



CNPEM
Centro Nacional de Pesquisa
em Energia e Materiais

Projeto de Pesquisa para o CNPq/PIBIC

Desenvolvimento de instrumentação eletrônica para micro
tomografia em animais *"in vivo"* aplicada no Sirius

Desenvolvimento de instrumentação eletrônica para micro tomografia em animais “*in vivo*” aplicada no Sirius

Orientadores: Murilo Carvalho, Fernando Henrique Cardoso & José Wilson Magalhães Bassani

Abril 2018

1 Introdução

A tomografia computadorizada (CT) é uma técnica de imageamento tridimensional que proporciona analisar estruturas internas de um corpo (amostra) de forma não destrutiva. O processo se resume na rotação de uma amostra em frente a um feixe de raios-X, com fluxo e energia suficientes para atravessá-la, enquanto um detector faz a aquisição de uma projeção (radiografia) por passo pré-definido de rotação, conforme Figura 1. Depois de feita a aquisição das imagens é possível aplicar um algoritmo de reconstrução tomográfica responsável por gerar o dado tridimensional que será utilizado para realização das análises desejadas [1].

O SIRIUS [2] é o novo acelerador de partículas que o Brasil está construindo. O projeto prevê que em agosto de 2019 sete estações experimentais (comumente chamadas de linhas de luz) já passem a operar em fase de comissionamento. As linhas de luz recebem a radiação (luz) gerada pela aceleração de elétrons no anel acelerador. O espectro da radiação é amplo, incluindo infravermelho, faixa da luz visível, ultravioleta e raios-X (mole, intermediário e duro). Cada linha, então, filtra os espectros, permitindo a passagem somente das energias desejadas de acordo com a instrumentação e experimentos a serem realizados. A linha de luz dedicada à tomografia de absorção foi batizada de MOGNO(MicrO and NanO Tomography), e está sendo desenvolvida para a ser uma das mais avançadas linhas de luz de micro e nano tomografia do mundo. O diferencial desta linha será o uso de um feixe cônico com raios-X (ao invés de feixe paralelo, atualmente empregado na IMX), permitindo realizar medidas de tomografia com zoom. Essa configuração óptica possibilita que uma amostra seja iluminada em uma grande área, com menor resolução e, ao aproximar do ponto focal, uma área menor seja analisada, mas com resolução nanométrica, conforme ilustrado na Figura 2. Outro fator da MOGNO é o uso de feixes monocromáticos em altas energias (27,5 e 67,5 keV) que, aliado ao alto fluxo de fótons, irá proporcionar medidas ultrarrápidas (e.g. tomografia completa em 10 segundos), baixa dosagem para amostras biológicas e experimentos de tomografia 4D (tomografia resolvida no tempo).

O experimento de tomografia 4D *in vivo* é um grande desafio almejado pelos pesquisadores envolvidos na MOGNO, que exige que diversas características técnicas sejam levadas em conta para que tais experimentos sejam possíveis. Existem poucos experimentos similares já apresentados à comunidade científica e geralmente são configurações experimentais específicas, construídos para uma medida única, como já realizado no SLS (Swiss Light Source) [3]. Na MOGNO, a proposta é construir uma configuração permanente e flexível que

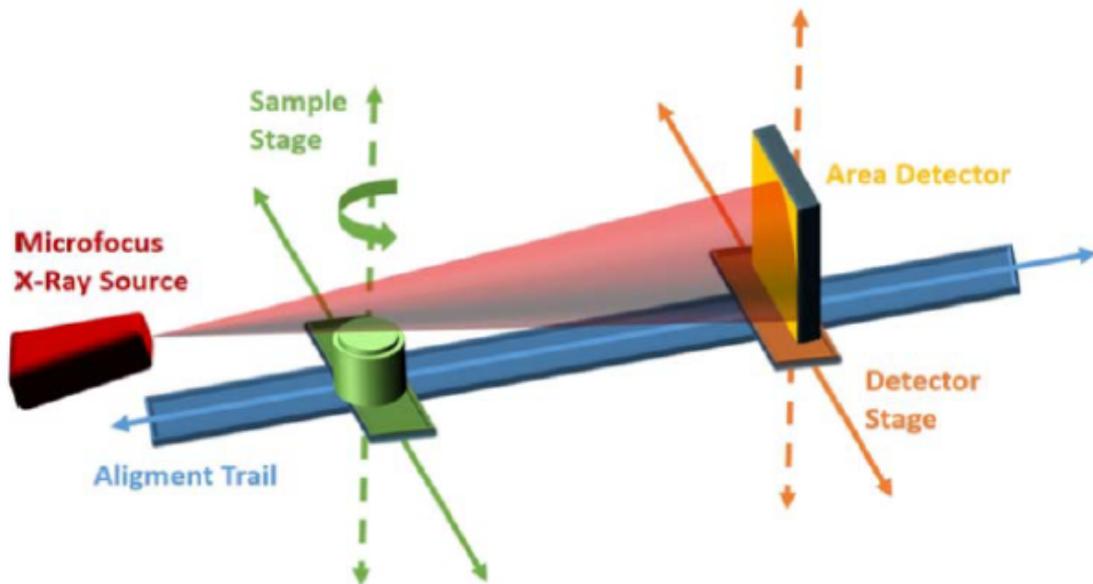


Figura 1: Exemplo dos principais processos presentes em uma tomografia, similar àquela a ser obtida pelo linha MOGNO do Sirius.

permita diversas medidas *in vivo*, para diferentes órgãos de interesse em situações variadas e com diferentes resoluções, acompanhando as amostras ao longo do tempo.

Existem diversos desafios, constantes na literatura [4], que devem ser superados para que o sucesso das medidas em animais vivos seja alcançado na MOGNO. O cenário ideal de uma tomografia é aquele no qual a amostra permanece imóvel durante toda a medida. Contudo, por se tratar de uma amostra biológica viva, movimentos inerentes a atividades vitais (e.g. respiração, batimento cardíaco, peristaltismo, etc.) são esperados. Desse modo, um dos primeiros passos para o sucesso da tomografia *in vivo* é a sincronização entre a captura das projeções com os batimentos cardíacos do animal.

Mais especificamente, no caso de uma tomografia cardíaca, pode ser necessário adquirir as diferentes projeções em um instante específico do ciclo cardíaco, a partir da detecção da onda QRS do Eletrocardiograma (ECG) convencional (Figura 3). Essa técnica, comumente utilizada em tomógrafos médicos mais sofisticados, é também conhecida como “ECG-gated” e resulta em doses menores quando comparada à aquisição constante de projeções durante vários ciclos cardíacos.

Levando-se em conta a variabilidade dos batimentos, em especial a arritmia respiratória, tal sincronismo não é trivial e, possivelmente, um algoritmo preditivo será a solução adequada para gerar um sinal de sincronismo para a estação experimental. Para compor a tomografia, cerca de 1.000 projeções são necessárias, em ângulos diferentes, exatamente no mesmo instante do ciclo cardíaco. Uma das grandes dificuldades está na exposição do animal ao raio-X: para evitar altas doses de radiação, será necessário sincronizar um obturador do feixe

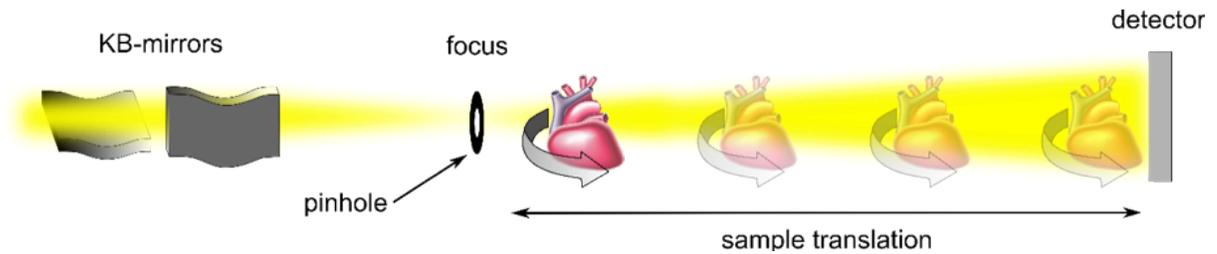


Figura 2: Processo de tomografia em zoom que será utilizado na MOGNO.

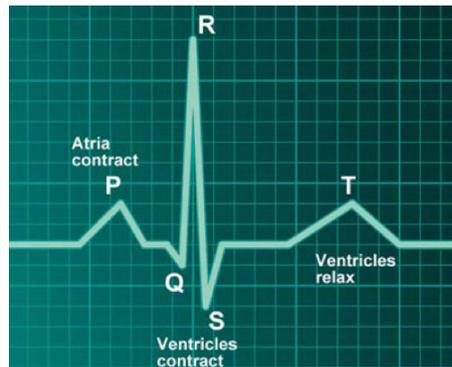


Figura 3: Esquema simplificado das ondas eletrocardiográficas PQRST de um ECG normal. Fonte: [5]

com os batimentos cardíacos. Esse é o principal motivo pelo qual o sucesso dos experimentos *in vivo* depende altamente do processo de medição e utilização do sinal eletrocardiográfico.

O movimento respiratório também influencia a medida e, no mínimo, a informação deve ser salva para correção no algoritmo de reconstrução de imagem, sendo esse um segundo requisito de instrumentação.

Ademais será desenvolvida uma estrutura de fixação para os animais, que incorporará, além de toda a eletrônica de medição, os sistemas que permitirão a anestesia do animal mantendo as funções vitais controladas, como temperatura e oxigenação sanguínea. A própria movimentação da amostra (animal) durante a rotação deverá ser considerada de modo a reconstruir um volume de imagens sem artefatos. Um exemplo de estrutura é mostrado na Figura 4:

O rigoroso cumprimento da ética no uso de animais de experimentação é, não somente uma obrigação legal, mas parte do sucesso do experimento, mantendo a padronização dos dados adquiridos. Assim, o controle fino da sedação inalatória é crucial. A profundidade de anestesia deve ser adequada ao estudo. Caso contrário, uma anestesia mais superficial pode causar estresse/dor ou uma anestesia demasiadamente profunda, pode levar ao desequilíbrio térmico ou, até mesmo, parada cardio-respiratória. Nesse cenário, a monitorização e controle em tempo real da temperatura do porta-amostra e do próprio animal durante o experimento é fundamental para a manutenção dos níveis de homeostase ideais.

Tais medidas permitiriam um conhecimento profundo sobre a fisiologia animal, inclusive do sistema cardio-

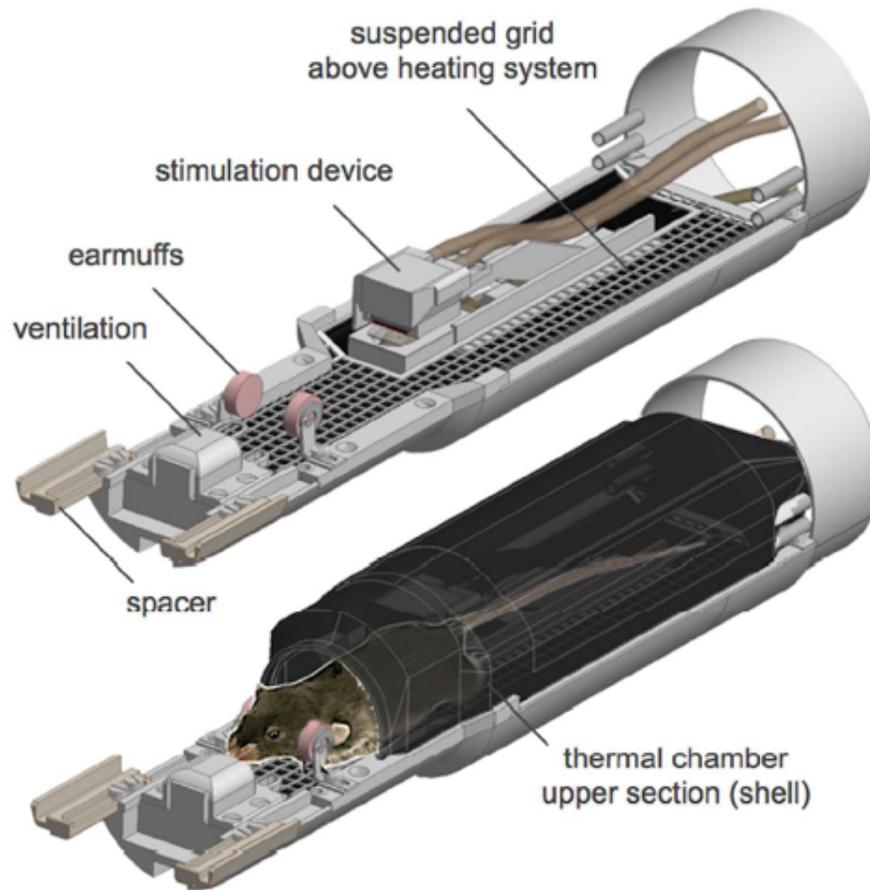


Figura 4: Exemplo de estrutura de fixação. Fonte: [6]

respiratório e da evolução de tratamentos de doenças, como o câncer. Diversos grupos de pesquisa fazem uso da tomografia 4D no decorrer de suas pesquisas, rompendo as fronteiras atuais do conhecimento nas diversas áreas e resultando em um avanço tecnológico significativo para a ciência no Brasil e no mundo.

2 Justificativas

O projeto apresentado pretende contribuir de maneira significativa para a formação acadêmica e profissional do candidato, através dos seguintes quesitos:

- Inserção do aluno de iniciação científica no ciclo de projeto eletrônico que inclui diversas etapas, tais como a definição dos componentes, introdução a microcontroladores, simulação, montagem e testes.

- Integração com grupos de pesquisa e desenvolvimento responsáveis pelo estado da arte da tecnologia no Brasil, membros do Departamento de Engenharia Biomédica da Unicamp e do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.
- Contato com aspectos multidisciplinares relacionados ao projeto, desenvolvendo soluções que atendam requisitos técnicos envolvendo as áreas tecnológica e biológica.

Além do conhecimento prático que será obtido, procura-se também aplicar o fruto da iniciação científica em um ambiente real, que é a estação experimental de tomografia 4D *in vivo*, uma contribuição notória para a comunidade científica que fará uso da MOGNO.

3 Objetivos

O objetivo deste projeto é estudar a fisiologia animal para experimentação de tomografia 4D em animais vivos, desenvolvendo a instrumentação eletrônica necessária para medição e utilização do ECG no controle e regulação da experimentação, em especial atuando no obturador (*shutter*).

4 Métodos

4.1 Animais

O modelo animal adotado será camundongos adultos da linhagem FVB/NJ, provenientes do biotério do LNBio-CNPEM e não sofrerão qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados neste projeto. O animal, nesta fase do projeto, será anestesiado por anestesia injetável e a ele conectado, topicamente, eletrodos para medição de ECG. Os sensores não serão invasivos de movimento respiratório. Toda a metodologia de manipulação será conduzida seguindo as diretrizes adotadas nos procedimentos de rotina do LNBio quanto ao uso de animais. Toda experimentação que envolva manipulação animal será submetida ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-CNPEM) e, somente após a aprovação, prosseguiremos com as análises.

4.2 Requisitos básicos e desafios

Deteção não invasiva de ECG, atividade respiratória e temperatura. Deve-se atentar para o fato da atividade espontânea apresentar variabilidade e, portanto, dificultar a utilização do ECG como disparador (*trigger*) e controle das medições. Este aspecto deverá ser levado em consideração e tratado por meio de um algoritmo de software a ser desenvolvido em conjunto com o Grupo de Apoio Eletrônico (GAE) do LNLS e CEB-UNICAMP. É requisito também a sincronização das medições de ECG com a exposição do animal aos raios-X, buscando minimizar a dose total de radiação ionizante.

Tais requisitos compõem toda a instrumentação eletrônica necessária para o desenvolvimento geral da solução a ser disponibilizada para a comunidade científica com o projeto. Compete ao candidato estudar as características envolvidas na implementação, propor soluções, em parceria com os orientadores e demais grupos envolvidos no projeto.

4.3 Etapas

O projeto pode ser segmentado em etapas principais, que exigem determinados materiais e uma metodologia específica para que os objetivos desejados sejam atingidos. De uma maneira geral, os materiais e métodos necessários para o desenvolvimento das etapas devem evoluir com o decorrer do projeto, entretanto podemos realizar a seguinte análise preliminar de atividades:

1. Estudo da fisiologia animal para o desenvolvimento do projeto: naturalmente, o candidato deve se familiarizar com a fisiologia da atividade elétrica do coração e os aspectos físicos e biofísicos envolvidos na geração do ECG [7] outros aspectos biológicos mais diretamente envolvidos (sob supervisão direta dos orientadores);
2. Desenvolvimento eletrônico do protótipo de amplificador para ECG (eletrocardiograma): desde a escolha de eletrodos até a fabricação de placa de circuito impresso, o candidato deverá escolher os componentes adequados e testar a solução de eletrocardiograma para camundongos, cuja frequência cardíaca cujo batimento pode variar desde um valor basal, em sedação (cerca de 300 bpm) até valores mais altos em casos de estresse (até 800 bpm), não necessariamente de forma regular. O circuito será projetado com base em trabalhos científicos previamente publicados [8, 9].
3. Desenvolvimento eletrônico para monitoramento da atividade respiratória: será investigada a solução, usando sensores piezoelétricos e outros. Além da busca da melhor adaptação dos sensores ao animal serão construídos os circuitos de condicionamento para monitorar a respiração do animal por meio dos movimentos torácicos;
4. Integração com a estação experimental através de sinais de sincronismo: as medidas devem ser sincronizadas com experimento, principalmente o obturador de raio-X com as medidas de ECG. O candidato estudará as técnicas de sincronismo, desenvolvendo uma técnica que permita que as medidas sejam realizadas através de um algoritmo preditivo;
5. Desenvolvimento eletrônico, ainda que em nível de protótipo, para aquecimento da estrutura de fixação: montar circuito, já projetado por um engenheiro da equipe, com um conjunto de aquecedores com driver de potência e sistema de controle em malha fechada através de sensores de temperatura na estrutura de fixação permitirá que a temperatura corpórea do animal se mantenha em níveis desejados mesmo após a sedação profunda;
6. Documentação do projeto: elaboração da documentação técnica dos resultados atingidos e do relatório final de iniciação científica. Por fim, artigos científicos que permitam a divulgação do trabalho na comunidade científica.

5 Resultados Esperados

O desenvolvimento de um sistema de leitura de ECG acoplado à geração de um sinal que atuará na abertura de um bloqueador (*shutter*) de raios-X será de suma importância para um dos primeiros passos para o sucesso

Tabela 1: Cronograma de execução das atividades

ATIVIDADES	SEMESTRE 1						SEMESTRE 2					
	TRI 1			TRI 2			TRI 3			TRI 4		
	1M	2M	3M	1M	2M	3M	1M	2M	3M	1M	2M	3M
1	█	█										
2		█	█									
3			█	█	█	█						
4						█	█	█	█			
5									█	█	█	
6										█	█	█

da montagem de uma linha de luz síncrotron dedicada à imageamento de animais "in vivo". Esperamos, com isso, reduzir o número de animais necessários em experimentos que pretendam acompanhar o curso de processos biológicos ao longo do tempo e melhorar o entendimento destes visto que o viés dos fenômenos individuais será descartado.

6 Cronograma de Atividades

O cronograma de atividades é mostrado na Tabela 1.

Referências

- [1] E. L. Ritman. Current status of developments and applications of micro-ct. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13(1):531–552, 2011.
- [2] Projeto Sirius. <http://www.lns.cnpem.br/sirius/projeto-sirius/>. Acesso em 20/04/2018.
- [3] SLS – Swiss Light Source. <https://www.psi.ch/sls/>. Acesso em 20/04/2018.
- [4] Lovric, G; Mokso, R; et al. . Tomographic in vivo microscopy for the study of lung physiology at the alveolar level. *Nature Scientific Reports*, 7:12545, 2017.
- [5] Heart beat and cardiac volumes. http://www.teachpe.com/anatomy/heart_beat.php. Acesso em 20/04/2018.
- [6] Reimann H M and et al. Normothermic Mouse Functional MRI of Acute FocalThermostimulation for ProbingNociception. *Nature Scientific Reports*, 6:17230, 2016.
- [7] Malmivuo J and Plonsey R. *Bioelectromagnetism. Principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields*. Oxford University Press, New York, USA, 1995.

-
- [8] Germer CM. Eletrocardiograma, movimento contrátil cardíaco e frequência cardíaca da lagartixa, *Hemidactylus mabouia* (moreau de jonnès, 1818). Tese de mestrado. Dept. Engenharia Biomédica, FEEC, UNICAMP.
- [9] Germer CM, Tomaz JM, Carvalho AF, Bassani RA, and Bassani JWM. Electrocardiogram, heart movement and heart rate in the awake gecko (*Hemidactylus mabouia*). *J. Comp. Physiol. B.*, 185:111–118, 2016.