como a amostragem que cria a matriz referente a imagem, chamada de grade de amostragem, definindo as suas dimensões (resolução) e ela está diretamente ligada com a quantidade de informação que se deseja guardar, onde cada um dos pequenos quadrados representa um subimagem da real. Após amostrar a imagem o sensor que capta a radiação converte cada observação "real" em uma discreta (fragmentada) definida pelo número de bits usados para armazenar, que recebe o nome de quantização e está relacionada aos níveis de cinza (intensidade), em uma imagem monocromática, permitidos para cada ponto da imagem.

## 1.3.2 Regimes de contraste

O contraste de fase pode ser definido como a visualização de estruturas pouco atenuantes induzida pela refração dos raios X que passam pelo objeto (Snigirev *et al.*, 1995). Um parâmetro importante durante a preparação para a medida das imagens é o tipo de contraste utilizado. A imagem por contraste de fase permite o mapeamento das mudanças no índice de refração, onde suas descontinuidades representam as diferentes densidades nos materiais (Saccomano *et al.*, 2018).

Fonte: Takase, 2023. Adaptada pela autora

A imagem de propagação de raios X, baseia-se na relação entre fonte, amostra e detector. Mas os parâmetros geométricos, a instrumentação, a preparação da amostra, o processamento de dados e a recuperação de fase também influenciam no resultado (Bartels, 2013). Existem várias formas de contraste, dentre elas, as de interesse para esse trabalho são o contraste por absorção, e o contraste de fase por propagação. O efeito do contraste por absorção, Figura 18, é predominante quando a distância entre o detector e a amostra é pequena e para uma determinada energia o coeficiente de atenuação aumenta de acordo com a densidade eletrônica do material e com o número atômico dos materiais que os constituem.

Figura 18 - Contraste de fase por absorção



Fonte: Betz et al., p. 34, 2007. Adaptada pela autora.

A intensidade tem uma redução exponencial com o aumento da distância de propagação dentro da amostra. Já o contraste de fase, Figura 19, é originado pelos efeitos de refração da onda que consistem em distanciar a amostra do detector fazendo com que as informações da fase da onda sejam captadas (Snigirev *et al.*, 1995). Para que aconteça é preciso que o feixe que passa através da amostra apresente alta coerência espacial, e exista uma distância significativa entre a amostra e o detector.

Figura 19 - Contraste de fase por propagação



Fonte: Betz et al., p. 34, 2007. Adaptada pela autora.

Como amostras biológicas são formadas, em sua maioria, por tecidos moles e com densidades bem homogêneas, as diferentes estruturas apresentam baixa absorção de raios X. Tornando a imagem realizada somente dentro do regime de contraste por absorção pouco eficiente e gerando uma imagem de baixa resolução e como consequência, há perdas de nitidez de pequenos detalhes na imagem. (Betz *et al.*, 2007).

Devido às pequenas variações de intensidade e fortes componentes de fase, o contraste de fase por propagação livre torna-se ideal para amostras biológicas utilizadas nesta pesquisa (Zuo *et al.*, 2020). Ele realça o contraste em tecidos moles, mostrando muitos detalhes que não poderiam ser vistos com o contraste por absorção (Sena *et al.*, 2019).

Além de ser simples sua utilização, o pré-requisito para que seja possível utilizar este método é uma alta coerência espacial do feixe incidente, o que pode ser obtido através de uma fonte de luz síncrotron (Gureyev *et al.*, 2000). Os estudos do uso do contraste de fase em imagens utilizando síncrotrons estão em avanço. Eles permitem que a informação da fase seja extraída do feixe que passa pela amostra de interesse, e com essa mudança de fase do feixe, informações importantes sobre o objeto podem ser obtidas (Sena *et al.*, 2019). Quando os feixes chegarem ao detector após a interação com a amostra, haverá uma disposição dos raios desviados causando o que chamamos de interferência, conforme a Figura 20.



Figura 20 - Atuação do contraste de fase por propagação

Fonte: Mayo, 2012, p. 940. Adaptada pela autora.

Em virtude da distância do detector a amostra, não é possível medir a intensidade diretamente atrás da amostra, pois não há influência da mudança de fase na amplitude da onda. A formação da imagem é resultado da interferência construtiva e destrutiva, que junto ao contraste apresentam uma relação diretamente proporcional à distância entre detector e amostra.

#### 1.3.2.1 Matemática dos princípios de contraste de fase por propagação

Por apresentar comportamento ondulatório, é possível determinar o índice de refração que pode ser calculado conforme a equação 11, de acordo com a interação da radiação com a amostra.

$$n = 1 - \delta + i\beta \tag{16}$$

No qual, n é o índice de refração,  $\delta$  relaciona-se à densidade eletrônica da amostra, carrega informações referente a fase e a parte imaginária,  $\beta$ , é diretamente relacionado ao coeficiente de atenuação  $\mu$  e a absorção, e cada um descrito conforme as equações 12 e 13:

$$\delta = \frac{\lambda^2 r_0}{2\pi} \rho_{\varepsilon} \tag{17}$$

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \,\mu \tag{18}$$

onde,  $r_0$  é o raio atômico clássico do elétron,  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X,  $\mu$  é o coeficiente de atenuação da amostra e  $\rho_{\varepsilon}$  representa a densidade eletrônica do material absorvedor.

A fase e a intensidade da onda ao passarem pelo material estão em função da distância entre o objeto e o detector. Há uma dependência com a distância entre o detector e amostra (R2) para o contraste por propagação livre (Nugent, 2010). Nos casos em que a fonte de raios X está posicionada a uma distância R1 considerável da amostra, a exemplo dos síncrotrons que possuem alta coerência espacial, utilizando feixes paralelos a intensidade das franjas de contraste de fase aumenta com a distância R2. Essas franjas apresentam um maior alargamento conforme a distância amostra-detector aumenta, sai de regime de campo próximo para um intermediário, tornando a difração mais evidente (Mayo *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2021). Dessa relação entre R1 e R2, é possível definir o sinal de contraste de fase da propagação efetiva (z), como:

$$Z = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$$
(19)

Para tecidos moles, no contexto da imagem de contraste de fase, o  $\beta$  é, em geral três vezes menor, em ordem de grandeza, em relação ao  $\delta$ , na faixa de energia dos raios-X. Além disso,  $\delta$  apresenta um decréscimo mais suavizado que o  $\beta$  quando há um aumento na energia, em um material homogêneo, conforme a Figura 21 (Momose *et al.*, 2012).

Figura 21 – Atuação dos parâmetros  $\delta e \beta$  na água



Fonte: Almeida, 2013, p. 28.

### 1.4 Projeções

Um conjunto de raios-soma, em uma determinada angulação de um plano paralelo ao feixe de radiação, recebe o nome de projeção (Figura 22). Na microtomografia de raios X, a imagem interna obtida ao final de uma reconstrução representa a distribuição bidimensional dos coeficientes de atenuação do objeto (Fidalgo *et al.*, 2020).



Figura 22 - Representação formação de projeções após os raios-soma atravessarem a amostra

Fonte: Fidalgo et al., 2020, p. 8.

Como a amostra é biológica (material heterogêneo), cada estrutura do seu interior possui um determinado coeficiente de atenuação, de modo que a variação do número de fótons muda de acordo com o caminho realizado. Sendo assim, a atenuação na trajetória A pode não ser necessariamente igual a sofrida ao longo da trajetória B.

A Figura 23 apresenta a seção transversal de um objeto ao ser atravessado por um feixe de raios X paralelos, como o utilizado nesse trabalho.

Figura 23 – Seção transversal atravessada por raios X paralelos



Fonte: Quoirin, 2004. Adaptado pela autora.

A curva P(t) representa a projeção e constitui a informação necessária para a reconstrução de uma seção transversal, já o eixo t está relacionado à interação com detector e representa a posição do raio-soma na projeção (Soares, 2023). A atenuação ao longo do caminho está relacionada com a amplitude da curva.

Para o caso geral o eixo t pode apresentar uma orientação qualquer, não somente paralelo ao eixo x. A Figura 24 apresenta uma projeção  $P_{\theta}(t)$ , que representa a transformada de Radon da função f(x,y), onde  $\theta$  é o ângulo formado pelos eixos t e x. Cada "medida" é o contorno de uma dimensão da atenuação medida com função da posição, correspondendo a um ângulo particular.

Figura 24 - Generalização da seção transversal do coeficiente de atenuação



Fonte: Quoirin, 2004. Adaptada pela autora.

Assim, a projeção  $P_{\theta}(t)$  é generalizada pela integral de linha, onde ( $\theta$ , t) representa as coordenadas da trajetória percorrida pelos raios X, com passo infinitesimal ds ao longo do raio.

### 1.4.1. Transformada de Radon

Com a obtenção de todas as projeções, torna-se possível reconstruir de forma tridimensional a amostra. Para isso, é preciso fazer uma conversão do conjunto de informações do espaço de Radon (x, y,  $\theta$ ), para o espaço cartesiano (x, y, z), através da transformada de Radon junto aos métodos de projeção filtrada.

A transformada de Radon pode ser aplicada diretamente a tomografia, por representar um conjunto de projeções de raios X em diferentes ângulos que geram imagens no espaço de Radon. Com isso, realizar a sua inversa, proporcionará conhecer qual era o objeto que inicialmente formou o conjunto da função, f, original.

Utilizando a função delta de Krönecker  $\delta(u)$ :

$$\delta(u) = \begin{cases} 1, se \ u = 0 \\ 0, se \ u \neq 0 \end{cases}$$
(20)

Resolvendo as operações matemáticas da equação 16, considerado sistema de coordenadas: fixo (x, y) e rotacional (t, u), utilizado para identificar um ponto de projeção P do objeto.*temos:* 

$$\begin{cases} t = x \cos\theta + y \sin\theta \\ u = -x \sin\theta + y \cos\theta \end{cases}$$
(21)

O sistema de coordenadas x e y em um determinado ângulo  $\theta$ , devem satisfazer a Equação 17 estando entre a linha AB para contribuir com a integral de linha  $P_{\theta}(t)$ , que representa a atenuação total dos raios X após interagir com a amostra.

Substituindo a integral simples por uma integral dupla, teremos a conhecida Transformada de Radon bidimensional da função f(x,y), da seguinte forma:

$$P_{\theta}(t) = f \iint_{-\infty}^{\infty} (x, y) \,\delta \,(x \cos \cos \theta \, + y \sin \theta - t) dx dy \tag{22}$$

A Equação 18, representa o teorema da fatia de Fourier, onde a derivação da transformada unidimensional da projeção paralela é igual a transformada bidimensional de Fourier da amostra original (Figura 25).

Ela fornece essa transformada bidimensional ao longo da linha radial, com esses dados da projeção, e permite estimar o objeto realizando a transformada inversa de Fourier bidimensional. Em outras palavras, ao usar todas as projeções, uma imagem em 2D pode ser reconstruída analiticamente pela equação 18 que enuncia que os dados da transformada em uma dimensão da projeção  $P_{\theta}(t)$  representam um subconjunto dos dados da transformada em 2D F (u, v) ao longo da linha AB.

### Figura 25 – Representação do Teorema da fatia de Fourier



Fonte: Kharfi, 2013. Adaptada pela autora.

O sistema de coordenadas (t, u) corresponde à rotação do par de eixos (x, y) de um ângulo  $\theta$ . Sendo possível realizar a parametrização para cada raio-soma.

No domínio do sistema de coordenadas (t, u) a projeção ao longo da linha t é representada por:

$$P_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t, u) dS$$
<sup>(23)</sup>

A transformada de Fourier unidimensional fornece a seguinte fórmula:

$$S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(t) e^{-2\pi i \omega t} dt$$
<sup>(24)</sup>

onde  $\omega$  é a frequência espacial.

Ao substituir a definição da projeção, apresentada na Equação 23, a Equação 24 pode ser escrita da seguinte forma:

$$S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} f(t, u) dS \right] e^{-2\pi i \omega t} dt$$
<sup>(25)</sup>

Transformando o resultado para o domínio de coordenadas (x, y), teremos:

$$S_{\theta}(\omega) = \iint_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \, e^{-2\pi i \omega t \, (x \cos \theta + y \sin \theta)} dx \, dy \tag{26}$$

Agora, tem-se a uma relação cujo lado direito da igualdade representa a transformada de Fourier bidimensional, F(u, v), com u =  $\omega \cos \cos \theta$ ;  $v = \omega \sin \theta$ .

$$F(u,v) = \iint_{-\infty}^{\infty} f(x,y) e^{-2\pi i (ux+vy)} \, dx \, dy$$
<sup>(27)</sup>

onde, u e v são as frequências espaciais da transformada de Fourier.

Tomando essa transformada para o caso particular, onde v = 0, temos uma equação que é essencial à tomografia computadorizada:

$$F(u,0) = \iint_{-\infty}^{\infty} f(x,y) e^{-2\pi i \, (ux)} \, dx \, dy \tag{28}$$

$$F(u,0) = \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) \right] e^{-2\pi i (ux)} dx dy$$
<sup>(29)</sup>

$$F(u,0) = \int_{-\infty}^{\infty} P_0(t) e^{-2\pi i \, (ut)} dt = S_0(\omega) = F(\omega,0) \text{, para todo } \theta = 0^\circ.$$
(30)

Ao final, tem-se a representação da reconstrução de uma fatia  $S_{\theta}$  ( $\omega$ ), na frequência espacial  $\omega$ , aplicada a uma projeção paralela de uma imagem f (x, y) em um determinado ângulo  $\theta$ , sendo a projeção representada por  $P_{\theta}$  (t) ao longo de uma linha reta t.

## 1.5 Sinograma

Como descrito na seção 1.4.1, a transformada de Radon representa a integração de uma função sobre distintas linhas retas, de um ponto a uma certa distância da origem, onde os valores de todas as linhas geram curvas senoidais, o que graficamente também é conhecido como sinograma.

Sinograma é uma imagem dos dados adquiridos na micro-CT, representa uma imagem formada por cada posição vertical das projeções que correspondem a uma imagem t do objeto. Onde os raios são plotados horizontalmente e a visualização é feita no eixo vertical. É um processo que acontece antes da reconstrução da imagem.

Representa um perfil de intensidade por ângulo de rotação e nos fornece a informação empilhada das intensidades em uma determinada linha de pixels da projeção para cada ângulo

em que foi obtida. A Figura 26 apresenta um esquema ilustrativo da construção de um sinograma (Bartels, 2013).



Figura 26 – Representação do sinograma

Legenda: (a) Representação do sinograma  $P(\theta, x)$  ao longo de projeções em dois ângulos diferentes; (b) uma pilha de sinogramas reconstruindo a imagem por meio da transformada inversa de Fourier; (c) Representação do sinograma da amostra deste trabalho.

Fonte: Bartels, 2013, p. 54. Adaptada pela autora; A autora, 2023.

A partir desta informação é possível reconstruir as fatias tomográficas (cortes transversais bidimensionais) que são utilizadas para construir as imagens tridimensionais. Para reconstruir a imagem a partir das informações do sinograma, utiliza-se a transformada inversa de Fourier para obter uma fatia, conforme a Figura 20, e o conjunto de fatias empilhadas virtualmente com o uso de um software produz uma imagem tridimensional, como visto na Figura 27 (Soares, 2023).



Figura 27 - Representação do processo fatias 2D para uma imagem em 3D

Fonte: Krenkel, 2015, p. 69. Adaptada pela autora

### 1.6 Reconstrução

As técnicas de reconstrução de imagens representam processos matemáticos que constroem modelos tridimensionais do objeto de interesse a partir de suas projeções bidimensionais, conforme a Figura 28.

Figura 28 - Aquisição da imagem até a reconstrução



Fonte: A autora, 2024.

O processo de reconstrução para a microtomografia computadorizada consiste em dois processos opcionais, normalização e recuperação de Fase, que são procedimentos realizados

nas projeções a fim de aprimorar a qualidade da imagem tridimensional e o processo de aplicação dos métodos matemáticos para aquisição das fatias reconstruídas (Kak; Slaney, 2001).

## 1.6.1 Normalização das projeções

A normalização é uma etapa que visa ajustar possíveis falhas causadas por impurezas que não fazem parte da amostra em cada uma das projeções. Para o procedimento são obtidas duas projeções sem a amostra, primeiramente com o feixe desligado, imagem *dark*, e depois com o feixe ligado, imagem *flat*. A imagem dark, normalmente mais utilizada, possibilita a correção das variações e artefatos de fundo, e a imagem flat é utilizada para corrigir as variações de sensibilidade do detector, tomadas em dois momentos, antes e após o escaneamento da amostra, conforme a equação 31:

$$I_{normalizada} = \frac{I_{projeção} - I_{dark}}{I_{flat} - I_{dark}}$$
(31)

onde,

$$\begin{split} I_{projeção} &= \text{imagem da projeção da amostra} \\ I_{normalizada} &= \text{imagem da projeção normalizada da amostra} \\ I_{flat} &= \text{imagem da projeção com o feixe de raios X ligado e sem a amostra.} \\ I_{dark} &= \text{imagem da projeção com o feixe de raios X desligado e sem a amostra.} \end{split}$$

Figura 29 - Processo de normalização de uma projeção



Legenda: Em (a) temos a representação da imagem flat, em (b) a projeção não normalizada e em (c) a projeção normalizada.

Fonte: Barcellos, 2019, p. 39. Adaptada pela autora.

Na Figura 29, é possível notar o quanto o processo de normalização pode auxiliar na remoção de artefatos pertencentes apenas ao sistema de detecção e não a amostra, melhorando a qualidade da imagem nas projeções.

## 1.6.2 Recuperação de fase (Phase Retrieval - PhRt)

Entre a mudança de fase de um objeto e a intensidade registrada existe uma relação, cuja sua inversão recebe o nome de recuperação de fase. Essa mudança é proporcional às projeções através da distribuição tridimensional no índice de refração do objeto. Ao recuperar a fase, o índice de refração pode ser reconstruído, utilizando a fase como entrada para um algoritmo de reconstrução das tomografias (Zuo *et al.*, 2020).

Um grande desafio na imagem de propagação de raios X é a recuperação de informações de fase usando fases numéricas adequadas, pois as secções transversais de absorção de elementos mais leves que constituem o tecido mole são pequenas e o contraste não se torna suficiente. É um processo realizado fazendo a utilização de um algoritmo matemático após a aquisição das imagens com o objetivo de corrigir a perda de informações decorrente do contraste de fase e recuperar a distribuição de fase. O campo de ondas da radiação X, ao atravessar o objeto sofre a mudança de fase em virtude do decréscimo do índice complexo de refração do objeto (Bartels, 2013). Para contornar essa situação, utiliza-se dos recursos do método matemático da recuperação de fase nas projeções adquiridas.

Analisar os parâmetros  $\delta \in \beta$ , vistos na seção 1.3.2.1, torna-se relevante na recuperação de fase. Pois seguindo a descrição do Paganin, essa razão entre eles está inserida na equação de transporte de intensidade, conforme a equação 35, que junto a espessura do material que é atravessado pelo feixe torna-se possível encontrar a fase original da onda antes do contraste de fase ao realizar as operações matemáticas (Paganin *et al.*, 2002).

Considerando a descrição da evolução da intensidade de uma onda eletromagnética monocromática pela equação do transporte de intensidade, partindo do teorema de Poynting, temos:

$$\nabla_{\perp} \left[ I(r_{\perp}, z) \, \nabla_{\perp} \, \phi(r_{\perp}, z) \right] = -\frac{2\pi \, \partial}{\lambda \, \partial_z} \, I(r_{\perp}, z) \tag{32}$$

onde  $r_{\perp}$  é perpendicular ao plano z,  $I(r_{\perp}, z)$  representa a intensidade do feixe e a sua fase é  $\emptyset(r_{\perp}, z), \lambda$  é o comprimento de onda e  $\nabla_{\perp}(r_{\perp}, z)$  é o operador gradiente ao plano que contém  $\lambda \in r_{\perp}$ .

O trabalho proposto por (Paganin *et al.*, 2002) considera o objeto composto por um material aproximadamente homogêneo e escaneado por um feixe monocromático. Tomando como base esses parâmetros, é possível reescrever a equação 3, para Z = 0, como:

$$I(r_{\perp}, 0) = I_0 e^{[-\mu T(r_{\perp})]}$$
(33)

onde  $T(r_{\perp})$  é a espessura da projeção do objeto homogêneo no plano em que a imagem é tirada. Considerando um objeto fino o suficiente, a fase do feixe luminoso na superfície de saída é proporcional à  $T(r_{\perp})$ .

Daí, para Z = 0:

$$\phi(r_{\perp},0) = \frac{2\pi}{\lambda} \delta T(r_{\perp}).$$
(34)

Ao aplicar as equações 33 e 34 na equação 32, obtém-se a equação do transporte de intensidade para a espessura da projeção  $T(r_{\perp})$  do material homogêneo.

$$T_{(r_{\perp})} = -\left(\frac{1}{\mu}\right) \log \left\{ F^{-1} \left[ \mu \frac{F\left(\frac{M^2 I\left(M r_{\perp}, z = R_2\right)}{I_0}\right)}{R_2 \delta \frac{|k_{\perp}|^2}{(M+\mu)}} \right] \right\}$$
(35)

Onde,

 $T_{(r_{\perp})}$  = espessura do material absorvedor

M = Função da distância entre a fonte e a amostra e a distância amostra-detector (M =  $\frac{R_1 + R_2}{R_1}$ ), magnificação.

 $F^{-1}$  =Transformada inteversa de Fourier em relação a  $r_{\perp}$ .

 $r_{\perp}$  = Plano ortogonal

F = Transformada de Fourier em relação a  $r_{\perp}$ .

 $k_{\perp}$  = Número de onda em relação a  $r_{\perp}$ .

 $\mu$  = Coeficiente de atenuação.

 $\delta$  = Parâmetro delta.

Este campo modificado se propaga ao longo de uma distância até o plano de detecção. Cuja detecção é limitada, conforme as medidas de intensidade. Detectores de radiação não são sensíveis a variação de fase de uma onda eletromagnética, sendo apenas sensíveis a variação da amplitude, devido à alta frequência de oscilação da luz (Barcellos, 2022). Portanto, a informação de fase do campo de onda é perdida, e este fenômeno é denominado problema de fase.

Dentre os métodos de recuperação de fase, o algoritmo utilizado neste trabalho foi o da equação de transporte de intensidade (TIE, *em inglês, Transport of Intensity Equation*), desenvolvido por Dr. David Paganin, onde ele apresenta um cálculo simples, que não demanda instrumentos ópticos complexos, que auxilia na solução para esse problema de fase e na quantificação de imagens obtidas pela técnica de contraste de fase que utiliza raios X (Paganin *et al.*, 2002).

## 1.6.3 Retroprojeção filtrada (filtered back projection)

Dentre os algoritmos de reconstrução de imagem, a retroprojeção filtrada (FBP, do inglês, *filtered back projection*) representa um algoritmo matemático amplamente utilizado em imagem de CT para diminuição do desfoque na imagem reconstruída e possibilita o cálculo da transformada inversa de Radon. O método é baseado na retroprojeção dos valores dos somatórios das projeções em cada ponto da trajetória dos raios X (Choo *et al.*, 2014).





Nesse método, o valor de cada projeção retoma a uma matriz vazia por meio da transformada inversa de Fourier, e sempre adiciona ao pixel o valor referente à projeção seguinte, conforme a Figura 30, (Alvarenga, 2022).

Como resultado, é gerada uma matriz resposta com a retroprojeção de todos os valores de cada projeção realizada, onde o somatório dos valores obtidos em cada projeção é o mesmo, as projeções tanto no ângulo  $\theta$  quanto em  $\theta$  + 180° possuem os mesmos valores, porém em ordem inversa, válido para feixes paralelos. O que leva a uma otimização no processo, por não necessitar do uso das projeções ao longo de uma volta completa.

Esse algoritmo tem como fundamento o Teorema da Fatia de Fourier, por utilizar a mudança de coordenadas dos argumentos da transformada inversa bidimensional de Fourier (Pandey, 2021). Levando em consideração que F ( $\omega$ ,  $\theta$ ) e F (u, v) são funções que se equivalem, é possível escrever a função original f (x, y), como:

$$F^{-1}\{f(x,y)\} = f(x,y) = \iint_{-\infty}^{\infty} F(u,v) e^{2\pi i (xu+yv)} du dv$$
(36)

Que em coordenadas polares, a transformada de Fourier obedece à seguinte propriedade: F ( $-\omega$ ,  $\theta$ ) = F ( $\omega$ ,  $\theta$  +  $\pi$ ).

Com isso, chegamos na transformada de Fourier em coordenadas polares:

$$f(x,y) = \iint_{-\infty}^{\infty} F(\omega,\theta) |\omega| e^{2\pi i (x\cos\theta + y\sin\theta)} d\omega d\theta$$
(37)

E por consequência da relação:  $S_{\theta}(\omega) = F(\omega, \theta)$ , a equação acima pode ser escrita como a equação fundamental do FBP, com  $|\omega|$  representando o filtro:

$$f(x,y) = \int_0^{\pi} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(\omega) |\omega| e^{2i\omega\pi(x\cos\theta + y\sin\theta)} d\omega \right] d\theta$$
(38)

Podemos nomear a equação no interior dos colchetes como:

$$f(x,y) = \int_0^{\pi} Q_{\theta}(t) \, d\theta \tag{39}$$

Daí, teremos

$$Q_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(\omega) |\omega| e^{2i\omega\pi(x\cos\theta + y\sin\theta)} d\omega$$
<sup>(40)</sup>

A função é chamada de projeção filtrada de cada  $P_{\theta}(t)$  com filtro  $|\omega|$ , representando a transformada inversa de Fourier de  $S_{\theta}(\omega) |\omega|$ .

O teorema da fatia de Fourier indica que utilizando as projeções de uma função da amostra em seus diferentes ângulos, com a aplicação da transformada de Fourier de cada um, pode-se determinar os valores ao longo das linhas radiais (Pai, 2002).

Ao final do processo, realiza-se a filtragem com o uso de algoritmos matemáticos, visando eliminar as baixas frequências que são responsáveis pelo efeito de esbranquiçado na imagem reconstruída (Dudgeon, 1984), de acordo com o parâmetro escolhido. O filtro utilizado neste trabalho, foi o Sheep-Logan, Figura 31, ele filtra frequências maiores que um determinado valor, chamado de frequência de Nyqyist<sup>3</sup>, onde todos os valores são reduzidos a zero, a partir dele (Alvarenga, 2022).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Teorema de Nyquist e diz que, para converter um sinal analógico em sinal digital de forma fiel, a frequência da taxa de amostragem deve ser no mínimo duas vezes maior que a frequência do sinal de interesse. (Amostragem é conversão do sinal é a transformação de um sinal contínuo em um sinal discreto)





Legenda: (a) sem o filtro e (b) com o uso do filtro. Fonte: Fidalgo, 2019, p. 15.

Caso tenha problemas na relação intensidade e projeção, pode gerar artefatos, que são observados ao longo das projeções, nesse trabalho, normalmente em forma circular, anéis.

# 1.7 Segmentação

Concluídas as etapas de pré-processamento e de reconstrução das imagens, o processo seguinte é a segmentação, que consiste na análise qualitativa da reconstrução tomográfica com a seleção da região de interesse (ROI), visto na Figura 32 (Fidalgo, 2019).

Figura 32 – Processo de segmentação da imagem



Fonte: A autora, 2023

Apresenta-se como uma grande ferramenta capaz de separar estruturas da imagem e gerar as quantificações precisas de volumes, por possibilitar tanto a visualização quanto a morfometria da região desejada da amostra. Grande parte dos métodos de segmentação baseiam-se na descontinuidade<sup>4</sup> e na similaridade<sup>5</sup>, que representam propriedades básicas dos níveis de cinza das imagens.

Neste trabalho foi utilizada a segmentação semântica, técnica realiza o agrupamento dos pixels que apresentam uma relação homogênea, por exemplo, em relação a tom de cinza, textura e intensidade para separar a imagem em diferentes regiões, ou segmentos. Torna-se possível distinguir e classificar o que é a região de interesse e o que é a região externa, chamada de background (Khan, 2013). Como pode ser visto na Figura 33, onde o gato e o cachorro representam a ROI e todo o restante não é considerado.

Figura 33 - Segmentação semântica



Fonte: Kumar, 2021.

Este processo pode ser realizado de diferentes métodos, de acordo com grau de automação (Soares, 2023):

- i. Manual: Cada fatia é segmentada manualmente pelo usuário.
- ii. Semiautomático: Realizado através de interpolação (consiste em fornecer informações iniciais pelo usuário, delimitando a região de interesse, através da segmentação manual de duas fatias, espaçadas entre si, e utilizar a ferramenta de interpolação para realizar uma transição entre essas fatias).

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Consiste em dividir a imagem de acordo com mudanças significativas dos tons de cinza, com análise de borda ao mudar de meio.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Consiste na separação da imagem em regiões que a compõem de acordo com a semelhança entre as intensidades, seguindo critérios de ajustes pré-definidos.

 iii. Automático: Utiliza recursos computacionais de *Deep Learning*, com o modelo de rede U-Net para treinar e identificar de forma automática a região de interesse.

Dependendo dos dados de entrada e dos resultados almejados, cada um dos métodos pode se apresentar mais favorável. Para este trabalho, foram realizados os métodos automáticos e o semiautomático com o uso do programa *Dragonfly*, como apresentado na Figura 34. *Dragonfly* é um programa para processamento científico de imagens desenvolvido e distribuído pela *Object Research Systems* (ORS), Montreal, Canadá, 2019 (Dragonfly, 2023)





Fonte: A autora, 2023

Com o modelo automático, foi utilizado o assistente de segmentação, *Segmentation Wizard*, conforme a Figura 35, onde o usuário seleciona o intervalo de fatias que contenha a região a ser segmentada (Dragonfly, 2022). Em seguida, o usuário pré-define um conjunto de regras ao realizar treinos através da segmentação manual de fatias, (*frames* na linguagem do programa) a fim de criar um modelo que, em cima das informações de entrada do usuário, consiga identificar a região quando for aplicado em diferentes amostras, otimizando quando há uma grande quantidade de dados.



Figura 35 - Interface da aba Segmentation Wizard

Fonte: A autora, 2023

No processamento de imagem, em todo processo para a segmentação foi utilizada a limiarização (TH, em inglês, *Thresholding*), que representa uma etapa bem importante (Gonzalez; Woods, 2000). Primeiramente foi escolhido um valor de limiar que separa duas regiões, basicamente essa ferramenta extrai regiões de interesse através da análise de similaridade dos níveis de cinza da imagem (Sales *et al.*, 2010). Em outras palavras, determina-se uma intensidade de cinza, chamada de limiar, que separa as partes da imagem, de forma que grupos de pixels com intensidades parecidas sejam separados uns dos outros.

De acordo com esse histograma de intensidade de cinza, pôde ser visto o limite entre as regiões com intensidades de cinza semelhantes. E foi utilizada a ferramenta *Define range*, do *Dragonfly*, que agrupava regiões que apresentavam uma certa homogeneidade. Esta ferramenta exerceu um grande auxílio devido a existência de muitas regiões críticas entre o cérebro e o olho da mosca, conforme a Figura 36.

a) 8(9) 4(1 & 626.60) µm Range Mir: 102.85 Max: 145.69 Sice 1134 / 2018 Yew: 0.0\* Rolt: -0.0\* Control Co

Figura 36 - Região definida pela homogeneidade das estruturas

Legenda: a) imagem sem a seleção da ferramenta *Define range*; b) região marcada conforme a similaridade. Fonte: A autora, 2023.

## 1.8 Drosophila melanogaster

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (Figura 37), tem sido usada como um organismo experimental em estudos de genética desde o início dos anos 1900 (Rubin, 1988). Ela pertence ao reino *Animalia*, classe *Insecta*, ordem *Diptera*, família *Drosophiliade*, gênero *Drosophila* e a espécie *Drosophila melanogaster*.





Legenda: a) Vista frontal da *Drosophila melanogaster* e *b)* Morfologia. Fonte: Flaya, 2020. Adaptada pela autora.

As *D. melanogaster* apresentam dimorfismo sexual e são facilmente distinguíveis. Os machos apresentam um dorso mais escurecido e são menores do que as fêmeas que têm cerca

de 2,5 mm de comprimento (um pouco menor que um grão de arroz), (Ewart; Howells, 1998). Além disso, os machos têm um conjunto de pêlos pontiagudos, que funcionam como grampos, ao redor das partes reprodutoras usadas para se prender à fêmea durante o acasalamento enquanto as fêmeas apresentam listras claras e escuras por todo segmento abdominal, como pode ser observado na Figura 38.

Figura 38 - Representação do macho e da fêmea da D. melanogaster



Legenda: Macho à esquerda e fêmea à direita. Fonte Flaya, 2020.

Em condições ideais de crescimento, sob uma temperatura de 25°C, o seu ciclo de vida dura cerca de 50 dias, desde o ovo à morte, porém seu período de desenvolvimento pode variar de acordo com a temperatura (Chiang; Hodson, 1950). O ciclo de vida da *D.melanogaster* é dividido em 4 etapas: embrião, larva, pupa e adulto. A 25°C, os ovos medindo cerca de 0,5 mm, eclodem em 12 a 15 horas. As larvas resultantes crescem por 4 dias atravessando 3 estágios larvais, em aproximadamente 24 a 48 horas após a eclosão (Figura 39). Durante esse período, se alimentam dos microrganismos que decompõem a fruta, assim como dos açúcares da fruta (Linford *et al*, 2013).



Figura 39 – Ciclo de vida da Drosophila melanogaster

Fonte: Flaya, 2020. Adaptada pela autora.

Essa espécie tem sido utilizada para modelar doenças cerebrais humanas, essa modelagem oferece várias vantagens para a investigação de mecanismos moleculares e celulares subjacentes às doenças humanas (Jeibmann *et al.*, 2009).

A *D. melanogaster* é um dos primeiros organismos com um genoma totalmente sequenciado, Adans *et al.* (2020), e apresenta quatro pares de cromossomos, um par X/Y e três autossomos rotulados 2, 3 e 4, no entanto o último cromossomo é bem pequeno, que às vezes é não é levado em consideração (Figura 40). São aproximadamente 13.600 genes codificadores de proteínas (Adams *et al.*, 2020). Dos 287 genes de doenças humanas reconhecidos, um total de 197 (69%) possuem um homólogo de *Drosophila melanogaster* (Johnston, 2002).

Figura 40 – Cromossomos da Drosophila melanogaster



Legenda: Os símbolos na parte inferior indicam os nomes dos cromossomos. Círculos brancos com bordas azuis representam centrômeros e são omitidos do cromossomo 4. Fonte: Molnar, 2022, p. 3.

As semelhanças biológicas (também conhecidas como ortologias) entre humanos e *D. melanogaster* têm sido bem exploradas ao longo dos anos (Jeibmann, 2009). O poder da genética da mosca da fruta está a ser utilizado contra alguns dos problemas mais intratáveis e economicamente significativos da medicina moderna, as doenças neurodegenerativas (Moloney *et al.*, 2009).

O cérebro da *Drosophila melanogaster* tem um sistema nervoso central semelhante, porém mais simples, em comparação com os mamíferos. Ambos os sistemas consistem em neurônios e glias de suporte com os mesmos neurotransmissores, que são protegidos por uma barreira hematoencefálica, indicando que os princípios básicos da rede neural são conservados de invertebrados para vertebrados (Johnston, 2002).

A mosca da fruta apresenta uma anatomia bem estudada, com seu cérebro e sistema nervoso bastante complexos. Conforme a situação observada em pacientes com doença de Alzheimer (DA), elas mostram um declínio robusto dos neurônios na superexpressão de proteínas ligadas à DA. Embora os detalhes específicos das interações proteína-proteína possam variar entre insetos e humanos, o grau de conservação funcional pode ser surpreendente (Johnston, 2002).

A doença de Alzheimer é a causa irreversível mais comum de demência senil (Herrup, 2010). É caracterizada pelo comprometimento cognitivo e neurodegenerativo progressivo e afeta mais de 24 milhões de pessoas em todo o mundo (Ferri *et al.*, 2005). O diagnóstico definitivo da DA requer a identificação correta das características neuropatológicas clássicas, cuja explicação dominante, mas não exclusiva, é a agregação de placas amilóide extracelulares. Essas placas são compostas principalmente por peptídeos  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) (Chow *et al.*, 2010), a sua deposição no cérebro é estimada como o evento central que inicia a progressão da doença, pois ativam mecanismos neurotóxicos (Hardy; Higgins, 1992).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para esta seção serão apresentados as amostras, obtidas previamente a dissertação fornecidas em colaboração, e os métodos utilizados no trabalho, passando pelas etapas do processamento da imagem digital que consiste em etapas que vão desde o preparo, aquisição das imagens de micro-CT, parâmetros físicos e as etapas até a segmentação e análise dos dados para capturar, representar e transformar a imagem com o auxílio do computador, conforme o esquema apresentado na Figura 41.

Cada uma dessas técnicas quando empregadas permitem a extração e identificação de informações das imagens visando uma melhor qualidade e facilitando a percepção humana e a interpretação automática por meio dos aparatos computacionais. É importante evidenciar que as informações fornecidas pela micro-CT se apresentam úteis para responder diversas perguntas no espectro biológico de insetos, inclusive em aplicações biomédicas relacionadas a insetos modelo bem caracterizados, como a *Drosophila melanogaster* (Mattei *et al.*, 2015; Schoborg et al., 2019; Khezri *et al.*, 2021; Morimoto *et al.*, 2022).

Figura 41 - Fluxograma das etapas do processamento digital



Fonte: A autora, 2024.

### 2.1 Preparo das amostras

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas duas medidas experimentais, cujas preparações das amostras se diferenciam de acordo com a colaboração e com o meio em que foram realizadas as aquisições das imagens, visando comparar o melhor meio para estabilização das amostras. Ambas as medidas foram feitas a fim de encontrar as condições que proporcionassem uma melhor qualidade da imagem, para isto, foram adquiridas utilizando a técnica experimental em varreduras de linha de luz micro-CT, realizadas de acordo com as configurações disponibilizadas na linha de luz SYRMEP (Elettra – Itália).

Na primeira medida (Figura 42), realizada em agosto de 2022, as amostras utilizadas foram coletadas de uma população na Bretanha (França, 2015), fornecidas em colaboração com Herve Colinet (Henry *et al*, 2018). Inicialmente, as moscas (população > 1.000 indivíduos) foram mantidas em uma gaiola com gerações sobrepostas, a 20 °C e cerca de 50% de umidade, com ciclos de 12h de luz e 12h escuro. Foram incubadas a 25 °C até a emergência adulta, os experimentos foram conduzidos com uma dieta padrão de levedura-sacarose (Fervedura de cerveja MP Biomedicals 0,290.331.205, sacarose comercial, ágar Sigma-Aldrich A1296, Sigma-Aldrich e 0,5% Nipagin Sigma-Aldrich).

Os ovos foram coletados por 6h usando um dispositivo de oviposição (Prato de Petri (90 mm)) coberto com uma solução de suco de groselha comercial e ágar a 1% e revestido com uma fina camada de pasta de levedura. Em seguida, foram transferidos apenas os machos para frascos frescos com a dieta padrão e incubados por 5 dias antes de serem mortos a -20 °C. Feito isto, foram transferidos para um gradiente crescente de etanol (de 20% a 100%, em intervalos de 10%, 2h em cada solução) para estabilização antes da imagem. Na medida, foram utilizadas 22 amostras dentro da uma pipeta com etanol 100%, foi utilizado pixel de 0,9 µm, com filtro de Si de 1,5 mm, fornecendo energia média de 25 keV com distância detector amostra (SDD, *Sample-to-Detector Distance*) de 150 mm e utilizando radiação síncrotron de contraste de fase, sem marcação. Dentre essas amostras selecionadas foi escolhida um macho medido no álcool.



Legenda: (a) na pipeta contendo etanol 100%; (b) as moscas selecionadas para medida.

Fonte: Laboratório de Física Aplicada às Ciências Biomédicas e Ambientais (LABFISMED), 2022.

Na segunda medida (Figura 43), realizada em junho de 2023, as *D. melanogaster* foram recebidas através da parceria com o Prof. Per Hammarström da Universidade de Linköping (Suécia). As amostras foram enviadas no álcool 99%, em seguidas foram imersas em álcool 70%, depois foram hidratadas novamente para 0% em passos de 20 a 30% e por fim foram colocadas na pipeta contendo hidrogel Pluronic F-127 (30%) para a estabilização.

Neste trabalho, para realização da análise quantitativa do volume cerebral da D.melanogaster foi selecionado, dentro de um grupo com 120 amostras medidas, um macho com o tempo de vida entre 8 e 10 dias com a presença da proteína abeta nas células neurais do cérebro. Foi medida com pixel de 1,5 µm, energia média de 16 keV e filtro de Si de 0,5 mm, com um intervalo de varredura de 180°.

Figura 43 - D. melanogaster na bancada experimental





Legenda: (a) na pipeta contendo hidrogel; (b) as moscas selecionadas para medida.

Fonte: A autora, 2023

(a)

## 2.2 Linha de luz SYRMEP

Para os experimentos realizados foi submetido um projeto para a linha de luz de microtomografia SYRMEP (*SYnchrotron Radiation for MEdical Physics*) pertencente ao laboratório de radiação síncrotron de terceira geração ELETTRA, localizado em Trieste/Itália. Ela representa uma das 28 linhas pertencentes à estrutura do síncrotron, conforme a Figura 44. O projeto revisado por comitê foi aprovado e recebeu suporte financeiro do ICTP (International Centre of Theoretical Physics).

Figura 44 – Vista superior das linhas de luz do Elettra



Legenda: A linha SYRMEP está destacada no retângulo vermelho. Fonte: Elettra Sincrotrone Trieste, 2022

Um imã de flexão localizado a 23 m da cabana experimental é a fonte de radiação síncrotron da SYRMEP, responsável pela produção de raios X duros (Donato, *et al.*, 2022). No setup experimental, conforme a Figura 45 (b), é possível observar o caminho do feixe de raios X partindo da fonte, passando pelas fendas de entrada, onde é possível determinar a forma e tamanho do feixe (micrométrico). Na etapa seguinte o feixe passa pelo monocromador duplo de cristais de Si (111), que permite a variação da energia na faixa de 8,5 keV a 35 keV, conforme a difração de Bragg (Figura 46), esse equipamento não fez parte deste *setup* experimental. A próxima etapa é a passagem por outras fendas duplas a fim de alinhar as dimensões do feixe de luz, que na linha apresenta um feixe de saída paralelo e antes de ter o contato com a amostra, passa pela câmara de ionização onde acontece a detecção da radiação que irá incidir na amostra, depois interage com o objeto estudado e chega ao detector.

Figura 45 – Trajetória do feixe de raios x da fonte ao detector



Legenda: (a) vista panorâmica do terreno do Elettra; (b) Setup experimental da linha SYRMEP; (c) cabana. experimental da linha.

Fonte: Chen, et al, 2012, p. 4996. Adaptada pela autora.

Figura 46 - Monocromador de Si (111) da SYRMEP



Fonte: Elettra Sincrotrone Trieste, 2023.

No aparato experimental, que pode ser controlado pelo usuário na sala de controle para alinhamento e ajuste de posição de acordo com o campo de visão, a amostra foi colocada sobre o hexápode de alta resolução (Physik Instrumente H-840.G2), com capacidade de rotação (Micos UPR-160 Air) sob um intervalo angular constante, durante a passagem do feixe (Brombal, *et al.*, 2021).

Durante este processo, para cada passo angular, uma radiografia foi sendo gravada pela câmera sCMOS de 16 bit refrigerada por água (Hamamatsu C11440-22C ORCA-Flash 4.0 v2),

com 2048x2048 pixels<sup>2</sup>, apresentando variação no tamanho do pixel de 0,9 μm a 5,7 μm que podem ser ajustados de acordo com as especificidades da medida localizada no detector, Figura 47. Dependendo da distância SDD, é definido o regime de contraste utilizado, que como foi mencionado ao longo do texto, para essas amostras, foi o de contraste de fase por propagação.

Figura 47 - Sistema de detecção da SYRMEP



Legenda: A direção do feixe é representada pela seta amarela. Fonte: Paiva, 2022, p. 53.

## 2.3 Aquisição de imagens

A aquisição das imagens relaciona alguns ajustes de parâmetros de aquisição, dentre eles: uma boa configuração (*setup*), alinhamento entre a posição e altura da amostra em relação ao feixe, utilização de filtros, nível de energia mais adequado, tamanho do pixel que proporcionará uma melhor resolução, o tipo de feixe e em alguns casos, a utilização de contraste de fase ou outras técnicas avançadas.

A estação experimental consiste em um porta amostras (hexápode), um feixe policromático de radiação eletromagnética, um detector e uma bancada para experimentação. Durante a aquisição a amostra foi rotacionada no intervalo angular entre 0° em 180°, conforme a Figura 48. Durante esse intervalo, para o primeiro *setup* foram 1800 projeções adquiridas, com tempo de exposição de 100 ms e para o segundo, foram 1200 projeções mantendo um tempo de 50 ms de exposição.



# Figura 48 - Estação experimental da microtomografia computadorizada

Fonte: Belini et al.2011. Adaptada pela autora.

Na linha de luz SYRMEP, esses ajustes referentes a posição da amostra e campo de visão para aquisição das projeções são realizados pelo painel de controle de posição, (Position Panel, em inglês), conforme a Figura 49.

Figura 49 - Painel de controle de posição da amostra da linha SYRMEP

Positioning Panel							.0	8,0
Hexapod								
X position [mm]	-0.61		٠	1.0		*	Stop	
Z position (mm)	2.82	30		0.5	•		Stop	
Micrometers								
X position [mm]	-0.14		٠	0.3	٠		Stop	
Y position [mm]	1.00			0.3			Stop	
Rotator								
Rotator position [deg]	-0.000	He .	•	180		*	Stop	
	0	lotati	ional spe	ed:			20.00 deg/s	
Bookmarks				Bookm	arked Po	sitions		
Create Bookmark	OMO Sto	re Po	sition					
Go To Stored Positions	<u> </u>	_	:	TON	TOMO:	x=-0.6 = 5.39 x= 5.3	1 Z=2.82 R=-0.0 Z=-3.26 R=180.0 39 Z=1.1 R=0.0	5
Remove Stored Positions	9		:					

Depois do alinhamento realizado e antes de ser escaneada a amostra, é possível ajustar no painel de aquisição, dados como o as posições que foram alinhadas no hexápode (quadrado azul) e no estágio de rotação (quadrado vermelho); nome da amostra e do projeto (quadrado

Fonte: Paiva, 2022, p. 54.

verde); tempo de exposição, número de projeções intervalo angular para o escaneamento, formato de arquivo de saída, número de incrementos no eixo z (quadrado amarelo), Figura 50 (Soares, 2023).

<ul> <li>6.1 - SYRMEP Toma Acquisition Panel</li> </ul>	
ORCAFLIST PIXEAD-8 VHR	
Orca-FLASH	STRATE Chair Henapod Rolator Axis X is deabled Axis Y is ready Device ready Device in Christiane III
Alignment PATAL ALCANIAN Chair X position (mm) - 4.00 Chair Z position (mm) - 19,31 Mexapod U thi (deg) - 6,1177 Mexapod U thi (deg) - 4,3975	Acquisiblen Starting position [deg]: 0.09 Total scan range [deg]: 180.00 Number of projections 1800 Single exposure (ms): 830.00 Pormat: MS
Sefe novements Unit: Mar 2 (nm): 42.00 Safe motion mode Positioning	ALQUIPE TOMO Automatic acquisition?
Hexapod X position (mm) - 0.61 Hexapod Z position (mm) - 2.62	nut C C dark C C Het/Derk
Rotator position (deg): -4.000 Conversion and aplead ToP OPTIONS	Number of projections 40
Investigation: MITELO_28226266 Experiment: CARBONATI Defaset: C256_86	Single exposure [ms]: 896,99



Fonte: Paiva, 2022, p. 55.

Após a realização de todos os ajustes, ocorre a abertura da linha, e os feixes de raios X são liberados e começam a interagir com a amostra. O comando é dado na sala de controle pelo painel de controle apresentado na Figura 51.
SYRMEP	Sinrap Carn X94 V94	erting status ent (mA): is (mm): is (mm): is (mm):	0.000 mA 0.235 mm 0.667 mm	Energ XArgi XArgi	y (GeV): 0.0 GeV e (mrad): 2.000 mrad e (mrad): -0.576 mrad	Describes states FE Harch States BLO Mutch States SS Hatch States SP Hatch States Coperation Mode WHITE BEAU
	VICUIDAL VIC	Den Mint	VLV SIN	Mon O	Gate2 Be Pat, Exit ION VLV EXE Wis2 Fiber Ellis Chen	Exp Politer Pat. Pat. Pat. Chan Silas SHC SHA SHS
initie Lightpeth	FE vacuum averview			_	BL vectors everylew	Casing overview
elemberstatus 😻 – Lightpaticsta	itas 🗃 🕂 HE	0 0000000	0 mbar 26004e-17	nter	Merodyomatar 9.5e-08 mbar	Cooling status 🖷
OPEN OPEN					20.4 Ge-d9 eduar	
0.098	Fit sacuum chamber	9,9999191	H604e-12	mbar	R, varuum chamber: 4,5e-10 mbar	Vitre Defails
Puttent valves	Patient Milers					
	Hiter 0.125 mm	- 10	OUT.		11:23:07 Scipt started T1:23:12 Pirst_Valve_R: command in	arapress
ALL	Fiber 0.25 mm	- N	OUT		11/23:12 Tinit_Value_R: command in 11/23:15 Second Value_R: command	and stated and state and s
SHE DPEN	William G.S. reven	31	OUT		11:23:16 Second, Valve, R. command in 11:23:17 Last, Valve, R. command in	d executed areas
	ribertion	-11	CUT		11/23.17 Last, Valve, R. command ex	oreated
SHA OPEN CLOSE	Piber2 mm	- Pi	OUT		11:23:23 R_GATE2_V: command exe	ruhed
	Fibrr e mm	.01	CUT		11:22/23 Beamline closed	
	Total Thic	iness (mm)	0.955			

Figura 51 – Painel de controle da linha de luz na SYRMEP

Legenda: As informações sobre o anel de armazenamento do laboratório estão no quadrado verde; no quadrado vermelho estão todos os elementos pertencentes à linha de luz. Já no quadrado amarelo, estão o status do feixe na linha e seu caminho até a amostra.

Fonte: Paiva, 2022, p. 56.

Para este trabalho, a linha SYRMEP estava operando a 2,0 GeV com corrente de elétrons de 300mA e foi utilizado feixe policromático. As configurações experimentais para cada medida podem ser vistas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Configurações experimentais da aquisição da medida

Primeira configuração, agosto de 2022				
Energia	2,0 GeV			
Corrente	300 mA			
Modo de operação	Policromático			
Amostra	Drosophila melanogaster (f_wh_Z e f_uro_Z)			
SDD	150 mm			
Tamanho de pixel	0,9 <b>µm</b>			
Energia média	25 keV			
Tempo de exposição	100 ms por projeção			
Número de projeções	1800			
Alcance angular	180°			
Filtro	<i>Filter3</i> – Si 1,5 mm			
FOV	2048x2048			
Estabilização	Etanol 100%			
Radiação síncrotron p	por contraste de fase, sem marcação			

Fonte: A autora, 2023

Tabela 2 - Configurações experimentais da aquisição da medida.

Segunda configuração, junho de 2023				
Energia	2,0 GeV			
Corrente	300 mA			
Modo de operação	Policromático			
Amostra	Drosophila melanogaster			
SDD	100 mm			
Tamanho de pixel	1,5 <b>μm</b>			
Energia média	16,7 keV			
Tempo de exposição	50 ms por projeção			
Número de projeções	1200			
Alcance angular	180°			
Filtro	<i>Filter1</i> – Si 0,5 mm			
FOV	2048x2048			
Estabilização	Hidrogel			

Radiação síncrotron por contraste de fase, sem marcação

## 2.4 Reconstrução

Uma vez obtido o conjunto de dados das de micro-CT, o passo seguinte é a reconstrução das imagens. O processo de reconstrução foi realizado no Lab FisMed/UERJ, onde, com o uso de um software de reconstrução, foram obtidas as imagens das seções transversais (fatias) reconstruídas. que possibilitam а visualização tridimensional das amostras digitalizadas. Todas as reconstruções realizadas neste trabalho foram feitas usando o algoritmo FBP (Filtered Back Projection), com o filtro o Shepp-Logan no software SYRMEP TOMOGRAFY PROJECT (STP), desenvolvido na SYRMEP, com parâmetros adaptados às especificações de cada amostra. As distribuições de ajuste destes parâmetros são divididas por abas na interface do programa, como mostrado na Figura 52.





Fonte: A autora, 2023.

É possível dividir os passos para a reconstrução via STP em cinco etapas:

- I. Entrada dos arquivos em TDF que contém as projeções;
- II. Pré-visualização dos dados (Sinograma, dark, flat, projeção, FOV);
- III. Pré-processamento: normalização e ajuste do artefato de anel;
- IV. Recuperação de fase (regime de contraste de fase);
- V. Reconstrução: ajuste do centro de rotação e arquivo de saída reconstruído em TIFF.

Na etapa III (Figura 53), acontece a normalização da projeção, como visto na seção 1.6.1 Outra ferramenta muito utilizada para as amostras analisadas é a remoção de artefatos de anel, que pode variar no método e no parâmetro, de acordo com a necessidade de cada imagem, desde que não ocorra prejuízos a visualização das estruturas da imagem. Para este trabalho, foi utilizado o método desenvolvido por Rivers (1998) com parâmetro *Width* igual a 50 (Rivers, 1998).

Dataset -		
TDF File:	20_01.tdf	×
Correction	/Normalization	Parametern
Method:	Conventional flat fielding $\qquad \lor$	
	Use post dark /flat images (if found)	
	Use post dark /flat from line: 600 🔹	Airright: 0 🖨
Extended	Field Of View (FOV)	
	Extended field of view overlap:	Guess
	Off-center on the left side of the FOV	
	Apply line-by-line normalization considerin	g the overlap area
		a construction of the second
	Average the overlap area	
	Average the overlap area Number of projections considered: 1200 -	]
De-striping	Average the overlap area Number of projections considered: 1200 (\$ (fing removal)	Parameter
De-striping Method:	Average the overlap area Number of projections considered: 1200 \$ (ring removal)           Rivers, 1998         ✓	Parameters Width: 50 🜩
De-striping Method: Preview	☐ Average the overlap area Number of projections considered: 1200 ♀ (ring removal) Rivers, 1998 ✓	Parameters Width: 50
De-striping Method: Preview Sinogram:	Average the overlap area Number of projections considered: 1200 ↓ (ring removal) Rivers, 1998 ✓	Parameters Width: 50
De-striping Method: Preview Sinogram: Execute	Average the overlap area Number of projections considered: 1200 \$ (ring removal) Rivers, 1998 ✓	Parameters Width: 50 ≑ Preview

Figura 53 – Aba de Pré-processamento do STP

Fonte: A autora, 2023.

Já na etapa IV (Figura 54), foram colocadas as informações dos parâmetros  $\delta$  e  $\beta$  para gerarem a razão desejada, o valor do pixel, a distância detector-amostra e a energia utilizada.

hase Retrieval	
Dataset TDF File: 20_01.tdf	~
(Single distance) Phase retrieval	
Method: Generalized TIE-Hom (Paganin	n et al., 2020) 🛛 🗸
δ: 1.00000 ♠ ×10^ -7 ♣	Pixel size: 1.500 🖨 micron
β: 1.00000 € ×10 <sup>^</sup> -9 €	Distance: 100.0 🖨 mm
δ/β = 100	Energy: 16.7 🖨 keV
	✓ Overpadding (ROI-CT)
Preview	
Projection: 600	Preview
Execute	
Output: S:\TDF\20_01_phrt.tdf	Run

Fonte: A autora, 2023

A Figura 55 representa a imagem antes e depois da fase recuperada.



Figura 55 - Representação da recuperação de fase

Legenda: a) representa a fatia sem a recuperação de fase e b) representa a fatia com a fase recuperada. Fonte: A autora, 2024.

Por fim, é realizada a etapa V com os ajustes dos parâmetros, conforme a Figura 56.

onstruction	
Dataset	
TDF File: 20_01.tdf	~
Pre-processing	
Pre-process the sinogram on the f	ly (see "Pre-processing" tab)
Experimental	Center of rotation
Decimation: 1	Offset: -74.0 - Test
Angles/Projections	
180.00 🗨 deg for projections from	0 ← to 1199 ← Test
(Lossless) Rotation	
Roll 0 = projections (i.e. 0 de	g clockwise rotation)
Reconstruction	
Algorithm: FBP (Filtered Back Projecti	ion) 🗸 🗸
Log transform	Algorithm settings
✓ Circle mask	Filter: shepp-logan (default) 🗸
✓ Overpadding (ROI-CT)	
Correction offset: 0.001 🖨	
Post-processing	
Post-process the reconstructed in	nage on-the-fly (see "Post-processing" tab)
Preview	
Approximate phase retrieval on-the	e-fly (see "Phase Retrieval" tab)
Slice: 1024	Preview
Execute	
Output (TIFFs): E:\MegaStorage\OUT	\20_01\slices\
From: 0 🜩 To: 2047 🜩	Run Subset Run All

Figura 56 – Aba de reconstrução do STP

Fonte: A autora, 2023

A Tabela 3 apresenta os valores dos parâmetros utilizados no programa STP para o processo de reconstrução das imagens.

Etapa	Processo	Parâmetro
	Correção/ Normalização Remoção de anel	<i>Conventional Flat Field</i> <i>Rivers,</i> 1998; Parâmetro: 50
IV	Recuperação de fase	TIE-Hom(Paganin et al., 2002)
		$\begin{array}{l} \delta / \ \beta \ 1: \ \delta = 1 \times \mathbf{10^{-9}} \ \beta = 1 \times \mathbf{10^{-9}} \\ \delta / \ \beta \ 10: \ \delta = 1 \times \mathbf{10^{-8}} \ \beta = 1 \times \mathbf{10^{-9}} \\ \delta / \ \beta \ 100: \ \delta = 1 \times \mathbf{10^{-7}} \ \beta = 1 \times \mathbf{10^{-9}} \\ \delta / \ \beta \ 250: \ \delta = 2, \ 5 \times \mathbf{10^{-7}} \ \beta = 1 \times \mathbf{10^{-9}} \\ \end{array}$
V	Centro de rotação Algoritmo Filtro	Variável por amostra <i>F</i> BP Shepp-Logan <i>Circle mask</i> <i>Overpadding</i> (ROI-CT)

Tabela 3 - Valores dos parâmetros usados no STP para reconstrução.

Fonte: A autora, 2023

Para otimizar o processo, devido à grande quantidade de dados a serem reconstruídos, foi utilizada a ferramenta presente no programa, chamada *Run Complete Reconstruction*, que permite após a introdução dos parâmetros referentes à amostra, um processo automático entre as etapas até a reconstrução (Figura 57).

Figura 57 – Aba da Run Complete Reconstruction.

Complete Reconstruction	-		×
Input Input (TDF):			~
Reconstruction pipeline			
2. Phase retrieval (settings as in "Phase Retrieval" tab)			
3. Reconstruction (settings as in "Reconstruction" tab)			
			^
			~
	Run	Close	e
	Kun	Close	•

Legenda: Ferramenta que otimiza o processo de reconstrução. Fonte: A Autora, 2023.

Após o arquivo de saída ser gerado, a imagem reconstruída pôde ser visualizada usando o software ImageJ, Figura 58, onde é possível utilizar diversas ferramentas.

Figura 58 - Interface do ImageJ

Legenda: (a) Barra de ferramentas do *ImageJ*; (b) uma fatia reconstruída após ser convertida para 8 bits. Fonte: A autora, 2023. Dentre elas, as mais utilizadas foram o ajuste de contraste e brilho, redução no arquivo de 32 para 8 bits, observações ortogonais em diferentes eixos da amostra (Figura 59), análise de histograma, análise de bordas, com a ferramenta *Plot Profile*, que analisa as intensidades de cinza ao longo da linha pré-selecionada, facilitando a visualização do limite entre as estruturas, conforme a Figura 60.



Figura 59 - Visualização da fatia em diferentes planos ortogonais

Legenda: Visualização em diferentes planos ortogonais, com o usando a ferramenta *orthogonal viwes – ImageJ.* a) Visão do eixo XY; b) Visão do eixo YZ e c) do plano XZ.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 60 - Representação do plot profile



Fonte: A autora, 2023

## 2.5 Segmentação da região de interesse

Para este trabalho, a região de interesse para segmentação foi o cérebro da *D*. *melanogaster*, como pode ser visto na Figura 61.

Figura 61 – Cérebro da D. melanogaster adulta



Fonte: Jeibmann, 2009

O processo de segmentação da ROI foi realizado no LabFisMed/UERJ com a utilização do computador que apresenta uma alta performance com GPU 11 GB GeForce, processador Intel i9, 128 GB RAM, no software *Dragonfly*. Dentre os métodos de segmentação, citados na seção 2.6, para este trabalho foram utilizados o método de interpolação e o método com *Deep Learning*, como pode ser visto no esquema da Figura 61.

Figura 62 – Etapas da segmentação da ROI



Fonte: A autora, 2024.

Inicialmente foi selecionada a região que continha o cérebro, dentre as 1648 fatias que compõem a amostra inteira, 130 comportavam todo o volume cerebral. Após essa seleção, foi

iniciada a segmentação em duas etapas diferentes de acordo com a proposta de cada método. O método por interpolação (Figura 63) foi realizado com a segmentação manual a cada 5 fatias, que eram acopladas pela ferramenta de interpolação, correspondendo a 27 fatias feitas, como pode ser visto em diferentes eixos e em 3D na Figura 64.

Figura 63 - Representação da interpolação



Legenda:  $n \in n+1$  representam as fatias segmentadas manualmente e m representa a interpolação entre elas. Fonte: Puc-Rio, 2011.



Figura 64 – Visão 2D e 3D da segmentação por Interpolação

Fonte: A autora, 2024.

Já para o método por *deep learning* foi realizada aprendizagem profunda, com a Rede Neural Convolucional (CNN, do inglês, *Convolutional Neural Network*) usando a arquitetura U-Net, que permite captar o gabarito fornecido de entrada através de fatias (*frames*) que foram feitas manualmente e atribuir informações capazes de diferenciar as regiões e gerar um arquivo de saída binário (Figura 65). Neste método é realizado o gabarito, em seguida é criado o modelo e depois é feita uma máscara que comtemple todas as fatias que contenham o cérebro (a seleção da ROI) e por fim aplica-se o modelo treinado por DL na amostra e obtém-se o resultado da segmentação.

Figura 65 - Rede U-Net com informações de entrada e saída



Fonte: Paiva, et al., 2022, p. 40. Adaptada pela autora.

Nesse método foi realizada a segmentação em duas etapas. A primeira foi com um total de 14 fatias, sendo o processo manual realizado com intervalo médio de 10 entre elas, correspondendo a um treinamento com 11% de toda região cerebral. Na segunda etapa foi feito um teste com 27 fatias segmentadas a mão, com intervalo de 5 entre elas, que correspondem a 21% de todo o cérebro, como pode ser visto, de uma maneira geral, na Figura 66, cujos resultados serão discutidos na seção 3.



Figura 66 – Visão 2D e 3D da segmentação por DL

Fonte: A autora, 2024.

Após as segmentações realizadas, foi realizada uma avaliação estatística com o cálculo do coeficiente de similaridade (DSC, do inglês, *Dice Similarity Coefficient*). DSC tem a função de analisar os conjuntos de segmentações manuais e comparar com as automáticas e semiautomáticas, sobrepondo as informações e fornecendo um percentual de similaridade, que pode ser calculado pela equação 41. Para esse cálculo, quanto mais informações houver dos conjuntos, mais preciso será o resultado avaliado pela equação (DICE, 1945).

$$DSC(A,B) = \frac{2n(A\cap B)}{n(A)+n(B)}$$

$$\tag{41}$$

onde,

A e B representam os conjuntos de segmentações;

# n representa o número de elementos em cada conjunto

Todos os treinamentos foram executados com o código feito em python pelo Lab\_Fismed e utilizando a plataforma Google Colab (<u>https://colab.research.google.com/</u>, onde os dados dos arquivos extraídos de cada conjunto de segmentação foram anexados, comparados e calculados.

Uma das etapas finais do processamento digital da imagem, é a visualização em 3D da amostra, como pode ser visto na Figura 67.



Figura 67 – Visualização em 3D da D. melanogaster

Legenda: 3D da amostra em diferentes ângulos de visualização. Fonte: A autora, 2024.

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os resultados obtidos neste trabalho, a partir das medidas de micro-CT realizadas na linha de luz SYRMEP, encontram-se divididos em duas etapas.

- I. A primeira etapa consiste na análise de diferentes protocolos utilizados para realização das medidas, visando melhorar a definição de borda e proporcionar como resultado uma boa segmentação. Também foram realizados, durante a recuperação de fase, alguns testes e a escolha da melhor razão  $\delta/\beta$  para obter uma imagem final com maior qualidade.
- II. A segunda etapa está relacionada com as análises dos métodos de segmentação realizados a fim de obter dados volumétricos da região cerebral da *D. melanogaster*.

Para ser possível visualizar melhor as bordas das estruturas, foi utilizada a ferramenta *plot profile*, vista na seção 2. Nessa etapa, foram analisadas as fatias com diferentes intensidades de tons de cinza, com 8 bits e com 32 bits de intensidade. Essa comparação foi feita para as imagens fossem observadas com maior informação de detalhes, pois com 32 bits a imagem apresenta 2<sup>32</sup>, que corresponde a 4294967296 (na ordem de bilhão) tons de cinza e necessita de 25 Gb de armazenamento no computador e gera de uma alta demanda computacional.

Para contornar essa dificuldade, utilizamos rotineiramente imagens com 8 bits de tons, que resulta em um intervalo menor de níveis de cinza (apenas 256 tons) e ocupa 6,4 Gb no armazenamento, essa conversão ocasiona uma diminuição no detalhamento das regiões, como pode ser visto na definição de borda entre o cérebro e o olho. É possível observar visualmente que quando mais detalhes de tons de cinza, há uma otimização durante a etapa de delimitação do limite entre duas regiões críticas, como pode ser visto na coluna b da Figura 68. Para este trabalho todo o processo de segmentação foi realizado com 8 bits e as imagens utilizadas para as análises visuais e estatísticas foram com 32 bits para maior variação dos tons de cinza. Figura 68 – Análise da região crítica da borda com 8 bits e com 32 bits



Legenda: As figuras representam a análise de borda com o contraste mais acentuado e com ele estourado, respectivamente com: a coluna a) contendo 8bits de informação e a coluna b) com 32 bits de informação.
Fonte: A autora, 2024.

# 3.1 Etapa I

Será apresentada uma avaliação preliminar para definir o melhor parâmetro durante a recuperação de fase na reconstrução das imagens tomográficas da *D. melanogaster* com um *preview* de diferentes  $\delta/\beta$  analisando visualmente, via ferramenta *plot profile* e histograma das regiões com o uso do programa ImageJ.

Dentro desta seção, as amostras serão divididas em duas configurações, de acordo com a aquisição das medidas de micro-CT, para que possa ser realizada a análise de dois diferentes protocolos para realização da medida e qualidade da imagem. A primeira configuração será composta pelas medidas realizadas com etanol 100%, com os parâmetros vistos na Tabela 1; já a segunda configuração será caracterizada pelas medidas realizadas no hidrogel, com as especificações vistas na Tabela 2. Ambas as amostras estavam previamente em etanol 100%. A primeira análise foi visual, depois quantitativa, com o teste de diferentes razões dos parâmetros  $\delta \in \beta$  para a escolha da que melhor evidenciasse o cérebro e seus detalhes, principalmente a que melhor definisse as bordas da região de interesse, separando assim o que era o desejado e o que era a vizinhança. Para ambos os grupos, foram utilizadas as razões 1, 10, 100 e 250 os primeiros testes foram realizados com os valores extremos (1 e 250) e em seguida foram selecionados os valores intermediários (10 e 100) e foi definido um intervalo para comparação entre as razões  $\delta / \beta$ .

i. Configuração I (Parâmetros na Tabela 1):

Foi escolhida uma mesma fatia para ser realizada a comparação entre as diferentes razões. A Figura 69 apresenta os resultados obtidos com as quatro razões  $\delta / \beta$  selecionadas, sob uma visão geral da cabeça da mosca, contendo o cérebro, medida com o etanol 100%. Este estabilizador apresenta algumas vantagens como o seu amplo acesso, baixo custo, não toxicidade, é miscível a água, além de ser comumente utilizado. Mas para o caso da amostra deste trabalho, apresenta uma baixa estabilização e uma maior ocorrência de bolhas durante as medidas.



Figura 69 – Comparação visual da região de interesse com a variação da razão  $\delta/\beta$ 

Legenda: Diferentes razões dos parâmetros δ e β da região da cabeça contendo o cérebro para amostras estabilizadas no etanol. a) Razão =1; b) Razão =10; c) Razão =100 ; d) Razão =250. Cada quadrado vermelho representa uma região crítica entre cérebro e olho. Barra de escala: 100µm. Fatia 1653.

Fonte: A autora, 2023.

No volume cerebral, algumas regiões de contorno apresentaram uma maior dificuldade na observação visual e foram nomeadas de regiões críticas. Nessas partes, para delimitação de onde terminava a ROI e começava a região vizinha necessitou-se da utilização de diferentes ferramentas para uma determinação mais precisa a fim de realizar a distinção entre borda de olho e cérebro, como pode ser visto em destaque na Figura 67; as setas apontam para uma dessas regiões críticas de maneira ampliada com os testes das variações dos parâmetros de recuperação de fase.

Com a observação das Figuras 68 e 69 é possível notar que a imagem com a razão  $\delta / \beta$ 1 ficou muito ruidosa, a  $\delta / \beta$  10 apresentou poucas melhoras, mas ainda não o suficiente para uma melhor definição de borda, já a  $\delta / \beta$  250 embora possa parecer boa em virtude de ajustes de brilho e contraste, ela suavizou algumas estruturas e perdeu informação das mesmas, tornando a razão  $\delta / \beta$  100 como a melhor para o objetivo deste trabalho, com maior definição de borda e menos ruído na imagem. Na Figura 70 é possível observar a região crítica de borda para a amostra medida no álcool absoluto na comparação com os diferentes níveis de intensidade e na Figura 71 observa-se a diferença entre intensidade e contraste entre as imagens com 8 bits e com 32 bits de tons.





Legenda: Diferentes razões dos parâmetros  $\delta$  e  $\beta$  com destaque para região crítica de borda entre cérebro e olho.

a) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 1$ ; b) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 10$ ; c) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 100$ ; d) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 250$ . Barra de escala: 100 µm. Fatia 1653.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 71- Observação de uma imagem com 8 bits e com 32 bits



Legenda: a) representa a imagem com 8 bits e b) a imagem com 32 bits. Barra de escala de 100 µm. Fatia 1653 e com razão d/b igual a 100.

Fonte: A autora, 2024.

#### 3.1.1 Análise de bordas entre diferentes regiões com 8 bits e 32 bits com etanol 100%

Foram traçadas linhas em três distintas regiões, uma considerada boa por apresentar uma região com borda bem definida, uma considerada crítica com difícil distinção entre duas estruturas e outra com o limiar entre a região da amostra com seu meio externo, visando observar o comportamento da quitina para os diferentes estabilizadores durante a medida.

Para cada seleção há um gráfico com 8 e 32 bits, respectivamente: 1) região crítica entre cérebro e olho (Figura 72); 2) região boa, do cérebro para uma região ainda dentro da cabeça com bom contraste (Figura 73) e 3) da cabeça para a região externa da amostra (*background*), conforme a Figura 74. As imagens foram feitas todas com 32 bits para essas análises de *plot profile* e histograma. A intenção de utilizar estas ferramentas está relacionada ao fato de a borda representar o contorno entre duas regiões com níveis de cinza relativamente distintos, e quando eles apresentam uma homogeneidade, no caso dessas regiões críticas, esse processo requer técnicas mais quantitativas.



Figura 72 – Região crítica entre cérebro e olho

Legenda: Gráficos representando a linha com 72 pixels traçada na região limite entre olho e cérebro. a) Gráfico com 8 bits de intensidade, b) Gráfico com 32 bits e c) A imagem contendo a região de interesse. Linha laranja representa a região analisada. Barra de escala de 100  $\mu m$ . Slice 1608.

Fonte: A autora, 2024.

Para esta segunda observação foi selecionada uma região de interseção entre o cérebro e uma região vizinha dentro da cabeça para poder medir a variação entre as intensidades dentro e ao redor da região de interesse.



Figura 73 – Região entre cérebro e parte da vizinhança dentro da cabeça

Legenda: Gráficos representando a linha com 87 pixels traçada na região entre exterior da ROI e cérebro. a) Gráfico com 8 bits de intensidade, b) Gráfico com 32 bits e c) A imagem contendo a região de interesse. Linha laranja representa a região analisada. Barra de escala de 100 μm. Slice 1608.

Fonte: A autora, 2024.

Esta outra linha foi escolhida a fim de observar o quanto o meio onde a amostra encontra-se imersa pode influenciar em seu tecido externo, nesse caso, a quitina, com a evidência de detalhes de borda.



Figura 74 – Região entre a amostra e o meio externo

Legenda: Gráficos representando a linha com 112,5 pixels traçada na região entre exterior da amostra e a amostra.
a) Gráfico com 8 bits de intensidade, b) Gráfico com 32 bits e c) A imagem contendo a região de interesse. Linha laranja representa a região analisada. Barra de escala de 100 μm. Slice 1608.

Fonte: A autora, 2024.

Com a imagem apresentando uma escala maior de intensidade de tons de cinza, nos gráficos com 32 bits é possível observar variações que para 8 bits aparecem atenuadas em decorrência de uma homogeneização dos tons entre as estruturas após a conversão. Como pode ser observado nos gráficos com 8 bits alguns intervalos aparecem com uma linha quase constante e a mesma região, mas com 32 bits apresenta variações nos tons de cinza. Foi selecionada essa região da fatia 1608 e aplicada a opção histograma para ambas as configurações, no *ImageJ*, e obteve-se o gráfico apresentado na Figura 75 para observação do contraste com as diferentes intensidades.



Figura 75 – Nível de contraste da região entre o meio externo e a amostra

Legenda: Análise histograma da região entre o meio externo e a amostra. a) 8 bits e b) 32 bits.

Fonte: A autora, 2024.

Com esse gráfico são apresentados o número de *pixels*, o valor médio, o desvio padrão e os valores de máximo e mínimo para a região onde existe material dentro e fora do inseto. O histograma fornece uma rápida impressão da ocupação dos níveis de cinza e prevê uma descrição global da aparência da imagem em termos da distribuição de cores, um exemplo, é a sua utilização para verificar os ajustes de captação de imagem. Ele é composto pelo eixo horizontal que representa os tons de cinza e o eixo vertical faz a contabilidade da quantidade de pixels pertencentes a esse tom. Uma observação importante é que o programa, ao plotar o gráfico do histograma para 32 bits, acaba realizando aproximações e faz a distribuição dos 32 bits de informações em apenas 256 intervalos *(bins)*, já que com os valores reais o programa acusa erro devido a capacidade de armazenamento. Então esses gráficos das frequências de intensidade apresentam uma informação visual da distribuição dos tons ao longo dos *pixels*.

ii. Configuração II (Parâmetros na Tabela 2):

A Figura 76 apresenta os resultados obtidos com as quatro razões  $\delta / \beta$  selecionadas, sob uma visão geral da cabeça da mosca medida com hidrogel. Este meio apresenta uma maior estabilidade, i.e. menor, chance da amostra se mover durante a aquisição das imagens, tem a tendência de menor aparecimento bolhas e quando aparecem existe uma maneira rápida de solucionar (por apresentar comportamento térmico termoreverso, a baixas temperaturas ele fica líquido e maleável e diante a altas temperaturas ele fica no estado sólido). Nas medidas, foi preciso um copo com água e gelo para mergulhar a pipeta contendo a amostra imersa no líquido, esperar uns minutos e depois realizar leves batidas e deixar na temperatura ambiente para estabilizar novamente e com isso também, tem um fácil ajuste de posição da amostra na pipeta, mas esse processo tem que ser rápido.



Figura 76 - Comparação visual da região de interesse com a variação da razão  $\delta/\beta$ .

Legenda: Diferentes razões dos parâmetros  $\delta \in \beta$  da região da cabeça contendo o cérebro para amostras estabilizadas no hidrogel. Cada quadrado vermelho representa uma região crítica entre cérebro e olho. Barra de escala: 100µm. Fatia 1259.

Fonte: A autora, 2023.

Assim como aconteceu com as medidas no etanol, as medidas realizadas com o hidrogel para estabilização também apresentaram as mesmas regiões críticas entre o volume cerebral e a borda dos olhos, como pode ser visto na Figura 77. A Figura 78 apresenta a região crítica com 8 bits e com 32 para a amostra medidas em hidrogel.



Figura 77 – Região crítica da borda do cérebro

Legenda: Diferentes razões dos parâmetros  $\delta \in \beta$  com destaque para região crítica de borda entre cérebro e olho. a) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 1$ ; b) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 10$ ; c) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 100$ ; d) Razão  $\frac{\delta}{\beta} = 250$ . Barra de escala: 100 µm. Fatia 1259.

Fonte: A autora, 2023.

Figura 78 – Observação de uma imagem com 8 e com 32 bits



Legenda: a) representa a imagem com 8 bits e b) a imagem com 32 bits. O círculo azul destaca a região com uma diferença significativa entre os níveis de cinza relacionados aos detalhes das imagens. Barra de escala de 100  $\mu$ m. Fatia 1259.

Fonte: A autora, 2024.

## 3.1.2 Análise de bordas entre diferentes regiões com 8 bits e 32 bits com hidrogel

As linhas foram definidas em três distintas regiões com apresentações dos gráficos com 8 e 32 bits, respectivamente: 1) região entre cérebro e olho (Figura 79); 2) do cérebro para uma região ainda dentro da cabeça (Figura 80) e 3) da cabeça para a região externa da amostra (*background*), conforme a Figura 81.



Figura 79 – Região crítica entre cérebro e olho

Legenda: Gráficos representando a linha 52 pixels traçada na região de borda entre olho e cérebro. a) Gráfico com 8 bits de intensidade, b) Gráfico com 32 bits e c) A imagem contendo a região de interesse. Linha laranja representa a região analisada. Barra de escala de 100 μm. Fatia 1259.

Fonte: A autora, 2024.



Figura 80 – Região entre cérebro e parte da vizinhança dentro da cabeça

Legenda: Gráficos representando a linha de 89 pixels traçada na região entre cérebro e região externa dentro da cabeça. a) Gráfico com 8 bits de intensidade, b) Gráfico com 32 bits e c) A imagem contendo a região de interesse. Linha laranja representa a região analisada. Barra de escala de 100 μm. Fatia 1259.

Fonte: A autora, 2024.



## Figura 81 - Região entre a amostra e a região externa cabeça

Legenda: Gráficos representando a linha de 71 pixels traçada na região entre cérebro e região externa dentro da cabeça. a) Gráfico com 8 bits de intensidade, b) Gráfico com 32 bits e c) A imagem contendo a região de interesse. Linha laranja representa a região analisada. Barra de escala de 100  $\mu m$ . Slice 1259.

Fonte: A autora, 2024.

Para uma representação gráfica de quantos pixels possuem um determinado nível de cinza, foi utilizado o histograma para interpretação da qualidade de uma imagem em relação ao contraste e ao brilho da fatia 1259 (Figura 82).



Figura 82 - Nível de contraste da região entre o meio externo e a amostra

Fonte: A autora, 2024.

#### <u>3.1.3 Análise de borda entre a amostra e o meio externo para as diferentes razões $\delta/\beta$ </u>

Para uma melhor visualização de uma possível relação entre um maior destaque estrutura externa da mosca e o meio onde estava inserida a fim de analisar a variação de intensidade de tons de cinza para cada uma das variações das razões delta e beta, com análise de contraste e brilho, foi feita uma seleção de uma região de borda entre o interior da amostra e a parte externa, conforme a Figura 83.







### Figura 84 - Região entre a amostra e o meio externo (conclusão)



Legenda: Uso do etanol 100%. a) A imagem do cérebro com a região selecionada pela reta laranja com 171 pixels; Plot Profile e histograma das razões  $\delta \in \beta$ ; b) razão  $\delta/\beta 1$ ; c) razão  $\delta/\beta 10$ ; d) razão  $\delta/\beta 100$  (em destaque com o retângulo laranja); e) razão  $\delta/\beta 250$ .

Fonte: A autora, 2024.

Para as amostras na configuração II também foram realizadas as mesmas análises, como pode ser visto na Figura 84.







Figura 86 – Região entre a amostra e o meio externo com análise gráfica (conclusão)

Legenda: Uso do etanol 100%. a) A imagem do cérebro com a região selecionada pela reta laranja com 89 pixels; Plot Profile e histograma das razões  $\delta \in \beta$ ; b) razão  $\delta/\beta 1$ ; c) razão  $\delta/\beta 10$ ; d) razão  $\delta/\beta 100$  (em destaque com o retângulo laranja); e) razão  $\delta/\beta 250$ .

Fonte: A autora, 2024.

Após o conjunto de análises realizadas, desde a observação das fatias com as variações de  $\delta/\beta$  e suas respectivas ampliações com foco nas regiões críticas, observação de *plot profile* e histograma. Foi necessária uma discussão entre diferentes fatores qualitativos e estatísticos, já que a análise de um só parâmetro poderia tendenciar o resultado encontrado. A exemplo da análise dos *plot profiles* com diferentes níveis de intensidade, apesar dos gráficos com 8 bits indicarem uma evidencia mais acentuada de uma borda, muito desse efeito carrega a incerteza do processo de conversão entre as intensidades, por vários tons serem aproximados e considerados em uma mesma família de nível de cinza. Já com o gráfico contendo 32 bits os picos de borda são mais suavizados por apresentarem uma escala maior de variações. Dessa

forma, nota-se que para uma observação visual da imagem a com 32 bits apresenta um melhor resultado, já em uma análise de intensidade ao longo de uma região de borda definida, a com 8 bits apresentou-se mais favorável à segmentação.

As medidas tanto da configuração I quanto da II, mesmo com distintas configurações, apresentaram ambas a razão  $\delta/\beta$  igual a 100 como mais adequada para a observação e segmentação da região de interesse. Mas não podemos fazer uma comparação direta entre os resultados apresentados nessas imagens em relação ao melhor meio de imersão para a amostra. Com a análise da região destacada das Figuras 83 e 84, é possível apenas observar que as configurações utilizadas na medida com hidrogel evidenciaram o tecido de contorno da amostra, facilitando o processo de segmentação. Para uma melhor análise quantitativa e comparativa, como um trabalho futuro exponho a necessidade de realizar uma nova medida, na qual sejam alternados os dois materiais para estabilização e mantenha-se o setup.

# 3.2 Etapa 2

Com a escolha da melhor razão  $\delta/\beta$  para o tipo de amostra utilizado neste trabalho, realizada na etapa 1, nesta etapa 2 foram utilizados dois diferentes métodos para segmentação, cada um com seu nível de automação. Foi realizada uma discussão qualitativa, quantitativa e estatística dos resultados. Para cada método de segmentação as fatias utilizadas como gabarito foram fatias múltiplas de 5 e para calcular a similaridade entre o material fornecido pelo usuário e o resultado entregue pelo programa foi realizado um novo gabarito com fatias terminadas em 1 ou 6, para garantir que a similaridade estava sendo comparada entre uma fatia manual e uma treinada pelo programa em cada um dos métodos utilizados.

É importante ressaltar que os resultados encontrados foram apresentados exatamente como o programa entregou em cada método, sem a utilização de ferramentas e/ou programas para ajustes finos, evitando influências tendenciosas no resultado encontrado e poder apresentar o mais real possível.

1. Método 1 - interpolação

Como descrito na seção 2.5, para este método de segmentação, foram determinadas fatias manualmente com um intervalo de 5 unidades com a execução da interpolação entre elas. Na
Figura 85 é possível observar na linha superior as fatias que foram segmentadas manualmente e na linha inferior as fatias que foram segmentadas pelo processo da interpolação.





Legenda: A figura representa o processo de segmentação por interpolação. As figuras a), b) e c) são fatias segmentadas manualmente; já as figuras d), e) e f) foram interpoladas. Fonte: A autora, 2024.

Com as fatias apresentadas na Figura 81 é possível observar que mesmo sendo uma boa ferramenta por proporcionar uma segmentação semiautomática, algumas regiões de borda não foram devidamente contornadas. Ao realizar o processo de interpolação ao longo de todo o cérebro, foram feitas 27 fatias (21% de todo volume cerebral), que ao final entregaram um cérebro segmentado em um tempo médio de 5 horas desde a abertura do programa até a finalização da segmentação da ROI com os devidos ajustes realizados. Mas este modelo requer alguns ajustes quando observamos a região segmentada em outros eixos, pois como há um intervalo entre cada fatia, em alguns momentos o software considera partes além do necessário ou deixa de marcar uma região importante (Figura 86), o que leva a um resultado volumétrico final não tão exato.



Figura 88 - Regiões com erro de interpolação

a)

Legenda: As imagens representam a visualização da região segmentada em diferentes eixos com erro na segmentação.a) eixo yz e b) eixo xz. Fonte: A autora, 2024.

É possível analisar o resultado de todo processo para segmentar o volume representado em três dimensões, conforme a Figura 87.

Figura 89 - Resultado da interpolação em 3D



Legenda: As imagens representam a visão em diferentes planos em 3D. a) e b) imagem só com o cérebro e c) imagem com o contorno da cabeça.

Fonte: A autora, 2024.

Para realizar uma comparação entre os resultados entregues nas diferentes segmentações, foram selecionadas as mesmas fatias (1216, 1261, 1271, 1306,1251 e 1276) entre os três métodos diferentes utilizados. Na Figura 88 são apresentadas seis fatias do processo de interpolação, as demais figuras serão apresentadas no método 2.



Figura 90 - Resultado entregue pelo método da interpolação

Legenda: As imagens a), b), c), d), e) e f) representam seis fatias interpoladas usadas para comparação entre os modelos.

Fonte: A autora, 2024.

Após este processo, foi calculado o índice de similaridade para avaliar o quão próximo do modelo de manual de entrada ficou o resultado. Com a observação da Tabela 4 é possível analisar todas as fatias segmentadas e o seu nível percentual de semelhança entre a interpolação e o gabarito.

Fatias	DSC	Porcentagem (%)
1201	0,702078522	70,0
1206	0,688875021	69,0
1211	0,751509679	75.0
1216	0,831126635	83,1
1221	0,916239019	02.2
1226	0,887856598	92,2
1220	0,899785114	90 0
1236	0.911067559	,,,,
1230	0.919648577	92,0
1241	0 948040695	95,0
1246	0.959893407	96,0
1251	0.054073338	90,1
1256	0,047040753	95,4
1261	0,947949773	94.0
1266	0,935293873	95.4
1271	0,954877801	95,4
1276	0,954903333	96,0
1281	0,960460067	96,1
1286	0,961519822	96,0
1291	0,957260111	96,0
4.0.4	0,955523243	97,0
1296	0,968134801	96,0
1301	0,955345520	
1306	0.959100072	96,0
1311	0.953103588	95,3
1316	0 935011843	94,0
1321	0.818846382	82.0
1326	0.742105262	02,0 74 2
1331 Tatal <b>27</b>	0,/42103203	
Total 27	Media 0,901097394	90,0

Tabela 4 - Resultado do DSC para interpolação.

Com a utilização do código no programa para calcular a relação entre os conjuntos de dados, foi possível obter um resultado de 90% de similaridade, em média. Mostrando o método de interpolação com um resultado bom para um nível mediano de automação.

## 2. Método 2 – Deep Learning

Para este método de segmentação, descrito na seção 2.5, foram realizados dois testes, cada um com uma porcentagem de treinamento distinta. Na Figura 89 é possível observar as fatias que foram segmentadas manualmente, servindo como gabarito para aplicação do modelo, tanto com 27 fatias quanto para o de 14 fatias.



Figura 91 – Gabaritos fornecidos para os modelos com 11% e 21% de treinamento

Legenda: de a) até f) representam o gabarito manual fornecido ao programa.

Fonte: A autora, 2024.

Para o modelo com 14 fatias manuais, a entrega do cérebro segmentado durou um tempo médio de 7 horas, sendo 2 horas o preenchimento manual das fatias selecionadas e 5 horas para programa treinar com as informações fornecidas e gerar um modelo a ser aplicado. O resultado pode ser observado na Figura 90, foram selecionadas as mesmas fatias da segmentação semiautomática (Figura 85).



Figura 92 – Resultado da segmentação automática com 11 %

Legenda: As imagens a), b), c), d), e) e f) representam seis fatias segmentadas por DL com 11% usadas para comparação entre os modelos.

É possível notar que com esta quantidade de informações fornecidas ao programa, ele não conseguiu realizar um bom treinamento e quando o modelo foi utilizado na amostra, considerou outras regiões com tom de cinza similar ao do cérebro, como parte também da região de interesse, como a região dos olhos, região muscular e partes fora da amostra. o valor da região de perda (val\_loss, na linguagem do programa) foi de 0.12, ele representa uma medida de quão bem o modelo está fazendo previsões, quanto menor o valor da perda, melhor o modelo é em fazer previsões. A visualização em 3D deste resultado está de acordo com a Figura 91.





Legenda: As imagens representam a visão em diferentes planos em 3D. a) e b) imagem só com o cérebro e c) imagem com o contorno da cabeça.

Com este resultado, foi calculado novamente o DSC (Tabela 5), mas agora para esta configuração e o valor percentual de similaridade foi de 81%, um valor menor do que o método anterior para ser utilizado como modelo de referência.

116

Fatias	DSC	Porcentagem (%)		
201	0,325876599	33,0		
1206	0,369737644	37,0		
1211	0,530130582	53,0		
1216	0,644790381	64,5		
1221	0,690028266	69,0		
1226	0,796983578	80,0		
1231	0,912550342	91,2		
1236	0,933483541	93,3		
1241	0,957925940	96,0		
1246	0,960678687	96,0		
1251	0,958475929	96,0		
1256	0,956895581	96,0		
1261	0,962546698	96,0		
1266	0,954693864	96,0		
1271	0,943700013	94,3		
1276	0,926318372	93,0		
1281	0,957096547	96,0		
1286	0,908041832	91,0		
1291	0,836834480	84,4		
1296	0,883602498	88,3		
1301	0,881587488	88,2		
1306	0,903868410	90,4		
1311	0,790944069	79,1		
1316	0,768969172	77,0		
1321	0,773964959	77,3		
1326	0,759878976	76,0		
1331	0,570066073	57,0		
otal 27	Média 0 8006174	<u>81 0</u>		

Tabela 5 - Resultado do DSC para segmentação automática com 11%.

Para o modelo com um gabarito contendo mais informações, com 27 fatias feitas à mão, foram realizadas as mesmas análises dos dados. Para esta etapa o tempo direcionado a todo processo de segmentação foi 10 horas, sendo 3h horas para o gabarito e 7 horas de treinamento. Neste processo, foram utilizadas as fatias já feitas no modelo anterior e foram acrescentadas mais e após foi feito um retreinamento apresentando um como resultado um novo modelo.



Figura 94 - Resultado da segmentação automática com 21 %

Legenda: As imagens a), b), c), d), e) e f) representam seis fatias segmentadas por DL com 21% usadas para comparação entre os modelos.

Fonte: A autora, 2024.

A Figura 92 apresenta o resultado da segmentação com 21% de treinamento utilizando a DL. Para este modelo, a segmentação ficou boa no que tange a seleção da região de interesse, mas é possível observar regiões segmentadas fora do cérebro, como nas imagens a) e d), além de partes da região de interesse não segmentadas, conforme a imagem f). Para extrair um resultado quantitativo, também foi calculado o DSC (Tabela 6) e o resultado para este modelo foi de 95% com o valor de val\_loss de 0.04. A observação em 3D pode ser feita através da Figura 93.

Figura 95 - Visualização 3D do modelo DL com 21%

Legenda: As imagens representam a visão em diferentes planos em 3D. a) e b) imagem só com o cérebro e c) imagem com o contorno da cabeça.

Fonte: A autora, 2024.

Tabela 6 - Resultado do DSC para DL com 21% de treinamento.

Fatias	DSC	Porcentagem (%)	
1201	0,934367845	93,4	
1206	0,833344404	83,3	
1211	0,848236898	85,0	
1216	0,836742711	84,0	
1221	0,890513826	89,0	
1226	0,926914522	93,0	
1231	0,957922807	96,0	
1236	0,948752892	95,0	
1241	0,970608584	97,1	
1246	0,973336374	97,3	
1251	0,973562363	97,4	
1256	0,968472293	97,0	
1261	0,975532383	98,0	
1266	0,977931132	98,0	
1271	0,969850184	97,0	
1276	0,967328329	97,0	
1281	0,986214553	99,0	
1286	0,981383143	98,1	
1291	0,975281382	98,0	
1296	0,967274118	97,0	
1301	0,978029697	98,0	
1306	0,976330927	98,6	
1311	0,982194844	98,2	
1316	0,985024713	99,0	
1321	0,963354057	96,3	
1326	0,923793070	92,4	
1331	0,954435826	95,4	
Fotal 27	Média 0,94913829	95,0	

A princípio, o método automático, mesmo demandado recursos computacionais de grande desempenho, pareceu ser mais eficaz para otimizar as tarefas, mas ele necessita de um treinamento bem preciso, com uma porcentagem alta de informações de entrada para que a aprendizagem profunda consiga entregar resultados com modelos fiéis ao esperado. Cada método utilizado necessitou de um ajuste após a segmentação, então de acordo com a necessidade e demanda será possível analisar qual modelo será mais eficiente. Nos Gráficos 1, 2 e 3 é possível observar os valores do DSC entregues para cada uma das fatias selecionadas em cada um dos métodos. É possível notar que o modelo semiautomático e o modelo automático com um maior gabarito de informações apresentam uma similaridade mais próxima de 1, diferente do Gráfico 2, que apresenta valores menores e com maior dispersão.





Fonte: A autora, 2024



Fonte: A autora, 2024.

Gráfico 3 - Gráfico do DSC para DL 21%.



Fonte: A autora, 2024.

Os dados encontrados com o cálculo do DSC podem ser vistos resumidamente na Tabela 7. Foi possível observar que as fatias das extremidades apresentaram menores valores de DSC, em virtude de o programa ter a dificuldade de analisar as regiões início e término da amostra. Ao final de todo o processo referente a segmentação, foi realizada a análise dos dados calculando o volumetricamente o cérebro da D. melanogaster.

Método	Volume ( $\mu m^3$ )	DSC médio (%)	Desvio padrão (DSC)
Interpolação	13370599	90	0.083970699
Deep Learning (11 %)	26105452	81	0,177714049
Deep Learning (22 %)	15498486	95	0.124936144

Tabela 7 – Volume do cérebro e DSC para cada método de segmentação.

Fonte: A autora, 2024.

Com o cálculo do volume realizado para cada método de segmentação é possível analisar que os valores referentes as melhores porcentagens de similaridade, que foram a interpolação e o modelo com 21 % de treinamento, apresentam um resultado mais próximo, levando em consideração que o modelo por DL incorporou mais regiões externas ao cérebro do que o por interpolação. Já o modelo com um treinamento de 11 % apresentou um valor mais desproporcional, pois considerou muita parte externa como sendo parte do cérebro.

Foram realizados mais três testes para o modelo com 11% de treinamento (totalizando 4) e mais três testes para o modelo treinado com uma porcentagem de 21% (totalizando 4). Eles foram feitos para uma análise estatística da aplicação do modelo e comprovação de sua validação, cada um foi realizado a partir do mesmo ponto, seguindo os mesmos processos durante a entrada de dados e fornecimento do gabarito para o programa. Foi calculado um teste de similaridade entre as segmentações manuais (gabaritos) e todas foram maiores que 90% (valor aceitável, pois mesmo seguindo os mesmos passos, por ser um processo manual, apresenta uma margem de erro do usuário). Para os modelos, com 11 % e 21 %, temos os parâmetros apresentados na Tabela 8, na qual é possível observar que o modelo com 21% apresentou um maior valor médio de similaridade, um menor desvio padrão e menores valores de perda nos resultados encontrados pelos testes em comparação com o modelo com menor porcentagem.

	Teste	Interações	DSC	DSC	DP	Val_loss	Volume da ROI
Modelo DL		(Epocns)	(%)	médio	(%)		(µm°)
(%)				(%)			
	1	100	81			0,12	26105452
	2	100	87			0,10	18827100
	3	90	92	05.00	4.05	0,17	18464267
11	4	80	80	85,00	4,85	0,12	25273366
	1	67	95			0,04	15498486
21	2	84	88			0,11	17085441
	3	80	92	02 72	2 1 1	0,25	16042536
	4	93	96	92,12	3,11	0,05	14861869

Tabela 8 - Parâmetros para cada um dos testes aplicados para os modelos com 11% e 21% com DL.

Legenda: A Tabela apresenta os testes realizados, seguido das interações que ocorreram durante a aprendizagem profunda, do valor percentual do DSC, sua média e seu desvio padrão (DP) para os testes, do valor de perda e do volume do cérebro considerado em cada teste.

Fonte: A autora, 2024.

Na Figura 94 foram escolhidas as mesmas três fatias para comparação qualitativa e estatística entre os testes realizados e os resultados entregues de suas segmentações. Os testes estão em ordem crescente em cada uma das colunas coloridas (coluna 1 as três fatias do teste 1 e consectutivamente). Nota-se que no primeiro teste, o programa considerou muitas regiões externas como se tivessem o mesmo tom de cinza do cérebro, já o segundo o terceiro apresentaram resultados mais próximo, com menos regiões externas segmentadas, mas com algumas falhas dentro da ROI e o quarto já apresentou um modelo mais desregular (como se fosse a mistura dos testes anteriores, mas com menos áreas externas em relação ao 1° e mais falhas em relação ao 2° e 3°). O Gráfico 4 apresenta as flutuações dos valores do DSC para cada um dos 4 testes com 11%.



Figura 96 - Comparação entre os resultados dos testes em mesmas fatias no modelo de 11%

Legenda: Imagem segmentada laranja: teste 1; imagem segmentada de verde: teste 2; imagem segmentada de roxo: teste 3 e imagem segmentada de rosa: teste 4; a) sequência horizontal de 4 imagens da fatia 1216 para cada um dos testes; b) sequência horizontal de 4 imagens da fatia 1261 para cada um dos testes e c) sequência horizontal de 4 imagens da fatia 1306 para cada um dos testes.

Fonte: A autora, 2024.

Gráfico 4 - Valores do DSC para cada um dos testes realizados no modelo de 11%.



Fonte: A autora, 2024.

As mesmas fatias escolhidas para o modelo anterior foram selecionadas e comparadas para cada um dos 4 testes realizados para este modelo com maior porcentagem de treinamento. É possível observar, a nível de segmentação, que para estes testes a entrega do resultado, visualmente e estatisticamente foi mais próxima do esperado a caminho de um bom modelo a ser aplicado em outras amostras, conforme a Figura 95 e o Gráfico 5.

Figura 97 - Comparação entre os resultados dos testes em mesmas fatias no modelo com 21%



Legenda: Imagem segmentada laranja: teste 1; imagem segmentada de azul: teste 2; imagem segmentada de verde lima: teste 3. a) sequência horizontal de 4 imagens da fatia 1216 para cada um dos testes; b) sequência horizontal de 4 imagens da fatia 1261 para cada um dos testes e c) sequência horizontal de 4 imagens da fatia 1306 para cada um dos testes.

Fonte: A autora, 2024.



Gráfico 5 - Valores do DSC para cada um dos testes realizados no modelo de 21%.

Fonte: A autora, 2024.

Para este modelo o resultado de similaridade apresentou-se melhor, mais perto do gabarito para os testes 1 e 3, com valores acima de 80%, resultados compatíveis com outros resultados encontrados na literatura, apenas com uma maior variação no teste 2, por não reconhecer a similaridade entre o gabarito e a segmentação da última fatia comparada. No modelo com uma menor porcentagem de treinamento com DL, o desvio padrão apresentou-se menor do que o modelo com 27 fatias de gabarito, pois apresenta um maior número de dados, o que comprova a relação diretamente proporcional entre treinamento e resultado dos testes. Além disso, na Tabela 8 é possível observar que foram encontrados diferentes valores do volume cerebral para o mesmo modelo quando treinado com diferentes testes, já este valor é fornecido imediatamente após a segmentação e para um resultado quantitativo é preciso realizar os devidos ajustes de regiões indesejadas para obter o valor exato do volume da ROI.

É possível observar diferentes resultados para os métodos com mesmo gabarito nas mesmas fatias e usando os mesmos parâmetros, pois o programa pode mostrar uma variação natural do processo. Então mesmo que o teste não apresente um bom resultado em um primeiro momento é recomendável realizar novamente o processo para validar se é erro do modelo e dos parâmetros escolhidos ou estatístico relacionado ao processo envolvido.

Este resultado relaciona-se a amplas questões, a segmentação realizada com aprendizagem profunda depende da inicialização de pesos (informações), bem como da

minimização da função de perda, e as imagens finais segmentadas podem ser diferentes dependendo desses fatores, já que uma rede neural geralmente aprende exemplos dados e "descobre" uma maneira de prever resultados razoavelmente bem. Deve-se esperar que o treinamento de redes neurais produza resultados diferentes a partir de condições iniciais semelhantes e, portanto, deve ser testado várias vezes para cada condição para determinar quais partes são inevitáveis e quais partes não são (Paiva, 2022).

Foi realizada uma análise de variância ANOVA, uma ferramenta do programa EXCEL (com o nível de significância  $\alpha = 0,05$ ) para investigar como os métodos de segmentação escolhidos comportaram-se entre eles e poder ser mais uma ferramenta estatística para determinar se há diferenças significativas entre as médias dos três métodos independentes, baseado na análise das variâncias amostrais. Para a comparação entre eles, cada método recebeu uma letra para identificação, o método de interpolação foi chamado de A, método por d*eep leraning* com 11% de B e com 21% de C. Os métodos A e B não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (p >> 0,05); B e C apresentaram diferenças estatísticas significativas relevantes (p >> 0,05); e A e C também não apresentaram diferenças estatísticas relevantes (p >> 0,05). Mostrando que a maior diferença estatística apresentada foi entre a interpolação e o modelo com 21% de treinamento.

## CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que a utilização da técnica de microtomografia por radiação síncrotron no regime de contraste de fase, desempenha um papel importante para obter e avaliar informações tridimensionais sobre as estruturas internas de organismos com alta resolução e sem necessidade de marcação química.

A amostra utilizada para proporcionar o aperfeiçoamento das técnicas físicas na obtenção das imagens microtomograficas foi da espécie *Drosophila melanogaster*, por ser um modelo promissor para o estudo de doenças neurodegenerativas, como o caso da doença de Alzheimer, justificando a escolha da região de interesse ser o cérebro.

Por se tratar de uma imagem de amostra biológica, com intensidades dos tons de cinza bem próximas, resultado da atenuação dos raios X nos tecidos moles, foram necessários ajustes mais criteriosos durante o processamento da imagem, pois desde a aquisição, todos os processos relacionados ao processamento digital foram pensados a fim de obter um melhor contraste capaz de diferenciar mais as estruturas internas da amostra. A escolha do melhor protocolo para as amostras e configuração da linha, passando pela reconstrução, a análise de contraste, brilho e borda para uma seleção mais próxima de toda ROI visando uma análise quantitativa do volume cerebral.

O uso do hidrogel apresenta grande potencial para as medidas com amostras do tipo da *D. melanogaster*, principalmente por proporcionar uma maior estabilidade e facilitar ajustes finos durante a preparação e aquisição das imagens. E os resultados obtidos com a sua utilização foram satisfatórios, no que tange a melhoria de contraste na imagem. Como perspectivas futuras deste trabalho, está um estudo mais detalhado e com novas medidas para avaliar sua eficiência durante todo o processamento da imagem até seu resultado final e realizar uma comparação direta de sua utilização tanto variando o setup quanto mantendo-o e alterando os estabilizadores.

A análise e escolha entre as variações dos parâmetros  $\delta$  e  $\beta$  na recuperação de fase neste trabalho foi uma etapa importante pois o valor da parte real do índice de refração para tecidos moles em energias de raios X duros tende a ser, em média, duas a três ordens de grandeza maior do que a parte imaginária relacionada a absorção, o que está diretamente relacionado com o regime adotado para estas medidas. Cada razão  $\delta/\beta$  foi avaliada e comparada quanto ao nível

de contraste e melhor definição de borda ao longo de toda região do cérebro. A razão  $\delta/\beta$  1 apresentou-se muito ruidosa, a  $\delta/\beta$  10 melhorou um pouco, mas não destacava a região escolhida, a  $\delta/\beta$  250 começou a suavizar algumas estruturas ocasionando perda de informações e a razão que melhor se enquadrou nesses parâmetros foi a razão  $\delta/\beta$  100, que apresentou-se melhor tanto para as medidas com álcool quanto as com hidrogel.

Em relação a segmentação da região cerebral para a análise morfométrica, os modelos testados apresentaram resultados entre bons e mediano, por aspectos visuais e computacionais, com o uso do coeficiente de similaridade DSC e da análise de variância ANOVA, variando de 81 a 95% em relação aos gabaritos fornecidos. O método semiautomático apresentou uma resposta positiva, em relação a sua praticidade de execução e menor tempo de trabalho. Mas por um outro lado, quando o conjunto de dados para serem analisados for grande, ele já não se mostra tão eficaz no processo.

A segmentação automática entregou uma boa seleção e previamente indica que conforme mais fatias sejam fornecidas como gabarito, melhor será o resultado após a aplicação do modelo. A intenção futuramente é realizar testes com uma maior porcentagem de treinamento a fim de conseguir um bom modelo para este ser aplicado em outras amostras da mesma espécie, com o objetivo de otimizar o processo de segmentação. Ao aumentar o número de testes a rede pode aprender mais sobre a informação manual e, assim, melhorar a sua precisão, além de gerar mais dados para uma análise estatística. Encontrar um modelo mais próximo do ideal demanda um trabalho mais delicado, mas a perspectiva é que ao ser aplicado, o nível de automação seja maior e o tempo direcionado a segmentação seja mais breve. Uma característica em comum entre os métodos de segmentação utilizados, para apresentar um valor real do volume da ROI torna-se necessário realizar correções para retirar ou acrescentar o preenchimento de regiões em algumas fatias ao fim das segmentaçãos.

Após a análise destes resultados, foi possível observar que a utilização das devidas técnicas aplicadas neste trabalho apresentou-se eficiente para obter informação volumétrica sobre a estrutura cerebral da amostra, com respostas a serem analisadas com caráter multidisciplinar com as estruturas internas presentes na *D. melanogaster* identificadas a partir da imagem obtida em contraste de fase por propagação, sem marcação.

O próximo passo será a medida de um novo conjunto de moscas, em fevereiro de 2024, realizada na linha luz MOGNO pertencente ao laboratório Sirius - SP, a fonte de radiação síncrotron brasileira de 4° geração. Aceita pela submissão da proposta 20232593, as expectativas dos dados que serão obtidos são promissoras.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. *et al.* The genome sequence of Drosophila melanogaster. <u>Science</u>, [s. l.], v. 287, n. 5461, p. 2185-2195.

ALS-NIELSEN, J.; MCMORROW, D. <u>Elements of modern X-ray physics</u>. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2011.

ARAÚJO, R. *et al.* <u>Raio X</u>: produção e interação com a matéria. 2016. Disponível em: <u>https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1979948/mod\_resource/</u> content/1/x-rays.pdf. Acesso em: dd mm ano.

ASHBURNER, M.; THOMPSON; J. The laboratory culture of Drosophila. *In*: ASHBURNER, M.; WRIGHT, T. R. F. <u>The genetics and biology of Drosophila</u>. 2A. [S.l.]: Academic Press, 1978. P. 1–81.

ALVARENGA, T. <u>Aplicação de Microtomografia Computadorizada por Luz Síncrotron em</u> <u>fibra óptica</u>: um estudo dos fundamentos da técnica. 2022. Monografia (bacharelado em Física) – Instituto de Física Armando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

BAUDRY, E. *et al.* Non-African populations of Drosophila melanogaster have a unique origin. <u>Molecular Biology and Evolution</u>, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1482-1491, 2004.

BARCELLOS, R. <u>Estudo da qualidade de algoritmos de reconstrução de imagem</u> <u>microtomográfica em um modelo biológico para vertebrados</u>. 2019. Monografia (licenciatura em Física) – Instituto de Física Armando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

BARTELS, M. <u>Cone-beam x-ray phase contrast tomography of biological samples</u>: optimization of contrast, resolution and field of view. Göttingen: Universitätsverlag Göttingen, 2013. Göttingen Series in X-ray Physics.

BETZ, O. U. W.; WEIDE, D. *et al.* 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 millimetresized arthropod structure. Journal of Microscopy, [s. l.], v. 227, p. 51–71, jul. 2007.

BIER, E. Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. Nature Reviews Genetics, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 9, 2005.

BUSHBERG, J. T. *et al.* The essential physics of medical imaging. [S. l.]: Lippincott Williams & Wilkins Publisher, 2002.

BROOKS, R. A.; CHIRO, G. D. Principles of computer assisted tomography (CAT) in radiographic and radioisotopic imaging. <u>Physics in Medicine and Biology</u>, [s. l.], v. 21, p. 689–732, set. 1976.

BROMBAL, L. *et al.* Motion artifacts assessment and correction using optical tracking in synchrotron radiation breast CT. Med Phys., [s. l.], v. 48, n. 9, p. 5343–5355, 2021.

CARUSO, F.; OGURI, V. <u>Física moderna</u>: origens clássicas e fundamentos quânticos. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

CARVALHO, A. História da tomografia computadorizada. <u>Revista Imagem</u>, [s. l.], p. 61-66, 2007.

CHEN, R C et al. Measurement of the linear attenuation coefficients of breast tissues by synchrotron radiation computed tomography. <u>Phys. Med. Biol.</u>, [s. l.], v. 55, n. 17, p. 4993, 2010.

CHIANG, H. C. et al. An analytical study of population growth in Drosophila melanogaster. <u>Ecological Monographs</u>, [s. l.], v. 20, p. 173–206, 1950.

CHOO, J. et al. Quantitative analysis of emphysema and airway measurements according to iterative reconstruction algorithms: comparison of filtered back projection, adaptive statistical iterative reconstruction and model-based iterative reconstruction. <u>Eur. Radiol.</u>, [s. l.], v. 24, p. 799–806, 2014.

CHOW, C. Y. *et al.* Large neurological component to genetic differences underlying biased sperm use in Drosophila. <u>Genetics</u>, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 177-185, 2013.

CHOW, W. V. *et al.* An overview of APP processing enzymes and products. <u>Neuromolecular</u> <u>Med.</u>, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1-12, 2010. doi: 10.1007/s12017-009-8104-z. PMID: 20232515; PMCID: PMC2889200.

CONCEIÇÃO, A. <u>Dosimetria e proteção radiológica</u>. Aula 5, pós graduação. [S. l.]: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. Disponível em: <u>http://paginapessoal.utfpr.edu.br/alconceicao/pos-graduacao/disciplinas/dosimetriae-protecao-radiologica/aulas/Aula5.pdf/at\_download/file</u>. Acesso em: 11 out. 2023.

CONNOR, Nick. <u>O que é Dosimetria de Raios-X – Dosímetro de Raios-X – Definição</u>. Disponível em: <u>https://www.radiation-dosimetry.org/pt-br/o-que-e-dosimetria-de-raios-x-dosimetro-de-raios-x-definicao/</u>. Acesso em: 23 jun 2020.

DAVIS, G. R.; ELLIOTT, J. C. Artefacts in X-ray microtomography of materials. <u>Materials</u> <u>Science and Technology</u>, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 1011–1018, sept. 2006.

DONATO, S. *et al.* Optimization of pixel size and propagation distance in X-ray phase-contrast virtual histology. J. Inst., [s. l.], v. 14, 2022.

DOZIERES, M. Étude expérimentale du transport de l'énergie radiative dans les plasmas denses par spectroscopie d'absorption et d'émission. San Diego: University of California, San Diego, 2016.

DUDGEON, D. <u>Multidimensional digital signal processing</u>. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984.

DRAGONFLY. Disponível em: <u>http://www.theobjects.com/dragonfly/</u>. Acesso em: 20/10/2023.

ELDER, F. R. et al. Radiation from Electrons in a Synchrotron. <u>Physical Review</u>, [s. l.], v. 71, n. 11, p. 829–830, 1947.

EOM, E. et al. Geometric tomography. [Cambridge]: Cambridge University Press, 1995.

ELETTRA TRIESTE SINCROTRONE. <u>Elettra's Beamlines</u>. 2022. Disponível em: <u>https://www.elettra.trieste.it/lightsources/elettra/beamlines.html</u>. Acesso em: 10 ago. 2023.

EWART, G. D, Howells, A. J. ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in Drosophila melanogaster. <u>Methods Enzymol.</u>, v. 292, p. 213-224, 1998.

KHARFI, F. <u>Mathematics and physics of computed tomography (CT)</u>: demonstrations and practical examples. imaging and radioanalytical techniques in interdisciplinary research - fundamentals and cutting edge applications. Disponível em: <u>https://www.researchgate.net/publication/299802173\_Mathematics\_and\_Physics\_of\_Comput</u> ed\_Tomography\_CT\_Demonstrations\_and\_Practical\_Examples . Acesso em: 13 mar. 2013.

FERREIRA, R. *et al.* A beam hardening correction for x-ray microtomography. <u>NDT&E</u> International, [s. l.], p. 17-22, 1998.

FERRI, N *et al.* Lipid-modified proteins as biomarkers for cardiovascular disease: a review. <u>Biomarkers</u>, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 219-37, 2005.

FIDALGO, G. *et al.* Synchrotron microtomography applied to the volumetric analysis of internal structures of Thoropa miliaris tadpoles. <u>Sci. Rep.</u>, [s. l.], v. 10, p. 18934, 2020.

FLAYA, M. Disponível em: <u>https://www.istockphoto.com/br/vetor/mosca-de-frutas-masculina-e-fêmea-isolada-em-fundo-branco-gm1284801374-381835938</u>. Acesso em: 22/11/2023.

FLYER-ADANS, J. G. *et al.* Regulation of olfactory associative memory by the circadian clock output signal pigment-dispersing factor (PDF). <u>J. Neurosci.</u>, [s. l.], V. 40, n. 47, p. 9066-9077, 2020.

GERALD, Rubin. Drosophila melanogaster como um Organismo Experimental. <u>Science</u>, [s. 1.], p. 1453-1459, 1988.

GONZALEZ, C. R.; WOODS, E. R. <u>Processamento digital de imagens</u>. São Paulo: Edgard Blucher, 2000. 528 p.

GUREYEV T. *et al.* Quantitative methods in phase-contrast x-ray imaging. J. Digit. Imaging, [s. l.], v. 13, Suppl. 1, p. 121–126, 2000.

HARDY, J. *et al.* Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. <u>Science</u>, [s. l.], v. 256, n. 5054, p. 184-185, 1992.

HERRUP, Karl. Reimagining Alzheimer's disease - an age-based hypothesis. Journal of <u>Neuroscience</u>, [s. l.], v. 30, n. 50, p. 16755-16762, 2010.

JEIBMANN A, PAULUS W. Drosophila melanogaster as a model organism of brain diseases. Int. J. Mol. Sci., [s. l.], v. 10, n. 2, p. 407–440, 2009.

KAMP, van de. Insect imaging at the ANKA synchrotron radiation facility. <u>Entomologie Heute</u>, [s. l.], v. 25. p. 147-160, 2013.

KAK, A. C.; SLANEY, M. <u>Principles of computerized tomographic imaging</u>. [S. l.]: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2001.

KARAN, Shyam *et al.* X-ray imaging methods for internal quality evaluation of agricultural produce. Journal of Food Science and Technology, v. 51, n. 1, p. 1 - 15, 2014.

KHAN, A. M.; RAVI, S. <u>Image segmentation methods</u>: a comparative study. <u>International</u> Journal of Soft Computing and Engineering (IJSCE), v. 3, n. 4, p. 84-92, Sept. 2013.

KHEZRI, R. *et al.* Host autophagy mediates organ wasting and nutrient mobilization for tumor growth. <u>EMBO J.</u>, [s. l.], v. 40, n. 18, e107336, 2021.

KIRCHHOFF, V. Princípios básicos em espalhamento incoerente e sua contribuição para o estudo da Física da atmosfera superior. <u>Revista Brasileira de Física</u>, [s. 1.], v. 8, n. 1, p. 89-101, 1978.

KRENKEL, M. Cone-beam x-ray phase-contrast tomography for the observation of single cells in whole organs. Göttingen: Universitätsverlag Göttingen, 2015. v. 17. (Göttingen Series in X-ray Physics, v. 17).

KROPSCOT, C. What is a pixel? <u>PSA Journal</u>, [s. l.], v. 79, n. 9, p. 5-6, 2013.

LEONARD, A. *et al.* Effect of far-infrared radiation assisted drying on microstructure of banana slices: an illustrative use of X-ray microtomography in microstructural evaluation of a food product. Journal of Food Engineering, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 154-162, 2008.

LIGHTSOURCES. Light sources of the world. Disponível em: <u>https://lightsources.org/lightsources-of-the-world/</u>. Acesso em: 11/01/2024.

LINFORD, N. *et al.* Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. Journal of <u>Visualized Experiments</u>, [s. l.], v. 7, n. 71, p. 50068, 2013.

LYNCH, H. Cellular mechanics of germ band retraction in Drosophila. <u>Developmental</u> <u>Biology</u>, [s. l.], v. 384, n. 2, 2013.

MARTINS, R. A. A descoberta dos raios X: o primeiro comunicado de Röntgen. <u>Revista</u> <u>Brasileira de Ensino de Física</u>, v. 20, n. 4, p. 373-391, dez. 1998.

MAYO, S. C. *et al.* In-line phase-contrast X-ray imaging and tomography for materials science. <u>Materials</u>, [s. l.], v. 5, p. 937–965, 2012.

MATTEI, A. L. *et al.* Integrated 3D view of postmating responses by the Drosophila melanogaster female reproductive tract, obtained by micro-computed tomography scanning. <u>Proc. Natl. Acad. Sci.</u>, [s. l.], v. 112, n. 27, p. 8475-8480, 2015.

MED.WEB. Disponível em: <u>http://im.med.up.pt/sinal\_imagem/sinal\_imagem.html</u>. Acesso em 30/10/2023.

MENEZES, K. <u>Interação da radiação com a matéria - aceleradores e proteção radiológica</u>. Porto Alegre: UFRGS, 2008.

MERSERAU, R. Recovering multidimensional signals from their projections. <u>Comput. Gr.</u> <u>Image Process.</u>, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 179–195, 1973.

MIZUTANI, R.; SUZUKI Y. X-ray microtomography in biology. <u>Micron.</u>, [s. l.], v. 43, n. 2-3, p. 104-115, 2012.

MOBILIO, S. *et al.* Synchrotron radiation: basics, methods and applications. Berlin: Springer, 2015.

MOLNAR, A. Search for genes that can modify heterochromatic gene expression in Drosophila melanogaster. Tese de doutorado (Programa de graduação em biologia da Universidade York, Ontario, Toronto – Canadá) em 2022, p.63. Disponível em:

https://yorkspace.library.yorku.ca/server/api/core/bitstreams/754a8bf7-340a-4469-a1b5-09a997cde327/content. Acesso em 15/02/2024.

MOMOSE, A. *et al.* Phase–contrast X–ray computed tomography for observing biological soft tissues. <u>Nat. Med.</u>, [s. 1.], v. 2, p. 473–475, 1996.

MONOLEY, A. *et al.* Alzheimer's disease: Insights from Drosophila melanogaster models. <u>Trends In Biochemical Sciences</u>, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 228-235, 2010.

MORIMOTO, J. *et al.* Assessing anatomical changes in male reproductive organs in response to larval crowding using micro-computed tomography imaging. <u>Neotrop. Entomol.</u>, [s. l.], v. 51, p. 526–535, 2022.

NOBEL PRIZE. Disponível em: <u>https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1901/summary/</u>. Acesso em: 03/10/2023.

NUGENT, K. A. Coherent methods in the X-ray sciences. <u>Advances in Physics</u>, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 1–99, jan. 2010.

OKUNO, E; YOSHIMURA, E. Física das radiações. [S. 1.]: Oficina de Textos, 2016.

OSCAN. Disponível em: <u>https://eifu.esaote.com/fileadmin/Manuals/MRI/portuguese/O-scan\_Manual\_de\_qualidade\_de\_imagem\_e\_de\_sequencias\_R04\_EVO20.pdf</u>. Acesso em: 11/09/2023.

PAIVA, K. *et al.* Performace evaluation of segmentation methods for assessing the lens of the frog Thoropha miliaris from synchrotron-based phase-contrast micro-CT images. <u>Phys. Med.</u>, [s. l.], v. 94, p. 43-52, 2022.

PAGANIN, D. *et al.* Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. J. Microsc., [s. l.], v. 206, p. 33–40, 2002.

PAGANIN, D. M.; PELLICCIA, D. Chapter two - X-ray phase-contrast imaging: a broad overview of some fundamentals. *In*: HÿTCH, M.; HAWKES, P. W. (Ed.). <u>Advances in Imaging and Electron Physics</u>, [s. 1.], v. 218. p. 63–158, 2001.

PECHARSKY, V.; ZAVALIJ, P. <u>Fundamentals of powder diffraction and structural</u> characterization of materials. [S. 1.]: Springer, 2008.

PEREIRA, M. <u>Metodologia de obtenção de coeficiente de atenuação de massa em</u> <u>matrizes biológicas</u>. 2011. Tese (doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011. QUOIRIN, N. <u>Diagnóstico de amostras de madeira por tomografia de raios X</u>. 2014. Disponível em: <u>https://www.oocities.org/tomografiademadeira/interacao.html</u>. Acesso em: 18 out 2023.

RADON, J. On the determination of functions from their integral values along certain manifolds. <u>IEEE Trans. Med. Imaging</u>, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 170–176, 1986.

RIBEIRO, A. <u>Manual de Tomografia Computadorizada do técnico de imagiologia médica</u>. Tese (Doutorado) - Universidade do Algarve, Faro, 2007.

RIVERS, M. <u>Tutorial introduction to X-ray computed microtomography data processing</u>. Chicago: University of Chicago, 1998.

ROTGEN, W. <u>Uber eine neue ART von Strahlen</u>. Sitzunsberichte der physikalischmedicinischen Gesellschaft zu Würzburg. Berlin: Springer, 1895.

RUBIN, G. M. Drosophila melanogaster as an experimental organism. <u>Science</u>, [s. l.], v. 240, n. 4858, p. 1453-1459, 1988.

SACCOMANO, M. *et al.* Synchrotron inline phase contrast  $\mu$ CT enables detailed virtual histology of embedded soft-tissue samples with and without staining. <u>J. Synchrotron Rad.</u>, [s. l.], v. 25, p. 1153–1161, 2018.

SENA, G. *et al.* On the possibilities of polychromatic synchrotron radiation microtomography for visualization of internal structures of Rhodnius prolixus. <u>Radiat.</u> <u>Phys. Chem.</u>, [s. l.], v. 115, p. 179–182, 2015.

SENA, G. *et al.* Synchrotron X-ray biosample imaging: opportunities and challenges. <u>Biophys. Rev.</u>, [s. l.], v. 14, p. 625–633, 2022.

SCHOBORG, T. A. *et al*. Micro-computed tomography as a platform for exploring Drosophila development. Development, 2019.

SCHOEMAN, L. *et al.* X-ray micro-computed tomography ( $\mu$ CT) for non-destructive characterisation of food microstructure. <u>Trends in Food Science & Technology</u>, [s. 1.], v. 47, 2016.

SILVA, J. *et al.* Three-dimensional non-destructive soft-tissue visualization with X-ray staining micro-tomography. <u>Sci. Rep.</u>, [s. l.], v. 5, p. 14088, 2015.

SOARES, K. <u>Otimização experimental e avaliação de métodos de segmentação de micro</u> <u>imagens usando luz síncrotron</u>: uma aplicação na herpetologia. 2023. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física Armando Dias Tavares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023. SNIGIREV, A. *et al.* On the possibilities of x-ray phase contrast microimaging by coherent high-energy synchrotron radiation. <u>Rev. Sci. Instrum.</u>, [s. l.], v. 66, p. 5486–5492, 1995.

ST JOHNSON, D. The art and design of genetic screens: Drosophila melanogaster. <u>Nat Rev.</u> <u>Genet</u>, v. 3, n. 3, p. 176-88, 2002.

TAUHATA, L. *et al.* <u>Radioproteção e dosimetria</u>: fundamentos. Rio de Janeiro: CNEN. IRD, 2013.

TAMAL, M. *et al.* Synchrotron X-ray radiation (SXR) in medical imaging: current status and future prospects. <u>Appl. Sci.</u>, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 3790, 2022.

TAO, S. *et al.* Principles of different X-ray phase-contrast imaging: a review. <u>Appl. Sci.</u>, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 2971, 2021.

VESCOVI, R. <u>Estação experimental para imagens de raios X com contraste de fase por</u> <u>propagação</u>. 2014. Dissertação (mestrado) - Instituto de Física Gleb Wataglin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

ZUO, C. *et al.* Transport of intensity equation: a tutorial. <u>Optics and Lasers in Engineering</u>, [s. 1.], v. 135, p. 106187, dez. 2020.

YOSHIKAI, S. *et al.* Genomic organization of the human-amyloid beta-protein precursor gene. <u>Gene</u>, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 291-292, 1990.

YOSHIMURA, E. Física das radiações: interação da radiação com a matéria. <u>Revista</u> <u>Brasileira De Física Médica</u>, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 57–67, 2009.