



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



NATÁLIA GUIMARÃES KALATZIS SOUSA

**USO DA MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA NA ANÁLISE DA
LESÃO PERIAPICAL EM ANIMAIS DE PEQUENO PORTE: REVISÃO
SISTEMÁTICA DA LITERATURA E ESTUDO IN VIVO**

Araraquara

2016



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



NATÁLIA GUIMARÃES KALATZIS SOUSA

**USO DA MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA NA ANÁLISE DA
LESÃO PERIAPICAL EM ANIMAIS DE PEQUENO PORTE: REVISÃO
SISTEMÁTICA DA LITERATURA E ESTUDO IN VIVO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia - Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

Araraquara

2016

Kalatzis-Sousa, Natália Guimarães.

Uso da microtomografia computadorizada na análise da lesão periapical em animais de pequeno porte: revisão sistemática da literatura e estudo in vivo / Natália Guimarães Kalatzis-Sousa.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

91 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria.

1. Periodontite periapical 2. Microtomografia por raio-X
3. Endodontia 4. Ratos 5. Camundongos. I. Título

NATÁLIA GUIMARÃES KALATZIS SOUSA

**USO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA NA ANÁLISE DA LESÃO
PERIAPICAL EM ANIMAIS DE PEQUENO PORTE: REVISÃO SISTEMÁTICA DA
LITERATURA E ESTUDO IN VIVO**

Tese para obtenção do grau de doutor

Comissão julgadora:

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

2° Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

3° Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

4° Examinador: Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira

5° Examinador: Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha

Araraquara, 26 de agosto de 2016

DADOS CURRICULARES

NATÁLIA GUIMARÃES KALATZIS SOUSA

- NASCIMENTO:** 27 de setembro de 1985, Brasília, Distrito Federal, Brasil
- FILIAÇÃO:** José Elias Palmeira de Sousa
Dímitra F. Kalatzis Sousa
- 2003 - 2007:** Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Católica de Brasília - UCB
- 2008 - 2010:** Especialização em Endodontia
Universidade Católica de Brasília - UCB
- 2011 - 2013:** Mestrado em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
- 2013 - 2016:** Doutorado em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedico este trabalho

A Deus minha força, inspiração, alegria, esperança e razão do meu viver.

Aos meus pais e irmão pelo amor incondicional e apoio irrestrito.

Agradecimentos

Primeiramente a **Deus** por sua presença constante em minha vida, me abençoando, fortalecendo e capacitando.

Aos meus pais **José Elias Palmeira de Sousa** e **Dímitra F. Kalatzis Sousa** que com amor e dedicação sempre me apoiaram e incentivaram na concretização dos meus sonhos e objetivos.

Ao meu irmão **Guilherme Elias G. Kalatzis Sousa** pelo carinho, paciência e exemplo de determinação.

À minha orientadora **Profa. Dra. Gisele Faria** pela competência, determinação, dedicação e apoio.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do atual reitor **Dr. Júlio Cezar Durigan** e vice-reitora **Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge**.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, na pessoa da atual diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgaviolli Massucato** e do vice-diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, na pessoa do **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, pela disponibilidade e colaboração.

Aos professores das Disciplinas de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, **Prof. Dr. Fábio Luiz C. Vilella Berbert**, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga** e **Prof. Dr. Renato Toledo Leonardo**, pelo incentivo, experiência, auxílio e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri** e **Profa. Dra. Estela Sasso Cerri** do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, por permitirem o uso do laboratório de Histologia e Embriologia para realização dos experimentos e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** do Laboratório de Microtomografia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, pela disponibilidade e ajuda no ajuste do aparelho de microtomografia computadorizada.

Aos **Prof. Antonio Carlos Henriques Marques e Prof. Johnny Soares de Carvalho**, Engenheiros da Universidade Federal de São Carlos, pelos conhecimentos prestados, experiência e esclarecimentos em relação ao cálculo da amostra.

Ao **Prof Rubens Spin Neto** do Departamento de Radiologia Oral e Dentística da Universidade de Aarhus - Dinamarca, pela experiência compartilhada e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Aos alunos e colegas do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista: **Aline Andrade, Ana Carolina Venção, Ana Livia Cornélio, Ariele Patrícia Rabello, Bernardo Costa, Camila Almeida Nascimento, Camila Espir Passador, Derik Barbosa, Elisandra Márcia Rodrigues, Fernanda Ferrari, Gisselle Moraima Chávez Andrade, Kennia Scapin Viola, Larissa Torres, Roberta Bosso Martelo, Roberto Almela Houshinu, Raqueli Viapiana e Tiago Silva da Fonseca**, por compartilharem experiências, pelos momentos de convivência agradável e amizade.

À amiga do Programa de Pós-graduação em Odontologia, **Roberta Bosso Martelo** pela participação e auxílio nas diversas etapas do trabalho desenvolvido, pelo apoio, carinho e amizade.

A amiga **Valéria M. de Paiva** pelo apoio incondicional, carinho, palavras de incentivo, ânimo e amizade.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, **José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier** pela dedicação e ampla disponibilidade.

À equipe da Biblioteca Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, em especial à **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas e à Maria Inês Carlos** pela atenção dispensada e orientação para a realização da pesquisa de dados e artigos científicos utilizados na confecção do artigo de revisão sistemática.

Aos funcionários do laboratório de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, **Pedro Sergio Simões e Luiz Antonio Potenza**, pela ajuda no processamento histotécnico, pelo conhecimento e convívio agradável.

À funcionária do laboratório de Microtomografia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, **Luana Elis Sabino** pela paciência, empenho e assistência.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, **Mario Sérgio Fantine, Vanderlei José Antônio da Silva, Creusa Maria Hortenci, Alessandra Aparecida Rabalho, Maria Aparecida Vieira Santos, e Neuza Medrato de Aquino**, pelo carinho e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Porque melhor é a sabedoria do que joias, e de tudo que se deseja nada se pode comparar a ela.

Provérbios 8.11

Kalatzis-Sousa NG. Uso da microtomografia computadorizada na análise da lesão periapical em animais de pequeno porte: revisão sistemática da literatura e estudo in vivo [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram: Publicação 1 - Realizar uma revisão sistemática sobre os parâmetros microtomográficos de aquisição, reconstrução e análise da lesão periapical (LP) em ratos e camundongos. Além disso, ilustrar o efeito da variação destes parâmetros (tamanho do *voxel*, *beam hardening correction*, *smoothing*, *gray dataset*, plano de orientação, região de interesse - ROI e *threshold*) em imagens microtomográficas de hemimandíbulas com LP induzida em molares inferiores de camundongos; e Publicação 2 - Avaliar a acurácia da microtomografia computadorizada (micro-CT) na análise de LP induzida em dentes de camundongos empregando como padrão ouro para comparação os valores obtidos por estereologia aplicada a dados histológicos. Na Publicação 1, foram pesquisados artigos que usaram a micro-CT para avaliar LP em ratos e camundongos de 2000 a janeiro de 2015 no PubMed. Para a ilustração dos efeitos da variação dos parâmetros de aquisição, reconstrução e análise da LP foram utilizadas mandíbulas de camundongos que tiveram LP induzida nos primeiros molares inferiores. Foram encontrados 21 artigos. Destes, 18 citaram algum parâmetro usado na aquisição, nenhum descreveu os parâmetros de reconstrução e 16 citaram alguns parâmetros de análise da LP. Nenhum artigo relatou o protocolo completo para aquisição, reconstrução e avaliação da LP. Nenhum artigo foi classificado como alta qualidade, 7 foram como moderada qualidade e 14 de baixa. A ilustração da variação dos parâmetros mostrou que o tamanho do voxel e os parâmetros de reconstrução podem interferir na nitidez da imagem. A orientação inadequada do plano altera o tamanho real da LP. Os ROIs não personalizados selecionam regiões além da LP e o personalizado seleciona apenas a lesão. O aumento dos valores do *threshold* aumenta a lesão. Concluiu-se que não há protocolo definido para a obtenção das imagens microtomográficas e análise da LP em ratos e camundongos, além dos parâmetros empregados não serem adequadamente explicados comprometendo a reprodutibilidade dos estudos. Na Publicação 2, a LP foi induzida nos primeiros molares inferiores de camundongos. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados e as hemimandíbulas extraídas (n=28) e escaneadas em microtomógrafo. Para análise histológica da lesão periapical, as hemimandíbulas foram descalcificadas e submetidas ao processamento histotécnico. A área da lesão periapical da raiz distal dos molares foi mensurada em cortes histológicos empregando o programa Image J. A partir dos valores obtidos, foi calculado o volume da lesão periapical por meio do princípio de Cavalieri e, em seguida, foi aplicado o fator de correção ao volume obtido. Para calcular o volume de lesão periapical na micro-CT, as imagens microtomográficas no plano sagital foram anguladas seguindo a angulação das imagens obtidas nos cortes histológicos. O volume da lesão periapical foi mensurado empregando o programa CTAn (Skyscan). Todas as medidas foram realizadas por um avaliador previamente calibrado em dois momentos distintos. Os dados foram analisados por meio do teste t pareado e do coeficiente de correlação intraclass (ICC) empregando nível de significância de 5%. Os resultados preliminares mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o volume da lesão periapical obtido por ambas as metodologias (p=0,642). O ICC (0,956) indicou alta concordância entre o volume da lesão periapical obtido histologicamente e por micro-CT. Com base nos resultados preliminares pode-se concluir que a micro-CT pode ser considerada uma metodologia precisa para a análise do volume da lesão periapical em camundongos.

Palavras chave: Periapical periodontite. Microtomografia por raio-X. Endodontia. Ratos. Camundongos.

Kalatzis-Sousa NG. Use of computed microtomography analysis of periapical lesions in small animals: a systematic review of the literature and in vivo study [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

The objectives of this study were: Publication 1 - Perform a systematic review of the microtomographic parameters of acquisition, reconstruction and analysis of periapical lesion (LP) in rats and mice. In addition, to illustrate the effect of the variation of these parameters (voxel size, beam hardening correction, smoothing, gray dataset, orientation plane, region of interest - ROI and threshold) in microtomographic pictures of hemimandibles with LP induced in lower molars of mouse; and Publication 2 – Evaluate the accuracy of computed microtomography (micro-CT) in the analysis of LP induced in teeth of mouse employing as the gold standard for comparing the values obtained by stereology applied to histological data. In Publication 1, were researched papers that used micro-CT to evaluate LP in rats and mouse from 2000 to January 2015 in PubMed. To illustrate the effect of variations in acquisition-, reconstruction-, **and analysis parameters on images of LP were used mouse's jaws that had** LP induced in the lower first molars. 21 articles were found. Of these, 18 cited a parameter used in the acquisition, none described the reconstruction parameters and 16 cited some of the LP analysis parameters. No article reported the complete protocol for acquisition, reconstruction and analysis of LP. No study was classified as high seven were classified as moderate-, and 14 as low quality. The effect of variation in parameters was that voxel size may interfere with image sharpness and reconstruction may interfere with image sharpness. The inadequate plane orientation may alter the size of the LP. Nonpersonalized ROIs select the regions beyond the LP and the personalized selects only the lesion. The increase of the threshold values increased the lesion. It was concluded that no defined protocol for acquiring and analyzing micro-CT images of LP in rats and mice, beyond the parameters are not adequately explained, which may compromise the scientific impact of the studies. In Publication 2, the LP was induced in the first lower molars of mouse. After 14 days, the animals were euthanized and hemimandibles was extracted (n = 28) and scanned in microtomography. For histological analysis of LP, the mandibles were decalcified and submitted to histotechnical processing. The LP area of the distal root of molars was measured in histological sections using the Image J. From the values obtained, the volume of LP was calculated by the Cavalieri principle and then the correction factor was applied to obtained volume. To calculate the volume of LP in micro-CT, the microtomographic images in the sagittal plane were angled following the angle of the images obtained in the histological sections. The volume of LP was measured using the CTAn software (Skyscan). All measurements were performed by a calibrated person in two different times. The data were analyzed using the paired t test and the intraclass correlation coefficient (ICC) using a significance level of 5%. The preliminary results showed no statistically significant difference between the volume of LP obtained by both methods ($p = 0.642$). The ICC (0.956) indicated a high correlation between the volume of LP obtained histologically and by micro-CT. Based on preliminary results it can be concluded that the micro-CT can be considered an accuracy methodology from the analyze of the volume of LP in mice.

Keywords: Periapical periodontitis. Microtomography X-ray. Endodontics. Rats. Mice.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PUBLICAÇÃO 1.....	20
3 PUBLICAÇÃO 2.....	59
4 DISCUSSÃO	75
5 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

A lesão periapical é causada pela infecção do sistema de canais radiculares (Ricucci, Siqueira,³⁴ 2010) e representa uma resposta do hospedeiro que envolve o recrutamento de células inflamatórias, geração de citocinas, de enzimas líticas e ativação de osteoclastos, o que leva à destruição dos tecidos mineralizados e não mineralizados (Stashenko et al.^{46,47}, 1994, 1998; Graves et al.¹³, 2011). A reabsorção óssea é um fator importante para avaliar a presença e a extensão da lesão periapical. Ratos e camundongos têm sido amplamente utilizados em estudos da patogênese da lesão periapical experimentalmente induzida (Matsui et al.²⁷, 2011; Wang et al.⁵⁸, 2011; Garlet et al.¹¹, 2010; Silva et al.⁴¹, 2011; Maciel et al.²⁴, 2012; Sousa et al.⁴³, 2014; de Oliveira et al.⁹, 2015). Nesses modelos animais, a reabsorção óssea periapical pode ser avaliada por meio de radiografias convencionais ou digitais (Teixeira et al.⁵⁰, 2011), cortes histológicos (von Stechow et al.⁵⁶, 2003 ; Rittling et al.³⁶, 2010 ; Teixeira et al.⁵⁰, 2011; Sousa et al.⁴³, 2014; Sun et al.⁴⁸, 2014; Hao et al.¹⁵, 2015), ou ainda, mais recentemente, por meio de microtomografia computadorizada – micro CT (von Stechow et al.⁵⁶, 2003 ; Rittling et al.³⁶, 2010 ; McAbee et al.²⁸, 2012; Sousa et al.⁴³, 2014; Sun et al.⁴⁸, 2014; de Oliveira et al.⁹, 2015; Hao et al.¹⁵, 2015). No entanto, os exames radiográficos, convencional e digital não são totalmente adequados para avaliação de dentes de ratos e camundongos, devido ao seu tamanho reduzido e anatomia da mandíbula.

A análise da lesão periapical em cortes histológicos é o método considerado padrão ouro (von Stechow et al.⁵⁶, 2003). No entanto, este método necessita de longos períodos para realização, leva à destruição da amostra e permite análise da lesão periapical em um único plano (Balto et al.³, 2000; von Stechow et al.⁵⁶, 2003).

Nos anos 70 foi introduzida a tomografia computadorizada (Schambach et al.³⁸, 2010). O uso de tomografia em animais de pequeno porte apresenta limitações, pois a capacidade do aparelho de escanear peças menores é reduzida, diminuindo assim a resolução das imagens (Ritman et al.³⁵, 2007). Posteriormente, surgiu a micro CT, que apresenta alta resolução de imagens (Cavanaugh et al.⁶, 2004). A micro CT é considerada uma ferramenta importante para pesquisas endodônticas e também para o diagnóstico e estudo de mecanismos da formação da lesão periapical induzida em pequenos roedores, como ratos e camundongos (von Stechow et al.⁵⁶, 2003; Sun et al.⁴⁸, 2014). Embora necessite de aparelho específico e operador treinado, a micro CT é um método rápido, reprodutível e não destrutivo (Balto et al.³, 2000), servindo

assim, como um grande aliado para as pesquisas de animais de pequeno porte (Schambach et al.³⁸, 2010).

Além de apresentar uma alta resolução de imagens, a micro CT proporciona a obtenção de imagens em 2D (bidimensional) e em 3D (tridimensional) e permite a mensuração da área e do volume da lesão periapical. A lesão periapical pode ser avaliada por imagens microtomográficas nos planos coronal, sagital (von Stechow et al.⁵⁶, 2003) e axial (Sun et al.⁴⁸, 2014; Yang et al.⁶¹, 2014).

Estudos empregando a micro CT para avaliar a lesão periapical em ratos e camundongos tem sido relatados na literatura (Balto et al.³⁻⁵, 2000, 2001, 2002; von Stechow et al.⁵⁶, 2003; McAbee et al.²⁸, 2012; Kang et al.¹⁹, 2013; Wan et al.⁵⁷, 2014; Tang et al.⁴⁹, 2014; Sun et al.⁴⁸, 2014; Yang et al.⁶¹, 2014; Sousa et al.⁴³, 2014; de Oliveira et al.⁹, 2015; Hao, et al.¹⁵, 2015). A maioria dos artigos avaliam apenas a área (Balto et al.³⁻⁵, 2000, 2001, 2002; von Stechow et al.⁵⁶, 2003; McAbee et al.²⁸, 2012; Wan et al.⁵⁷, 2014; Sousa et al.⁴³, 2014; de Oliveira et al.⁹, 2015) e alguns avaliam o volume da lesão periapical (von Stechow et al.⁵⁶, 2003; Kang et al.¹⁹, 2013; Sun et al.⁴⁸, 2014; Tang et al.⁴⁹, 2014; Yang et al.⁶¹, 2014; de Oliveira et al.⁹, 2015; Hao et al.¹⁵, 2015).

Para a mensuração da área da lesão periapical são utilizados cortes que passam pela região central da raiz que mostram simultaneamente a luz do canal radicular nos terços coronário, médio e apical da raiz, o forame apical e osso alveolar (Sousa et al.⁴³, 2014). De acordo com Spin-Neto et al.⁴⁵ (2011) o ideal é medir o volume e não a área do objeto, pois a mensuração da área da parte central do objeto pode levar a resultados incorretos devido a irregularidade da forma do objeto.

A literatura tem mostrado que o volume da lesão periapical obtidos por meio de micro-CT apresenta alta correlação com a área da lesão mensurada em cortes histológicos (von Stechow et al.⁵⁶, 2003; Sun et al.⁴⁸, 2014; Yang et al.⁶¹, 2014). No entanto, nenhum estudo comparou volume da lesão periapical obtido por meio de análise histológica (padrão ouro) com o volume obtido por meio de micro-CT, ou seja, não há evidência científica que comprove que a micro-CT é um método preciso para avaliar o volume da lesão periapical em ratos e camundongos.

Os parâmetros utilizados, durante o processo de aquisição (tipo e a espessura do filtro, tamanho do voxel, correntes de voltagem - kV e amperagem - μA , tempo de exposição e de escaneamento, passos de rotação, *frame*, rotação de 180° ou 360° e tipo de plano - axial, coronal e sagital), reconstrução (*smoothing*, *beam hardening*

correction, ring artifact reduction and grayscale dataset) e análise (plano de orientação, tipo de ROI - região de interesse e valores de *threshold*) das imagens microtomográficas, podem ter influência direta sobre as características finais da imagem da lesão periapical e sobre o resultado das análises. No entanto, na literatura, a descrição desses parâmetros é escassa, além de não haver padronização quando imagens microtomográficas são usadas para a avaliação de lesões periapicais em ratos e camundongos (Kalatzis-Sousa et al.¹⁷, 2016).

O tamanho do voxel de uma imagem em 3D é equivalente à resolução de pixel em imagens 2D (Spin-Neto et al.⁴⁴, 2013). O tamanho do voxel determina a resolução da imagem (Scarfe et al.³⁷, 2006). Quanto menor o tamanho do voxel maior é a resolução e a nitidez das imagens (Ballrick et al.², 2008). Contudo, nem sempre o menor tamanho de voxel é o mais utilizado nos estudos. Dependendo da estrutura a ser analisada, o tamanho do voxel intermediário ou maior pode apresentar uma boa acurácia no diagnóstico (Liedke et al.²¹, 2009; Maret et al.²⁶, 2012; Vizzotto et al.⁵⁵, 2013). Liedke et al.²¹ (2009) avaliaram a detecção de reabsorções radiculares externas por tomografia computadorizada cone beam (CBCT) utilizando voxel de 0,2, 0,3 e 0,4mm. Eles observaram que o voxel de 0,3mm associava uma boa precisão de diagnóstico, com uma menor exposição de radiação. Maret et al.²⁶ (2012) compararam a precisão da mensuração do volume dentário em imagens obtidas com voxel de 300, 200, 76 e 41 μ m. Observaram que os volumes foram semelhantes até os 200 μ m, mas com o voxel de 300 μ m o volume dentário é subestimado.

Além de interferir na qualidade das imagens, o tamanho de voxel influencia na dose de radiação (Ludlow et al.²³, 2006; Loubele et al.²², 2008); imagens tomográficas adquiridas em menor tamanho de voxel, exigem maior tempo de escaneamento (Palomo et al.³¹, 2008) e maior exposição à radiação (Ballrick et al.², 2008; Davies et al.⁸, 2012). Além disso, o maior tempo de escaneamento exigido quando se emprega tamanho de voxel pequeno, aumenta o tempo de reconstrução das imagens (Kamburoglu et al.¹⁸, 2010), o tempo de realização dos experimentos e também o tempo em que o animal precisa ser mantido anestesiado. A micro CT tem sido usada para avaliar a lesão periapical em ratos e camundongos empregando-se tamanhos de voxel variando de 12 a 37 μ m (Sun et al.⁴⁸, 2014; Sousa et al.⁴³, 2014; Hao et al.¹⁵, 2015). No entanto, não há estudos avaliando a influência do tamanho do voxel na precisão da mensuração da lesão periapical em ratos e camundongos.

O kV, amperagem, tipo de filtro (Ludlow et al.²³, 2006, Palomo et al.³¹, 2008), rotação (Lennon et al.²⁰, 2011, Cook et al.⁷, 2015) e passos de rotação (Willekens et al.⁶⁰, 2010) também pode influenciar na dose de radiação. Em tomografia, quanto menor é o kV e a amperagem, mais baixa é a dose de radiação (Ludlow et al.²³, 2006, Palomo et al.³¹, 2008) aumentando o ruído das imagens (Zarb et al.⁶², 2015).

O filtro durante a aquisição das imagens está diretamente relacionado ao kV e a amperagem. Quanto mais espesso o filtro, maior é o valor do kV e da amperagem, bem como o tempo de exposição e de escaneamento (SkyScan⁴², 2011).

A rotação da amostra pode ser parcial (180°) ou completa (360°). Para tomografia computadorizada (CBCT), a rotação completa leva ao maior tempo de exposição, dose de radiação, maior resolução de imagem e número de cortes (Lennon et al.²⁰, 2011, Cook et al.⁷, 2015). A literatura mostra que o uso da rotação parcial (180°) pode levar à redução de 50-73% da dose de radiação em comparação com uma rotação completa - 360° (Cook et al.⁷, 2015). No entanto, ambas as rotações em CBCT podem produzir precisão semelhante na detecção de lesões ósseas artificiais (Durack et al.¹⁰, 2011, Lennon et al.²⁰, 2011). Em relação ao passo de rotação, sabe-se que é inversamente proporcional à resolução de imagem (Abudurexiti et al.¹, 2010, Willekens et al.⁶⁰, 2010, Sharir et al.⁴⁰, 2011). No entanto, isso envolve a mesma dinâmica anteriormente citada (maior tempo de exposição, dose de radiação, resolução de imagem e número de cortes) (Willekens et al.⁶⁰, 2010).

Após o processo de aquisição, as imagens necessitam ser reconstruídas. Mesmo utilizando equipamentos adequados há produção de artefatos/ruídos nas imagens adquiridas (Van Geet et al.⁵³, 2000; Van Geet e Swennen,⁵² 2001) que são a principal causa de uma baixa qualidade da imagem. Estes artefatos devem ser corrigidos empregando os filtros *ring artifact reduction*, *beam hardening correction* e *smoothing* do programa NRecon (SkyScan, Kontich, Bélgica) que apresentam valores que vão de 1 a 20, de 1 a 100% e de 1-10, respectivamente. Outro parâmetro também utilizado na reconstrução das imagens é o *gray dataset* (histograma). Este parâmetro, também chamado de escala de cinza, é utilizado para corrigir o contraste permitindo a visualização dos diferentes níveis de cinza (Philips³², 2000) e varia de 0,000000 a 0,100000 no programa NRecon (SkyScan). As informações dos valores usados nos filtros de correção de artefatos e no histograma são importantes, pois estes podem melhorar ou piorar a visualização das imagens e conseqüentemente influenciar na sua

avaliação e na mensuração de estruturas. Além disso, a não informação destes valores usados na reconstrução das imagens dificulta a reprodução da metodologia.

Após a reconstrução, as imagens microtomográficas devem ser orientadas. Dependendo da orientação criam-se imagens contaminadas (Spin-Neto et al.⁴⁵, 2011) que podem mostrar a lesão periapical maior ou menor do que o tamanho real e por isso há necessidade de se relatar nos estudos os critérios usados para a orientação das imagens.

Para a mensuração do volume da lesão periapical, deve ser selecionado o ROI (região de interesse) e os valores de **threshold**. Contudo, alguns ROIs como o retangular, redondo e poligonal podem selecionar regiões que não fazem parte da lesão periapical, como o ligamento periodontal, polpa radicular ou região medular o que irá comprometer o valor real do tamanho da lesão periapical.

Em relação ao **threshold** para visualização do tecido ósseo, é importante definir, em primeiro lugar, qual **threshold** refere-se à conversão de uma imagem microtomográfica binária mostrando apenas o que deve e o que não deve ser interpretado como tecido mineralizado. Estes valores são baseados em uma escala de cinza (Grauer et al.¹², 2009) que pode variar de 0 (branco) a 255 (preto) (Philips³² 2000). Os valores de **threshold** escolhidos pelo operador devem ser capazes de representar com precisão o verdadeiro tamanho do objeto (Schlueter et al.³⁹, 2008) para evitar valores não verdadeiros da lesão periapical.

Considerando (1) a falta de informação na literatura atual sobre os parâmetros empregados para análise da lesão periapical por meio de micro-CT em ratos e camundongos e a falta de padronização destes parâmetros e, (2) a falta de evidência científica que mostre que a micro-CT é um método preciso para avaliar o volume da lesão periapical em ratos e camundongos, os objetivos do presente trabalho foram:

- Realizar uma revisão sistemática de literatura sobre os parâmetros de aquisição, reconstrução e análise da lesão periapical induzida em ratos e camundongos. Além disso, ilustrar o efeito da variação destes parâmetros (tamanho do voxel, filtros **beam hardening correction, smoothing, gray dataset**, plano de orientação, ROI e **threshold**) em imagens microtomográficas de hemimandíbulas com lesão periapical induzida em primeiros molares inferiores de camundongos (Publicação 1);
- Avaliar a acurácia da micro CT na análise do volume da lesão periapical induzida em dentes de camundongos empregando como padrão ouro para

comparação os valores de volume obtidos por estereologia aplicada a dados histológicos (Publicação 2).

2 PUBLICAÇÃO 1

Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review*

N.G. Kalatzis-Sousa¹, R. Spin-Neto², A. Wenzel², M. Tanomaru-Filho¹, G. Faria¹

¹ *Department of Restorative Dentistry, Araraquara School of Dentistry, UNESP Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil;* ² *Oral Radiology, Department of Dentistry, Aarhus University, Aarhus, Denmark.*

*This is the pre-peer reviewed **version of the following article**: "Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review", which has been published in final form at [<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.12633/pdf>] in © 2016 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd.

A autorização para o uso do artigo nesta tese encontra-se no Anexo A e no Anexo B

Abstract

The aim was to undertake a systematic review of the literature regarding the acquisition-, reconstruction-, and analysis parameters of micro-computed tomography (micro-CT) for the assessment of periapical lesions in rats and mice, and to illustrate the effect of variation in these parameters. PubMed database was searched from 2000 to January 2015 (English-language publications) for reports on the use of micro-CT to evaluate periapical lesions in rats and mice. QUADAS criteria were used to rate the quality of the studies. To illustrate the effect of variations in acquisition-, reconstruction-, and analysis parameters on images of periapical lesions, micro-CT examination of two hemi-mandibles of mice, with periapical lesions around the first molar was undertaken. Twenty-one studies were identified, which analyzed periapical lesions in rats or mice using micro-CT. According to the QUADAS, no study was classified as high-, seven were classified as moderate-, and 14 as low quality. The effect of variation in parameters was that voxel size may interfere with image sharpness, reconstruction may interfere with image sharpness and contrast, and inadequate plane orientation may alter the size of the periapical lesion. Non-personalized ROIs resulted in areas that were not part of the periapical lesion. Changing the limits of the threshold for bone-tissue visualization increased lesion size. There is no defined protocol for acquiring and analyzing micro-CT images of periapical lesions in rats and mice. Further, acquisition-, reconstruction-, and analysis parameters are not adequately explained, which may compromise the scientific impact of the studies.

Keywords: mice, periapical periodontitis, rats, X-Ray micro-tomography.

Introduction

Periapical lesions are caused by bacterial invasion of the root canal system (Ricucci & Siqueira 2010), which results in inflammation, leading to destruction of periapical tissues (Stashenko *et al.* 1998, Nair 2004). Rats and mice have been widely used in studies assessing the pathogenesis and development of experimentally induced periapical lesions (Sousa *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014). In such animal models, periapical bone resorption may be validated by histological evaluation (Sun *et al.* 2014), conventional and digital radiography (Teixeira *et al.* 2011), and by means of micro-computed tomography (micro-CT) (Rittling *et al.* 2010).

However, the digital and conventional radiographic examinations are not fully suitable for imaging of teeth in rats and mice, due to their small size and the jaw anatomy. Histological evaluation is considered the gold standard method for assessing periapical lesions (von Stechow *et al.* 2003). Nevertheless, this method is time-consuming and leads to sample destruction (Balto *et al.* 2000).

Micro-CT may therefore be an important tool for research involving periapical bone lesions in small animals (von Stechow *et al.* 2003). It provides high-resolution images (Cavanaugh *et al.* 2004) and permits the assessment of periapical lesions in a multi-planar fashion (von Stechow *et al.* 2003). Micro-CT provides two- (2D) and three-dimensional (3D) images of the sample (Yang *et al.* 2014), and it is a non-invasive method (Balto *et al.* 2000). Several studies have used micro-CT to assess the area and volume of periapical lesions in rats and mice (Kang *et al.* 2013, Yang *et al.* 2014). According to the literature, micro-CT images can be used to evaluate periapical bone destruction, providing results, which are equivalent to those assessed by means of histology (gold standard) (Balto *et al.* 2000). Micro-CT has thus been considered an important diagnostic validation method for studies based on small-animal models

(Schambach *et al.* 2010). However, there is limited information in the current literature on the standardization of important parameters, which must be selected before the micro-CT examination, such as data acquisition and reconstruction, and the eventual analysis of the images for periapical lesion assessment. This may lead to inaccurate measurements (area and volume) of the periapical lesion, compromising the scientific impact of the findings.

To provide an overview of the literature, the main objective of this study was to conduct a systematic review regarding the acquisition-, reconstruction-, and analysis parameters of micro-CT for the assessment of periapical lesions in rats and mice. A secondary objective was to illustrate the effect of variation in these parameters (voxel size, smoothing filter, beam-hardening correction, gray-scale data set adjustment, orientation plane, region-of-interest (ROI), and threshold for bone-tissue visualization) on images of two hemi-mandibles of mice, with periapical lesions in the first molars.

Review

Literature search and systematic review

Electronic literature search included PubMed database from 2000 to January 2015 for reports on the use of micro-CT for the evaluation of periapical lesions in rats and mice. The search was limited to studies written in the English language. In the keyword search, the following combinations were used: ("periapical lesion (s)" OR "periradicular lesion (s)" OR "periapical periodontitis" OR "periapical bone destruction" OR "periradicular bone destruction" OR "endodontic pathology") AND (mice OR mouse OR rat) AND (μ CT OR micro CT OR micro-CT OR microtomography OR "microCT scan" OR "microcomputed tomography" OR "micro-computed tomography" OR "micro-computed tomographic").

Studies, which measured periapical lesions in rats and mice by micro-CT, qualified for inclusion. Data extraction included information regarding the (1) quantity and species of the animals, (2) parameters for image acquisition (voxel size, kilovoltage, current, filter thickness and type, rotation, rotation step, exposure time, scanning time, and frame averaging), (3) parameters used for image reconstruction (smoothing, ring artefact reduction, beam-hardening correction and gray-scale data set definition), (4) parameters used for periapical lesion analysis (orientation plane, plane used for measurement, ROI definition, threshold for bone-tissue visualization, measurement of area or volume of the periapical lesion), and (5) use of a reference method considered as the gold standard.

Each included study was classified as of high, moderate, or low quality, based on the QUADAS criteria (Whiting *et al.* 2003, Whiting *et al.* 2011). All evaluated items are shown in table 1. All studies were screened by three reviewers, and data extraction was verified separately by all authors.

Table 1 Assessment of study quality according to QUADAS

High quality	<ul style="list-style-type: none">• The description and the sample selection were clearly described? (QUADAS items 1, 2)• The gold standard was present? The method was used for all samples regardless of the results? (items 3, 4, 5 and 6)• The index test is not part of the gold standard? (item 7)• Was the execution of the index test described in sufficient detail to permit replication of the test? (item 8)• Was the execution of the reference standard described in sufficient detail to permit its replication? (item 9)• Evaluators were blinded to results of micro CT test and gold standard? (items 10, 11)
Moderate quality	<ul style="list-style-type: none">• Studies which did not fit the high quality criteria, but included a gold standard
Low quality	<ul style="list-style-type: none">• Studies which did not fit the moderate quality criteria <hr/>

Illustrating the effect of variation in acquisition-, reconstruction-, and analysis parameters

Due to the lack of standardized information regarding the micro-CT method in the selected studies, parameters with reference to acquisition (voxel size), reconstruction (smoothing filter, beam-hardening correction, and gray-scale data set), and analysis (orientation plane, ROI definition, and threshold for bone-tissue visualization) of the images were changed in some illustrative samples, in order to show the effect on lesion display in the micro-CT images.

Obtaining the specimens

To allow the acquisition of images in which the variation of these parameters could be shown, we induced periapical lesions on the right mandibular first molars of two mice (C57BL/6 wild-type, 8 week-old, male, weighing 23 g), according to the technique described by Sousa *et al.* (2014). Following the induction, a waiting period of 14 days was respected for the periapical lesion development. After this period, the animals were euthanized using anesthetic overdose, and the right hemi-mandible specimens were resected and preserved in 10% formalin solution. This protocol was approved by **the University's Animal Research Ethics Committee** under the protocol number 45/2014.

Variation of acquisition parameters (voxel size)

We performed the volumetric micro-CT data acquisition of the mouse hemi-mandible specimens in a SkyScan 1176 unit (SkyScan 1176 *in vivo*, Skyscan, Kontich, Belgium), using a 0.5 mm aluminum filter, exposure time of 300 ms, scan time of 50 minutes,

rotation of 180°, frame averaging of 3, rotation step of 0.5°, kilovoltage of 80 kV, current of 300 μ A, and diverse voxel sizes (35, 18, or 9 μ m).

Variation of reconstruction parameters (smoothing filter, beam-hardening correction, and gray-scale data set)

The acquired micro-CT volumes were exported to the software NRecon (Skyscan, Kontich, Belgium) and reconstructed using **“adequate”** (as suggested by the manufacturer: 1% smoothing filter, 0% beam-hardening correction, 1% ring artefact reduction, and gray-scale data set of 0.000-0.091); and **“inadequate”** (from subjective image observation: 5% smoothing filter, 100% beam-hardening correction, 1% ring artefact reduction, and gray-scale data set of 0.024-0.155) parameters.

Variation of analysis parameters (orientation plane, ROI definition, and threshold for bone-tissue visualization)

After reconstruction, the images were oriented **“adequately”** (standard orientation plane) or **“inadequately”** (changed orientation plane) tilted in the axial, coronal and sagittal planes. To obtain the standard orientation in the sagittal plane, the cervical opening of the mandibular first molar distal canal and apical foramen were aligned with the X-axis, while in the coronal plane, the long axis of the distal root was aligned parallel to the Z-axis. In the axial plane, the mesial and distal root canals of the first molar were aligned with the Z-axis, keeping the two canals parallel to it. The Y-axis was not used for orientation. Irrespective of orientation, the coronal, sagittal, and axial planes are kept perpendicular to one another. Changes in orientation of sagittal, axial, and coronal planes were done to obtain images **with “inadequate orientation”**. To

achieve this “inadequate orientation”, each plane was tilted 30 degrees from the previously defined adequate orientation, one plane at a time.

The images in the sagittal plane with standard orientation were exported to the software CTAn (Skyscan, Kontich, Belgium), and the effect of diversely shaped ROIs (rectangular, polygonal, round, and personalized), threshold range, and upper limit (0/40, 0/50, 0/60, 0/70) on the visualization of the periapical lesion was shown.

The images obtained with diverse voxel sizes, reconstruction parameters, orientation planes, ROIs, and threshold range were saved in BMP format to illustrate the variation of these parameters on images of a periapical lesion.

Results

Results from the systematic review

The search strategy yielded 128 publications in PubMed. The initial screening of the studies was conducted using their titles and abstracts, but when these were unclear, the full text was read. The reviewers independently evaluated the studies, and the results were discussed among them. Figure 1 details the search strategy.



PRISMA 2009 Flow Diagram

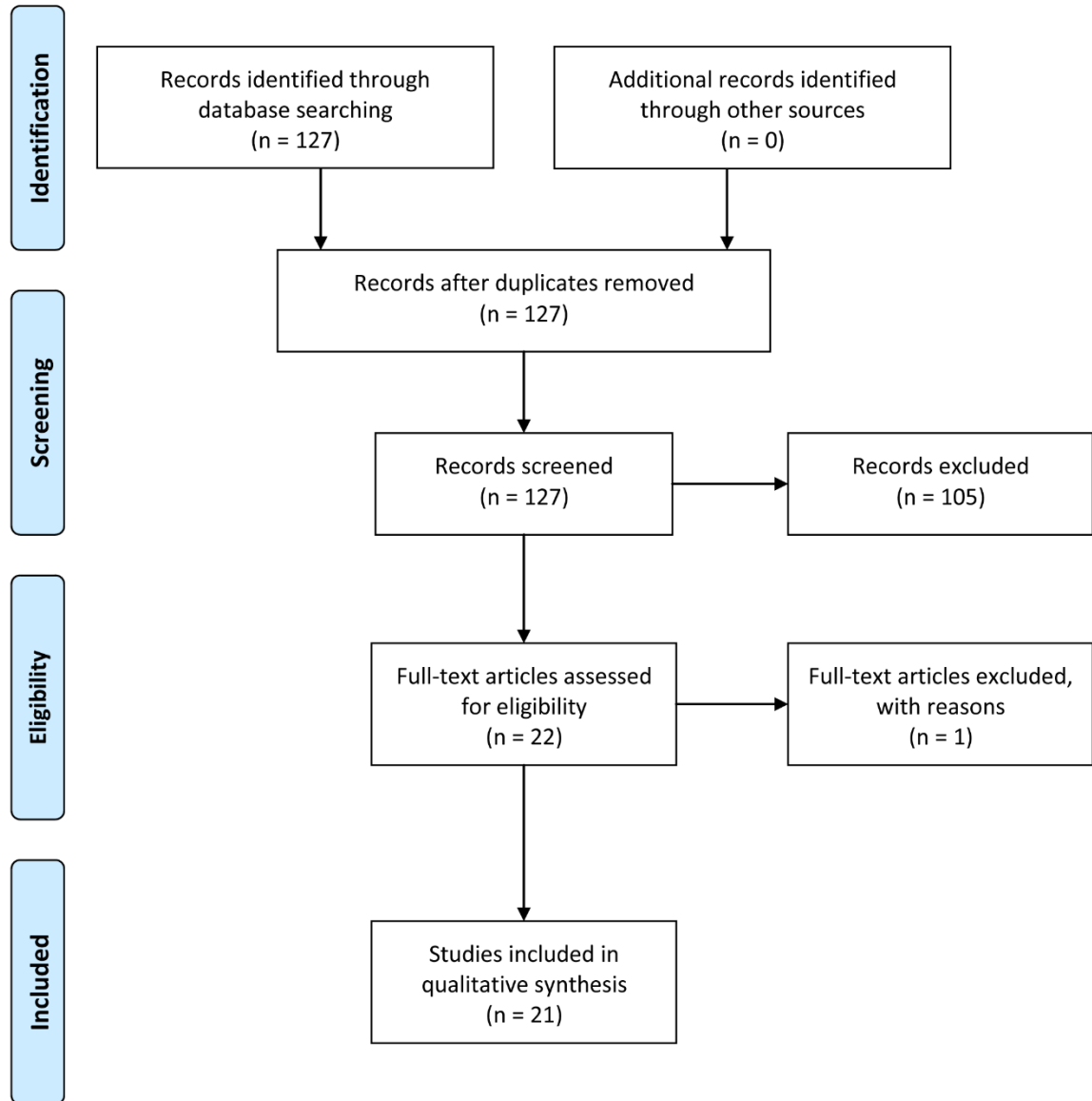


Figure 1 Prisma flow diagram.

Screening yielded 22 citations, which potentially met the inclusion criteria, but one study was excluded because it had not measured the periapical lesion (Wei *et al.* 2013). Therefore, 21 studies were selected using micro-CT to evaluate periapical lesions, 18 in mice and 3 in rats. Sample characteristics in the selected studies are shown in table 2.

Table 2 Summary of sample characteristics of included studies

Study	Sample characteristic				
	Type of animal	Sex	Age (weeks)	Number of animals	Measurement (area or volume)
Balto <i>et al.</i> 2000	mouse	male	11	7	area (mm ²)
Sasaki <i>et al.</i> 2000	mouse	nd	7	nd	area (mm ²)
Balto <i>et al.</i> 2001	mouse	male	11	7	area (mm ²)
Balto <i>et al.</i> 2002	mouse	male	11	7	area (mm ²)
von Stechow <i>et al.</i> 2003	mouse	male	11	7	area (mm ²) and volume (mm ³)
Sasaki <i>et al.</i> 2004	mouse	nd	nd	nd	area (mm ²)
Foschi <i>et al.</i> 2006	mouse	male	6-8	37	area (mm ²)
Leshem <i>et al.</i> 2008	mouse	nd	6-12	80	area (mm ²)
Oseko <i>et al.</i> 2009	mouse	male	6	nd	volume (mm ³)
Rittling <i>et al.</i> 2010	mouse	female/male	6-12	nd	area (mm ²)
McAbee <i>et al.</i> 2012	mouse	female/male	10	nd	area (pixel ²)
AlShwaimi <i>et al.</i> 2013	mouse	male	8	nd	area (mm ²)
Gao <i>et al.</i> 2013	mouse	female	6	21	volume (%)
Kang <i>et al.</i> 2013	mouse	male	28	35	area (%) and volume (mm ³)
Ma <i>et al.</i> 2013	mouse	male	7-8	21	volume (%)
Sousa <i>et al.</i> 2014	mouse	male	7-8	25	area (%)
Sun <i>et al.</i> 2014	rat	male	nd	50	volume (mm ³)
Tang <i>et al.</i> 2014	rat	nd	nd	10	volume (%)
Wan <i>et al.</i> 2014	mouse	nd	8	10	area (µm ²)
Yang <i>et al.</i> 2014	rat	nd	nd	28	area (mm ²) e volume (mm ³)
de Oliveira <i>et al.</i> 2015	mouse	nd	nd	12	area (pixel ²) and volume (pixel ³)

(nd = no data)

As regards the acquisition parameters, the type of filter (e.g., Al) was cited in two studies (Oseko *et al.* 2009, Sousa *et al.* 2014), however, only one reported filter thickness (e.g. 0.5 mm) (Sousa *et al.* 2014). Six studies cited the voltage used (Balto *et al.* 2002, Oseko *et al.* 2009, Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014, de Oliveira *et al.* 2015), and four stated the current (Oseko *et al.* 2009, Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014). Three out of these four studies, which reported the current, did it using the wrong unit – milli-amperage (mA) instead of micro-amperage (μ A). This is probably due to typo-errors not noticed by the peer-reviewers (Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014). Four studies described the total time of scanning (Balto *et al.* 2000, Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, de Oliveira *et al.* 2015), three the exposure time (Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014); and 18 specified the voxel size, which ranged from 10 to 37 μ m (Balto *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, Balto *et al.* 2001, Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, Sasaki *et al.* 2004, Foschi *et al.* 2006, Leshem *et al.* 2008, Oseko *et al.* 2009, AlShwaimi *et al.* 2013, Gao *et al.* 2013, Kang *et al.* 2013, Ma *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Tang *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014, de Oliveira *et al.* 2015).

The reconstruction parameters such as smoothing filter, beam-hardening correction, ring artefact reduction, and gray-scale data set were not specified in any of the 21 studies selected for this review.

Sixteen studies mentioned at least one parameter used for the analysis of the periapical lesions (Balto *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, Foschi *et al.* 2006, Leshem *et al.* 2008, Oseko *et al.* 2009, Rittling *et al.* 2010, McAbee *et al.* 2012, Gao *et al.* 2013, Kang *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014, de Oliveira *et al.* 2015). Only one study mentioned the orientation of the micro-CT images (Kang *et al.* 2013). Twelve studies

used the sagittal plane for the measurement of periapical lesions (Balto *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, von Stechow *et al.* 2003, Foschi *et al.* 2006, Leshem *et al.* 2008, Oseko *et al.* 2009, Rittling *et al.* 2010, McAbee *et al.* 2012, Gao *et al.* 2013, Kang *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014), four studies used the axial (Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, Oseko *et al.* 2009, Kang *et al.* 2013), and one used the coronal plane (Oseko *et al.* 2009). Two studies mentioned the use of a type of ROI denominated "automatically selected" (Sun *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014); and another the use of "semiautomatic contouring algorithm" (von Stechow *et al.* 2003), both without defining these terms. One study mentioned the use of a "contouring tool" (Gao *et al.* 2013) for selecting the region of interest and another described an "elliptical" ROI (de Oliveira *et al.* 2015). Four studies mentioned the use of "global thresholding" and "fixed thresholding" (von Stechow *et al.* 2003, Gao *et al.* 2013, Sun *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014), however, no study actually defined the threshold range or upper limit used.

Information about image acquisition and analysis protocols in the selected studies are shown in tables 3 and 4, respectively. Based on analysis of the QUADAS criteria, no article was classified as of high quality, while seven were considered of moderate quality (Balto *et al.* 2000, Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014), and 14 were considered to be of low quality (Sasaki *et al.* 2000, Balto *et al.* 2001, Sasaki *et al.* 2004, Foschi *et al.* 2006, Leshem *et al.* 2008, Oseko *et al.* 2009, Rittling *et al.* 2010, McAbee *et al.* 2012, AlShwaimi *et al.* 2013, Gao *et al.* 2013, Kang *et al.* 2013, Ma *et al.* 2013, Tang *et al.* 2014, de Oliveira *et al.* 2015).

Table 3 Summary of the image acquisition protocols used in the included studies

Study	Voxel size (μm)	kV	Current	Filter thickness and type	Rotation	Rotation step	Exposure time (ms)	Scanning time	Frame averaging
Balto <i>et al.</i> 2000	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	approx. 6h	nd
Sasaki <i>et al.</i> 2000	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Balto <i>et al.</i> 2001	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Balto <i>et al.</i> 2002	17	60	nd	nd	nd	nd	nd	4-6.5h	nd
von Stechow <i>et al.</i> 2003	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	approx. 6h	nd
Sasaki <i>et al.</i> 2004	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Foschi <i>et al.</i> 2006	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Leshem <i>et al.</i> 2008	32	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Oseko <i>et al.</i> 2009	37.4	225	1000 μA	Al	nd	nd	nd	nd	nd
Rittling <i>et al.</i> 2010	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
McAbee <i>et al.</i> 2012	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AlShwaimi <i>et al.</i> 2013	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Gao <i>et al.</i> 2013	12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kang <i>et al.</i> 2013	12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ma <i>et al.</i> 2013	12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sousa <i>et al.</i> 2014	17.4	80	300 μA	0.5mm Al	nd	nd	300	nd	nd
Sun <i>et al.</i> 2014	34.4	70	114 μA	nd	nd	nd	300	nd	nd
Tang <i>et al.</i> 2014	17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Wan <i>et al.</i> 2014	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Yang <i>et al.</i> 2014	34.4	70	114 μA	nd	nd	nd	300	nd	nd
de Oliveira <i>et al.</i> 2015	17	100	nd	nd	nd	nd	nd	approx. 4h	nd

kV = kilovoltage, μA = microamperage, nd = no data

Table 4 Summary of the image analyzing parameters used in the included

Studies	Image analysis protocol			
	Orientation plane	Measurement plane	ROI	Threshold definition
Balto <i>et al.</i> 2000	automatic positioning	sagittal	nd	nd
Sasaki <i>et al.</i> 2000	nd	sagittal	nd	nd
Balto <i>et al.</i> 2001	nd	nd	nd	nd
Balto <i>et al.</i> 2002	nd	axial	nd	FT
von Stechow <i>et al.</i> 2003	nd	sagittal and axial	SA	GT
Sasaki <i>et al.</i> 2004	nd	nd	nd	nd
Foschi <i>et al.</i> 2006	nd	sagittal	nd	nd
Leshem <i>et al.</i> 2008	nd	sagittal	nd	nd
Oseko <i>et al.</i> 2009	nd	sagittal, coronal, and axial	nd	nd
Rittling <i>et al.</i> 2010	nd	sagittal	nd	nd
McAbee <i>et al.</i> 2012	nd	sagittal	nd	nd
AlShwaimi <i>et al.</i> 2013	nd	nd	nd	nd
Gao <i>et al.</i> 2013	parallelism roots and planes	sagittal	CT	GT
Kang <i>et al.</i> 2013	nd	sagittal and axial	nd	nd
Ma <i>et al.</i> 2013	nd	nd	nd	nd
Sousa <i>et al.</i> 2014	nd	sagittal	nd	nd
Sun <i>et al.</i> 2014	nd	nd	AS	GT
Tang <i>et al.</i> 2014	nd	nd	nd	nd
Wan <i>et al.</i> 2014	nd	sagittal	nd	nd
Yang <i>et al.</i> 2014	nd	nd	AS	GT
de Oliveira <i>et al.</i> 2015	nd	nd	elliptical	nd

SA = semiautomatic contouring algorithm; FT = fixed thresholding; GT = global thresholding; AS = automatic selected; CT = contouring tool; nd = no data.

Results from the illustrative sample

Acquisition parameters

Figure 2 shows images of the right mandibular first molar region in one of the mice specimens, acquired using voxel sizes of 35, 18, and 9 μm . Subjective evaluation of these images reveals that the larger the voxel size, the lower the sharpness of the reconstructed image.

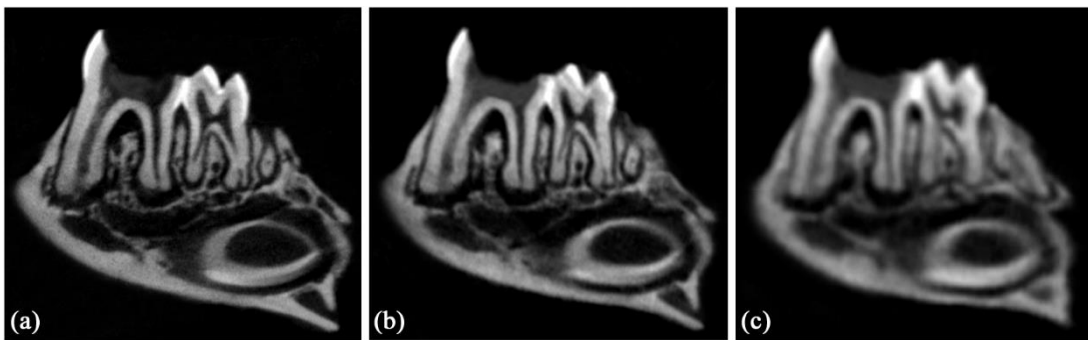


Figure 2 Images of the right mandibular 1st molar of a mouse specimen acquired with voxel sizes of 9 (a), 18 (b), and 35 μm (c).

Reconstruction parameters

Figure 3 shows the result of applying “adequate” and “inadequate” reconstruction parameters to one of the mice specimens. When the values for parameters such as smoothing filter, beam-hardening correction, and gray-scale data set are inadequately selected, there may be distortion of the object margins, presence of radiopaque artefacts, altered contrast of the image, and alteration in the assessed size of the periapical lesion.

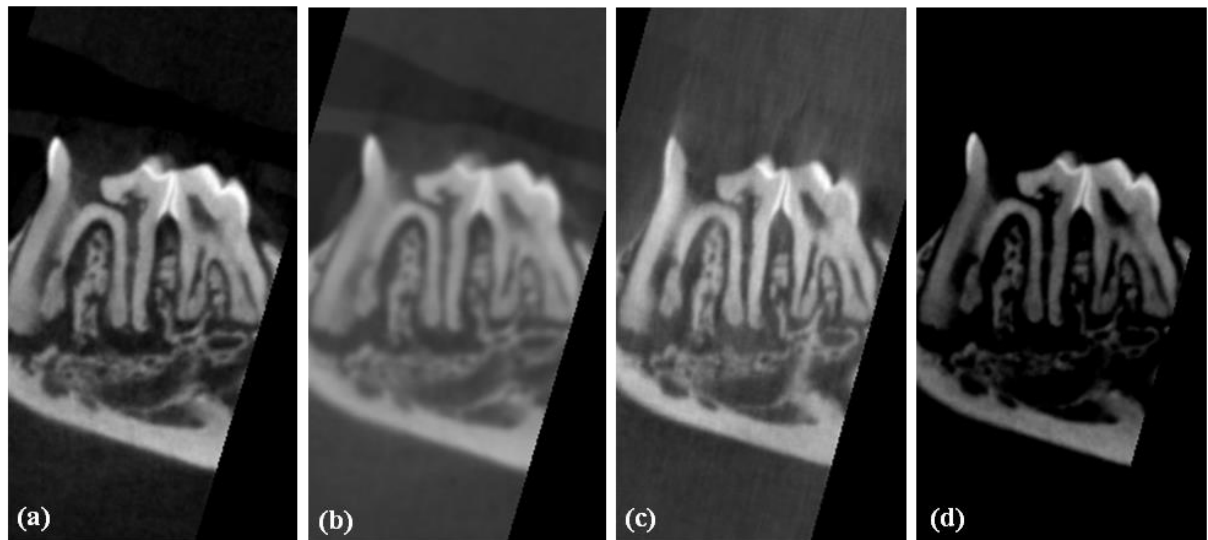


Figure 3 Images of the right mandibular 1st molar of a mouse specimen after the use of “adequate” reconstruction parameters (a), and images with distortion of edges, presence of radiopaque artefacts, and increased aspects of the periapical lesion, due to “inadequate” correction of the parameters smoothing filter (b), beam-hardening (c), and gray-scale data set (d), respectively.

Analysis parameters

Figure 4 shows the orientation applied to one of the mice specimens, using the X- and Z-axes to obtain the desired positions (standard orientation) in the three planes.

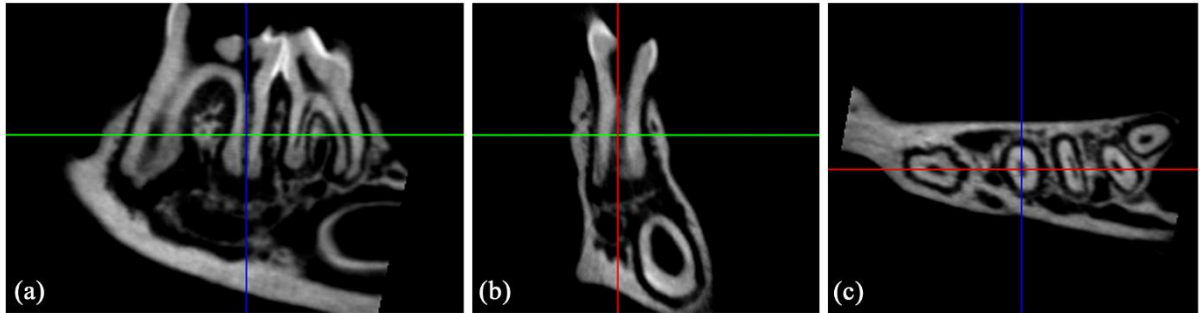


Figure 4 Standard image orientation in three planes (a - sagittal, b - coronal, c - axial). Green line represents the Y-axis, blue the X-axis, and red the Z-axis.

Figure 5 shows how the “inadequate” orientation of each of the planes interferes with the size of the periapical lesion. One should notice that when the position of the sagittal plane was altered, the periapical lesion increased in size in the coronal and axial planes. Alteration in the axial plane increased the periapical lesion size in the sagittal and coronal planes. When altering the coronal plane this led to increase of the lesion in the axial plane and reduction of the lesion in the sagittal plane.

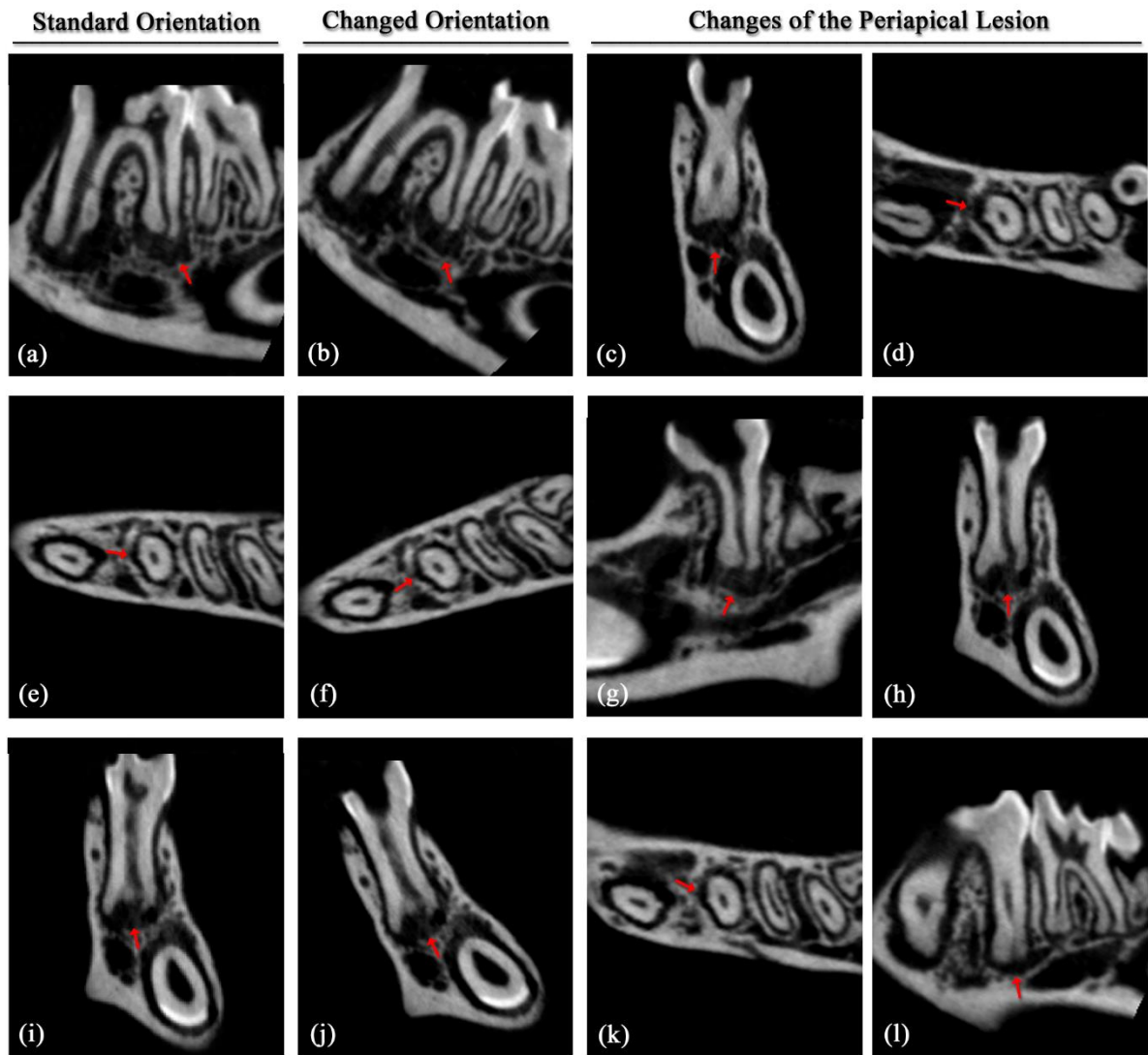


Figure 5 Images of the right mandibular 1st molar of a mouse specimen in the sagittal (a, b, g, and l), axial (e, f, k, and d), and coronal (i, j, c, and h) planes. Images a, e, and i represent a standard orientation method in each of the planes. Alteration of orientation in the sagittal (b), axial (f), and coronal (j) planes resulted in alterations in the periapical lesion size visualized in the different planes (c and d, g and h, k and l). It should be noticed that when the position of the sagittal plane (b) is altered, the periapical lesion increases in size in the coronal (c) and axial (d) planes. Alteration in the axial plane (f) increases the periapical lesion size in the sagittal (g) and coronal (h) planes. When altering the coronal plane (j) this leads to increase of the lesion in the axial plane (k) and reduction of the lesion in the sagittal plane (l). Arrows indicate the periapical lesion in the distal root.

Figure 6 shows the diverse shapes of the ROI and the impact on the measurement of a periapical lesion. One should notice that the rectangular, polygonal, and round ROIs include structures that do not form part of the periapical lesion, such as the periodontal ligament, root pulp, and medullary region, while the personalized ROI delimits only the periapical lesion.

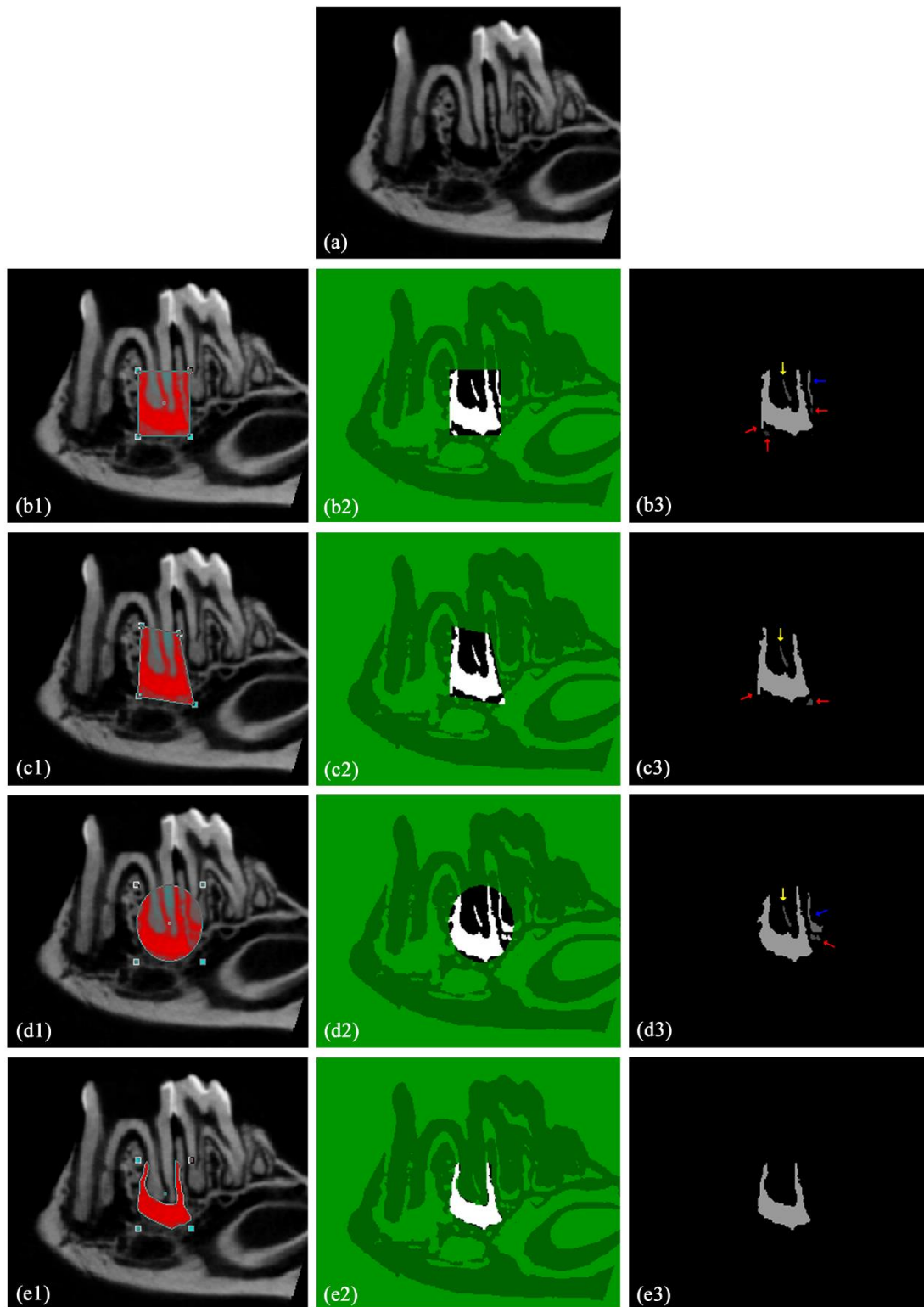


Figure 6 Image of the original periapical lesion in the right mandibular 1st molar of a mouse specimen (a). Illustration of the use of rectangular (b1), polygonal (c1), round (d1), and personalized ROIs (e1) involving the periapical lesion of the distal root. Area selected by the diverse ROIs (b2, c2, d2, e2, b3, c3, d3, and e3) involving the periapical lesion and areas that do not form part of the lesion, such as the periapical ligament of the second molar (blue arrow - b3 and d3), root pulp (yellow arrow - b3, c3, and d3) and medullary region (red arrow - b3, c3, and d3).

Figure 7 exemplifies the use of diverse threshold values. One should notice that, as threshold range widens and upper limit increases (0/40, 0/50, 0/60, 0/70), the size of the periapical lesion also increases, which may lead to an incorrect assessment.

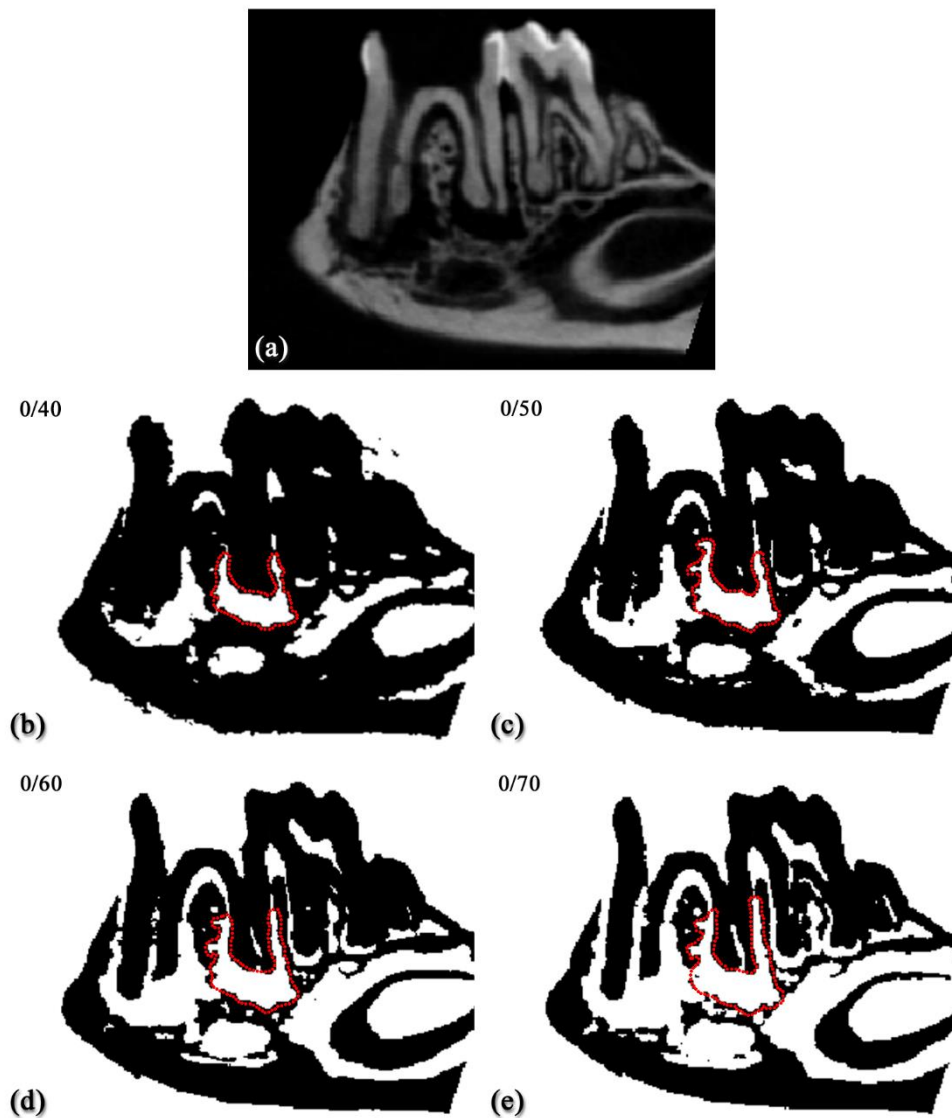


Figure 7 Images obtained using different thresholds for bone-tissue visualization. Original image of the periapical lesion in the sagittal plane (a). Binary images with threshold ranges of 0/40 (b), 0/50 (c), 0/60 (d), 0/70 (e). One should notice the increase in the periapical lesion of the distal root of the 1st molar (traced) as the threshold range widens and the upper limit increases.

Discussion

The parameters used in the various stages of micro-CT image acquisition, reconstruction, and analysis may have a direct influence on the final characteristics of the image (van Vlijmen *et al.* 2011) and on the outcome of analyses. However, in the literature, the description of these parameters is scarce, and they seem to have been set almost arbitrarily, when micro-CT imaging was used for the evaluation of periapical lesions in rats and mice.

Most of these parameters are already well known for the users of other 3D imaging methods (e.g., the plane orientation issue in micro-CT-evaluation dedicated software is somewhat similar to that of CT- and CBCT-evaluation dedicated software), but others, such as frame averaging (regarding image acquisition), ROI definition and the threshold for bone-tissue visualization range and limits (regarding image analysis) are specific to micro-CT.

As it can be seen from the results section, of the 21 studies included in the current literature review, only 18 cited at least one of the parameters selected for image acquisition (Balto *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, Balto *et al.* 2001, Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, Sasaki *et al.* 2004, Leshem *et al.* 2008, Oseko *et al.* 2009, AlShwaimi *et al.* 2013, Gao *et al.* 2013, Kang *et al.* 2013, Ma *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2014, Sun *et al.* 2014, Tang *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014, de Oliveira *et al.* 2015). Among the parameters, the voxel size, kilovoltage, current, scanning time, exposure time, and filtering settings were those most commonly listed.

The voxel size is defined by its height, width, and depth, and the voxels in micro-CT imaging are generally isotropic (the dimensions X, Y, and Z are equal) (Hatcher 2010, Depalle *et al.* 2013). The voxel size of an image in 3D is equivalent to the pixel size in 2D images (Spin-Neto *et al.* 2013). The structural details of a

tomographic image are directly related to the voxel size (Yeni *et al.* 2005, Spin-Neto *et al.* 2013). The smaller the voxel size, the higher the resolution of the image (Ballrick *et al.* 2008). Small voxel sizes generate more sections and consequently, more precise extraction of data (Chadwick & Lam 2010, Spin-Neto *et al.* 2013). Smaller voxel sizes will also lead to less severe superimposition of anatomic structures (Spin-Neto *et al.* 2011). As was subjectively assessed in the present study, voxel sizes of 9 and 18 μm lead to better resolution and sharpness of the images than a voxel size of 35 μm . One could speculate that, due to the fact that in the images acquired with a voxel size of 35 μm , the bone and root margins are less sharply displayed, variations in periapical lesion measurements could be the result.

On the other hand, tomographic images acquired with smaller voxels demand a longer scanning time (Palomo *et al.* 2008) and higher exposure to radiation (Ballrick *et al.* 2008, Davies *et al.* 2012). A longer scanning time increases the time for image reconstruction (Kamburođlu & Kursun 2010), time for conducting the experiment, and the time that the animal needs to be anesthetized. High doses of radiation could lead to severe systemic impairment of the animals (Willekens *et al.* 2010). However, there are no studies evaluating the influence of the voxel size on the precision of periapical lesion measurement in small animals.

Moreover, kV, current, filter (Ludlow *et al.* 2006, Palomo *et al.* 2008), rotation (Lennon *et al.* 2011, Cook *et al.* 2015), and rotation step (Willekens *et al.* 2010) may also influence the radiation dose. In tomography, the lower the kV and current values, the lower the radiation output (Ludlow *et al.* 2006, Palomo *et al.* 2008), increasing image noise (Zarb *et al.* 2015).

Filtering during acquisition is directly connected with kV and current. Thicker filters are related to increased kV and current, as well as longer scanning and exposure

times.(SkyScan) The use of a copper filter, as an example, reduces the radiation dose by approximately 14% (Palomo *et al.* 2008).

Regarding X-ray tube rotation during scanning, this can be partial (180°) or complete (360°). For cone beam computed tomography (CBCT), complete rotation leads to longer exposure time, radiation dose, higher image resolution, and number of sections (Lennon *et al.* 2011, Cook *et al.* 2015). The literature states that the use of a partial rotation (180°) can lead to 50-73% radiation dose reduction compared to a complete rotation (360°) (Cook *et al.* 2015). However, both 360° and 180° CBCT rotation geometries may yield similar accuracies in the detection of artificial bone lesions (Durack *et al.* 2011, Lennon *et al.* 2011). No information regarding this parameter for micro-CT images was found in the literature. It is important to mention that, while for CBCT the X-ray source rotates, in micro-CT the sample is rotated while the X-ray source is static, which could lead to differences among the two imaging methods regarding rotation geometry (Bouxsein *et al.* 2010). Regarding the rotation step, it is known that it is inversely proportional to image resolution (Abudurexiti *et al.* 2010, Willekens *et al.* 2010, Sharir *et al.* 2011). However, this involves the same previously cited examination dynamics (higher exposure time, radiation dose, image resolution, and number of sections) (Willekens *et al.* 2010).

Concerning frame averaging in micro-CT imaging, this refers to the number of times each section (image projection) is repeated when the final 3D data set is constructed as a tomographic volume (Bouxsein *et al.* 2010). The only information available in the literature refers to the fact that image noise can be reduced by increasing frame averaging, but this comes at the trade-off of a longer scan time with higher radiation exposure (Bouxsein *et al.* 2010, Göttinger *et al.* 2011, SkyScan 2011).

In this review, differences in kV, current and scanning time values were observed in the included studies, as well as the absence of information on filter, rotation, rotation step, frame averaging and exposure time, in all or a large portion of the articles. After the acquisition process, the images need to be reconstructed, using the parameters beam-hardening correction, ring artefact reduction, smoothing filter, and gray-scale data set definition with the purpose of reducing or eliminating artefacts/noise present in the acquired images (Van Geet *et al.* 2000, Van Geet & Swennen 2001).

Beam-hardening occurs when the X-ray beam passes through a high-density object, promoting the appearance of radiopaque areas that are truly non-existent in the object (Schulze *et al.* 2010, Naranjo *et al.* 2011). Ring artefacts are ring-like structures caused by inadequate calibration of the detector; however, perfect calibration is not always possible, thus producing these artefacts (Kyriakou *et al.* 2009). In micro-CT, ring artefacts may dramatically increase when increasing image resolution, since this would increase the effects of a non-optimal unit calibration (Sijbers & Postnov 2004). Smoothing serves to soften the edges of the voxels (Lee 1983, Huang *et al.* 2012). It will maintain the shape and clarity of the edges, (Lee 1983) smoothing out the interface between two tissues (Boyd & Müller 2006). The gray-scale data set is used to correct contrast, allowing visualization of the different levels of gray (Philips 2000).

Information about the values of these parameters must be reported, because they could improve or impede visualization of the images and consequently affect the evaluation and measurement of structures. Moreover, when these values are not stated, this may make it difficult to reproduce the methodology. In this review, none of the selected articles reported the reconstruction parameters.

Orientation of the reconstruction image planes may influence the analysis of periapical lesions, as shown in our illustrations. Depending on orientation, “inadequate” images may be created (Spin-Neto *et al.* 2011), which may show a larger or smaller periapical lesion than the true size. In this review, only one article had described how the micro-tomographic images were oriented (Kang *et al.* 2013). In that study, the long axis of the distal root of the mandibular first molar was used as reference, keeping the coronal and sagittal planes parallel. Periapical lesions may be measured in the coronal, axial and sagittal planes. The majority of the articles used the sagittal plane (Balto *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, von Stechow *et al.* 2003, Foschi *et al.* 2006, Leshem *et al.* 2008, Oseko *et al.* 2009, Rittling *et al.* 2010, McAbee *et al.* 2012, Gao *et al.* 2013, Kang *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014) and only four used the axial and coronal planes (Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, Oseko *et al.* 2009, Kang *et al.* 2013). However, it is unknown whether the plane used to measure affects the outcome of the periapical lesion volume.

Periapical lesions may be measured as area in two planes (Balto *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, Balto *et al.* 2001, Balto *et al.* 2002, von Stechow *et al.* 2003, Sasaki *et al.* 2004, Foschi *et al.* 2006, Leshem *et al.* 2008, Rittling *et al.* 2010, McAbee *et al.* 2012, AlShwaimi *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014, de Oliveira *et al.* 2015) or volume (von Stechow *et al.* 2003, Oseko *et al.* 2009, Gao *et al.* 2013, Kang *et al.* 2013, Ma *et al.* 2013, Sun *et al.* 2014, Tang *et al.* 2014, Yang *et al.* 2014, de Oliveira *et al.* 2015). For the measurement of area, sections from the central region of the root, which simultaneously show the coronal, middle and apical thirds of the root, apical foramen and alveolar bone, are generally used (Sousa *et al.* 2014). According to Spin-Neto *et al.* (2011), the ideal is to measure the volume and not the area of the

object, because measuring the area of the central part of the object may lead to incorrect results, due to irregularities in the shape of the object.

To measure the volume of the periapical lesion, the ROI and threshold values must be selected. However, no article clearly explained how these two parameters were set. The ROI definition in micro-CT dedicated software is normally accomplished by using pre-determined shapes (e.g., squares, rectangles, circles), which will delineate the region-of-interest in each 2D section of the micro-CT data set and further will be combined to provide a volume (e.g., cube, cylinder, sphere). However some ROI shapes, such as the rectangular, square, elliptical, round, and polygonal may include areas beyond the periapical lesion, such as the periodontal ligament, root pulp or medullary region, as we have illustrated. This may compromise the true periapical lesion size. On the other hand, the personalized ROI allows manual delimitation of the periapical lesion and probably provides a more accurate size of the periapical lesion.

Regarding the threshold for bone-tissue visualization, it is important to define, first, that such threshold refers to the conversion of a micro-CT image to a binary image showing only what is and what is not to be interpreted as mineralized tissue. In other **words, the threshold is a type of “filter” applied to obtain a binary image. Thresholds** are normally described as a range of gray-values. This range is used to define the threshold of what should not be considered at all in the analysis (values below the lower limit of the range), and what is/is not to be considered as mineralized tissue (values above the upper limit of the range, e.g., bone, and values located within the range limits are considered to represent other tissues, e.g., soft tissues). A threshold range is based on the gray-scale distribution (Grauer *et al.* 2009), which may range from 0 (black) to 255 (white) (Phillips 2000). The outcome (binary) image presents areas with gray-values within the range of the binary threshold selection in white, while

the areas outside this selection will be shown in black. Diverse thresholds may be applied to distinguish various mineralized tissue densities (Grauer *et al.* 2009). However, no software predefines specific values for different types of tissues (Spin-Neto *et al.* 2011), such as enamel, dentin, and bone. Therefore, an operator-selected threshold must be able to represent the true size of the study object in the binary outcome image, and must take the reconstructed image as a basis (Schlueter *et al.* 2008). **The most widely used technique for threshold definition is “global thresholding”**, and it is based on histogram analysis, in which a Hounsfield unit value is chosen, and voxels above this value are marked as bone (Waarsing *et al.* 2004). One could also speculate on the possibility of working not using merely binary images, but also including intermediate intervals in the pre-determined range to be able to differentiate among more than one type of mineralized tissue (e.g., bone, enamel, dentin) in the assessment. No studies were found that mentioned this possibility.

Therefore, we may affirm that no article advocated a complete protocol for image acquisition, reconstruction, or analysis of periapical lesions in small animals. According to the QUADAS criteria, no article was classified as high quality, and the majority was classified as being of low quality. The main reasons were the lack of information with regard to the parameters used in image acquisition and reconstruction, and in periapical lesion analysis, in addition to the lack of histological analysis (gold standard).

We suggest that future articles should provide a detailed description of the micro-tomographic parameters used for obtaining the images and analyzing periapical lesions in small animals.

Conclusion

From the assessed studies, it is clear that there is no defined protocol for acquiring and analyzing micro-CT images of periapical lesions in rats and mice. Further, acquisition-, reconstruction-, and analysis parameters are not adequately explained, which may compromise the reproducibility and the scientific impact of the studies.

References

- Abudurexiti A, Kameda M, Sato E *et al.* (2010) Demonstration of iodine K-edge imaging by use of an energy-discrimination X-ray computed tomography system with a cadmium telluride detector. *Radiological Physics and Technology* **3**, 127-35.
- AlShwaimi E, Berggreen E, Furusho H *et al.* (2013) IL-17 receptor A signaling is protective in infection-stimulated periapical bone destruction. *The Journal of Immunology* **191**, 1785-91.
- Ballrick JW, Palomo JM, Ruch E, Amberman BD, Hans MG (2008) Image distortion and spatial resolution of a commercially available cone-beam computed tomography machine. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* **134**, 573-82.
- Balto K, Müller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P (2000) Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *Journal of Dental Research* **79**, 35-40.
- Balto K, Sasaki H, Stashenko P (2001) Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infection and Immunity* **69**, 744-50.
- Balto K, White R, Mueller R, Stashenko P (2002) A mouse model of inflammatory root resorption induced by pulpal infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **93**, 461-8.

- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**, 1468-86.
- Boyd SK, Müller R (2006) Smooth surface meshing for automated finite element model generation from 3D image data. *Journal of Biomechanics* **39**, 1287-95.
- Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD (2004) In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Molecular Imaging* **3**, 55-62.
- Chadwick JW, Lam EW (2010) The effects of slice thickness and interslice interval on reconstructed cone beam computed tomographic images. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **110**, e37-42.
- Cook VC, Timock AM, Crowe JJ, Wang M, Covell DA Jr. (2015) Accuracy of alveolar bone measurements from cone beam computed tomography acquired using varying settings. *Orthodontics & Craniofacial Research* **18**, 127-36.
- Davies J, Johnson B, Drage N (2012) Effective doses from cone beam CT investigation of the jaws. *Dento Maxillo Facial Radiology* **41**, 30-6.
- de Oliveira KM, Silva RA, Küchler EC, Queiroz AM, Nelson Filho P, da Silva LA (2015) Correlation Between Histomorphometric and Micro-computed Tomography Analysis of Periapical Lesions in Mice Model. *Ultrastructural Pathology* **8**, 1-5.
- Depalle B, Chapurlat R, Walter-Le-Berre H, Bou-Saïd B, Follet H (2013) Finite element dependence of stress evaluation for human trabecular bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **18**, 200-12.
- Durack C, Patel S, Davies J, Wilson R, Mannocci F (2011) Diagnostic accuracy of small volume cone beam computed tomography and intraoral periapical

- radiography for the detection of simulated external inflammatory root resorption. *International Endodontic Journal* **44**, 136-47.
- Foschi F, Izard J, Sasaki H *et al.* (2006) Treponema denticola in disseminating endodontic infections. *Journal of Dental Research* **85**, 761-5.
- Gao B, Chen W, Hao L *et al.* (2013) Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. *Journal of Dental Research* **92**, 180-6.
- Götzinger E, Pircher M, Baumann B *et al.* (2011) Speckle noise reduction in high speed polarization sensitive spectral domain optical coherence tomography. *Optics Express* **19**, 14568-85.
- Grauer D, Cevidanes LS, Proffit WR (2009) Working with DICOM craniofacial images. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* **136**, 460-70.
- Hatcher DC (2010) Operational principles for cone-beam computed tomography. *The Journal of the American Dental Association* **141**, 3S-6S.
- Huang W, Tan ZM, Lin Z *et al.* (2012) A semi-automatic approach to the segmentation of liver parenchyma from 3D CT images with Extreme Learning Machine. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* **2012**, 3752-5.
- Kamburoğlu K, Kursun S (2010) A comparison of the diagnostic accuracy of CBCT images of different voxel resolutions used to detect simulated small internal resorption cavities. *International Endodontic Journal* **43**, 798-807.
- Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T *et al.* (2013) Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 1631-40.
- Kyriakou Y, Prell D, Kalender WA (2009) Ring artifact correction for high-resolution micro CT. *Physics in Medicine and Biology* **54**, N385-91.

- Lee JS (1983) Digital Image Smoothing and the Sigma Filter. *Computer Vision Graphics and Image Processing* **24**, 255-69.
- Lennon S, Patel S, Foschi F, Wilson R, Davies J, Mannocci F (2011) Diagnostic accuracy of limited-volume cone-beam computed tomography in the detection of periapical bone loss: 360 degrees scans versus 180 degrees scans. *International Endodontic Journal* **44**, 1118-27.
- Leshem O, Kashino SS, Goncalves RB *et al.* (2008) Th1 biased response to a novel Porphyromonas gingivalis protein aggravates bone resorption caused by this oral pathogen. *Microbes and Infection* **10**, 664-72.
- Ludlow JB, Davies-Ludlow LE, Brooks SL, Howerton WB (2006) Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT. *Dento Maxillo Facial Radiology* **35**, 219-26.
- Ma J, Chen W, Zhang L *et al.* (2013) RNA interference-mediated silencing of Atp6i prevents both periapical bone erosion and inflammation in the mouse model of endodontic disease. *Infection and Immunity* **81**, 1021-30.
- McAbee J, Li Q, Yu H, Kirkwood KL (2012) Sexual dimorphism in periapical inflammation and bone loss from mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 deficient mice. *Journal of Endodontics* **38**, 1097-100.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG (2009) PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Journal of clinical epidemiology* **62**, 1006-12.
- Nair PN (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **15**, 348-81.

- Naranjo V, Lloréns R, Alcañiz M, López-Mir F (2011) Metal artifact reduction in dental CT images using polar mathematical morphology. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **102**, 64-74.
- Oseko F, Yamamoto T, Akamatsu Y *et al.* (2009) IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiology and Immunology* **53**, 287-94.
- Palomo JM, Rao PS, Hans MG (2008) Influence of CBCT exposure conditions on radiation dose. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **105**, 773-82.
- Phillips D (2000) *Image Processing in C - Analysing and Enhancing Digital Images*, Second Edition edn; USA.
- Ricucci D, Siqueira JF Jr. (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics* **36**, 1277-88.
- Rittling SR, Zetterberg C, Yagiz K *et al.* (2010) Protective role of osteopontin in endodontic infection. *Immunology* **129**, 105-14.
- Sasaki H, Balto K, Kawashima N *et al.* (2004) Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**, 106-10.
- Sasaki H, Hou L, Belani A *et al.* (2000) IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *The Journal of Immunology* **165**, 3626-30.
- Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA (2010) Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods* **50**, 2-13.

- Schlueter B, Kim KB, Oliver D, Sortiropoulos G (2008) Cone beam computed tomography 3D reconstruction of the mandibular condyle. *The Angle Orthodontist* **78**, 880-8.
- Schulze RK, Berndt D, d'Hoedt B (2010) On cone-beam computed tomography artifacts induced by titanium implants. *Clinical Oral Implants Research* **21**, 100-07.
- Sharir A, Ramniceanu G, Brumfeld V (2011) High resolution 3D imaging of ex-vivo biological samples by micro CT. *Journal of Visualized Experiments*.
- Sijbers J, Postnov A (2004) Reduction of ring artefacts in high resolution micro-CT reconstructions. *Physics in Medicine and Biology* **49**, N247-53.
- SkyScan (2011) SkyScan 1176: in vivo X-Ray microtomograph: instruction manual [WWW document]. URL <http://umanitoba.ca/faculties/medicine/units/cacs/sam/media/1176UserManual.pdf>. Kontich: SkyScan: 2011.
- Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G (2014) Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Archives of Oral Biology* **59**, 944-53.
- Spin-Neto R, Gotfredsen E, Wenzel A (2013) Impact of voxel size variation on CBCT-based diagnostic outcome in dentistry: a systematic review. *Journal of Digital Imaging* **26**, 813-20.
- Spin-Neto R, Marcantonio E Jr., Gotfredsen E, Wenzel A (2011) Exploring CBCT-based DICOM files. A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. *Journal of Digital Imaging* **24**, 959-66.
- Stashenko P, Teles R, D'Souza R (1998) Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **9**, 498-521.

- Sun Z, Wang L, Peng B (2014) Kinetics of glycogen synthase kinase (GSK)3beta and phosphorylated GSK3beta (Ser 9) expression in experimentally induced periapical lesions. *International Endodontic Journal* **47**, 1107-16.
- Tang Y, Zhou X, Gao B *et al.* (2014) Modulation of Wnt/beta-catenin signaling attenuates periapical bone lesions. *Journal of Dental Research* **93**, 175-82.
- Teixeira RC, Rubira CM, Assis GF, Lauris JR, Cestari TM, Rubira-Bullen IR (2011) Radiological and histopathological evaluation of experimentally-induced periapical lesion in rats. *Journal of Applied Oral Science* **19**, 500-4
- Van Geet M, Swennen R (2001) Quantitative 3D-fracture analysis by means of microfocus X-ray computer tomography (mu CT): an example from coal. *Geophysical Research Letters* **28**, 3333-6.
- Van Geet M, Swennen R, Wevers M (2000) Quantitative analysis of reservoir rocks by microfocus X-ray computerised tomography. *Sedimentary Geology* **132**, 25-36.
- van Vlijmen OJ, Rangel FA, Bergé SJ, Bronkhorst EM, Becking AG, Kuijpers-Jagtman AM (2011) Measurements on 3D models of human skulls derived from two different cone beam CT scanners. *Clinical Oral Investigations* **15**, 721-7.
- von Stechow D, Balto K, Stashenko P, Müller R (2003) Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *Journal of Endodontics* **29**, 252-6.
- Waarsing JH, Day JS, Weinans H (2004) An improved segmentation method for in vivo microCT imaging. *Journal of Bone and Mineral Research* **19**, 1640-50.
- Wan C, Yuan G, Yang J *et al.* (2014) MMP9 Deficiency Increased the Size of Experimentally Induced Apical Periodontitis. *Basic Research-Biology* **40**, 1-7.

- Wei S, Kawashima N, Suzuki N *et al.* (2013) Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. *Australian Endodontic Journal* **39**, 164-70.
- Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J (2003) The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Medical Research Methodology* **3**, 25.
- Willekens I, Buls N, Lahoutte T *et al.* (2010) Evaluation of the radiation dose in micro-CT with optimization of the scan protocol. *Contrast Media & Molecular Imaging* **5**, 201-7.
- Yang S, Zhu L, Xiao L *et al.* (2014) Imbalance of Interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ Regulatory T-cell Dynamics in Rat Periapical Lesions. *Journal of Endodontics* **40**, 56-62.
- Yeni YN, Christopherson GT, Dong XN, Kim DG, Fyhrie DP (2005) Effect of microcomputed tomography voxel size on the finite element model accuracy for human cancellous bone. *Journal of Biomechanical Engineering* **127**, 1-8.
- Zarb F, McEntee MF, Rainford L (2015) A multi-phased study of optimisation methodologies and radiation dose savings for head CT examinations. *Radiation Protection Dosimetry* **163**, 480-90.

3 PUBLICAÇÃO 2

Acurácia da microtomografia computadorizada na análise do volume da lesão periapical induzida experimentalmente em camundongos

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia da microtomografia computadorizada (micro-CT) na análise do volume da lesão periapical induzida em dentes de camundongos empregando como padrão ouro para comparação os valores de volume obtidos por meio de estereologia aplicada a dados histológicos. A lesão periapical foi induzida nos primeiros molares inferiores de camundongos. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados, as hemimandíbulas removidas (n=28) e escaneadas em microtomógrafo (Skyscan 1176 in vivo, Kontich, Bélgica). Para análise histológica da lesão periapical, as hemimandíbulas foram descalcificadas e submetidas ao processamento histotécnico. A área da lesão periapical da raiz distal dos molares foi mensurada em cortes histológicos empregando o programa Image J. A partir dos valores obtidos, foi calculado o volume da lesão periapical por meio do princípio de Cavalieri e, em seguida, foi aplicado o fator de correção ao volume obtido. Para calcular o volume de lesão periapical na micro-CT, as imagens microtomográficas no plano sagital foram anguladas seguindo a angulação das imagens obtidas nos cortes histológicos. O volume da lesão periapical foi mensurado empregando o programa CTAn (Skyscan). Todas as medidas foram realizadas por um avaliador previamente calibrado em dois momentos distintos. Os dados foram analisados por meio do teste t pareado e do coeficiente de correlação intraclassa (ICC) empregando nível de significância de 5%. Os resultados preliminares mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o volume da lesão periapical obtido por ambas as metodologias (p=0,642). O ICC (0,956) indicou alta concordância entre o volume da lesão periapical obtido histologicamente e por micro-CT. Com base nos resultados preliminares pode-se concluir que a micro-CT pode ser considerada uma metodologia precisa para a análise do volume da lesão periapical em camundongos. Em uma etapa futura as mensurações do volume da lesão periapical serão efetuadas por outros dois avaliadores calibrados.

Palavras-chave: Periapical periodontite. Microtomografia por raio-X. Endodontia. Roedores.

Introdução

Lesão periapical é uma alteração dos tecidos periapicais causada pela infecção bacteriana persistente no sistema de canais radiculares (Ricucci, Siqueira²⁴, 2010). As proteínas liberadas por essas bactérias estimulam uma resposta do hospedeiro causando inflamação e destruição dos tecidos mineralizados e não mineralizados da região periapical (Graves et al.¹⁰, 2011). Ratos e camundongos têm sido amplamente utilizados em estudos da patogênese da lesão periapical experimentalmente induzida (Matsui et al.¹⁹, 2011; Wang et al.³⁵, 2011; Garlet et al.⁹, 2010; Silva et al.²⁶, 2011; Maciel et al.¹⁷, 2012; Ma et al.¹⁶, 2013; Sousa et al.²⁸, 2014; Rider et al.²⁵, 2016). A reabsorção óssea periapical em camundongos pode ser avaliada por meio de histologia, radiografias digital e convencional e microtomografia computadorizada (micro-CT).

Embora a histologia seja considerada padrão ouro para análise da lesão periapical (von Stechow et al.³⁴, 2003), o processamento histológico necessita de longos períodos para execução, leva à destruição da amostra e permite a análise de lesão periapical em um único plano (Balto et al.³, 2000; von Stechow et al.³⁴, 2003).

Na radiografia as imagens bidimensionais não permitem análise da espessura do osso e do volume da lesão periapical (von Stechow et al.³⁴, 2003), além de haver sobreposição de estruturas anatômicas o que pode gerar imagem imprecisa da lesão (de Paula-Silva et al.⁷, 2009). Além disso, as radiografias em pequenos roedores, como camundongos, se tornam inviáveis para a análise da lesão periapical devido ao tamanho reduzido das estruturas anatômicas destes animais (Kalatzis-Sousa et al.¹⁴, 2016).

Já a micro-CT permite detectar e quantificar a reabsorção óssea periapical em camundongos (Kalatzis-Sousa et al.¹⁴, 2016) devido a alta resolução de imagens (Cavanaugh et al.⁴, 2004). Esta metodologia requer tempo reduzido quando comparado ao tempo necessário para a obtenção de cortes histológicos, não leva a destruição da amostra (Balto et al.³, 2000) e permite a análise da lesão periapical em diferentes planos como coronal, sagital e axial (Sun et al.³¹, 2014; Yang et al.³⁸, 2014). Além disso, o exame microtomográfico

pode ser realizado em animais vivos permitindo análise da evolução da doença ou de tratamentos realizados (Vande Velde et al.³³, 2016).

Estudos empregando a micro-CT para avaliar a lesão periapical em ratos e camundongos têm sido relatados na literatura (Balto et al.³, 2000; von Stechow et al.³⁴, 2003; Sun et al.³¹, 2014; Yang et al.³⁸, 2014; Sousa et al.²⁸, 2014; de Oliveira et al.⁶, 2015; Hao et al.¹², 2015). A maioria dos estudos que avaliaram a lesão periapical por meio de micro-CT mensuraram a área da lesão (Balto et al.³, 2000, von Stechow et al.³⁴, 2003; Sousa et al.²⁸, 2014; de Oliveira et al.⁶, 2015) e alguns avaliaram o volume (von Stechow et al.³⁴, 2003; Sun et al.³¹, 2014; Yang et al.³⁸, 2014). De acordo com Spin-Neto et al.²⁹ (2011) o ideal é medir o volume e não a área do objeto, pois a mensuração da área da parte central do objeto pode levar a resultados incorretos devido a irregularidade da forma do objeto.

A literatura tem mostrado que o volume da lesão periapical obtido por meio de micro-CT apresenta alta correlação com a área da lesão mensurada em cortes histológicos (von Stechow et al.³⁴, 2003; Sun et al.³¹, 2014; Yang et al.³⁸, 2014). No entanto, não há evidências científicas que comprovem que a micro-CT é um método preciso para avaliar o volume da lesão periapical em camundongos.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia da micro-CT na análise do volume da lesão periapical induzida experimentalmente em dentes de camundongos, empregando como padrão ouro para comparação valores de volume obtidos por estereologia aplicada a cortes histológicos.

Material e Método

Os protocolos experimentais desse trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (CEUA-FOAr N° 45/2014 – Anexo C). Foram utilizados 14 camundongos *wild-type* (WT) da linhagem C57BL/6, machos (de 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 23 gramas). Os camundongos foram mantidos em gaiolas adequadas com temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar ($55\pm 10\%$) constantes, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água.

Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra para estimar o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) foi calculado de acordo com Zou³⁹ (2012). O tamanho mínimo da amostra com poder do teste de 80% e nível de significância de 5% foi identificado como 26.

Indução da Lesão Periapical

A indução da lesão periapical foi realizada seguindo o protocolo de Sousa et al.²⁸ (2014). Os camundongos foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de Ketamina a 10% (150 mg/kg de peso corporal) e 2% de cloridrato de Xilazina (7,5 mg/kg de peso do corpo) na coxa. A abertura coronária dos primeiros molares inferiores foi realizada pela face oclusal, com broca esférica de aço inoxidável (n° 1/4 - KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP), montada em motor elétrico (Dentec 405 N; Dentec Ind. Com. Ltda, SP). Em seguida, os canais radiculares foram localizados e a polpa removida com uma lima do tipo Kerr 10 (**Les Fils d'Auguste Maillefer S/A, Suíça**) e os canais radiculares permaneceram abertos para a contaminação. Após o período de 14 dias, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. As mandíbulas foram removidas, dissecadas e fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas em temperatura ambiente e mantidas em álcool 70% até o escaneamento microtomográfico.

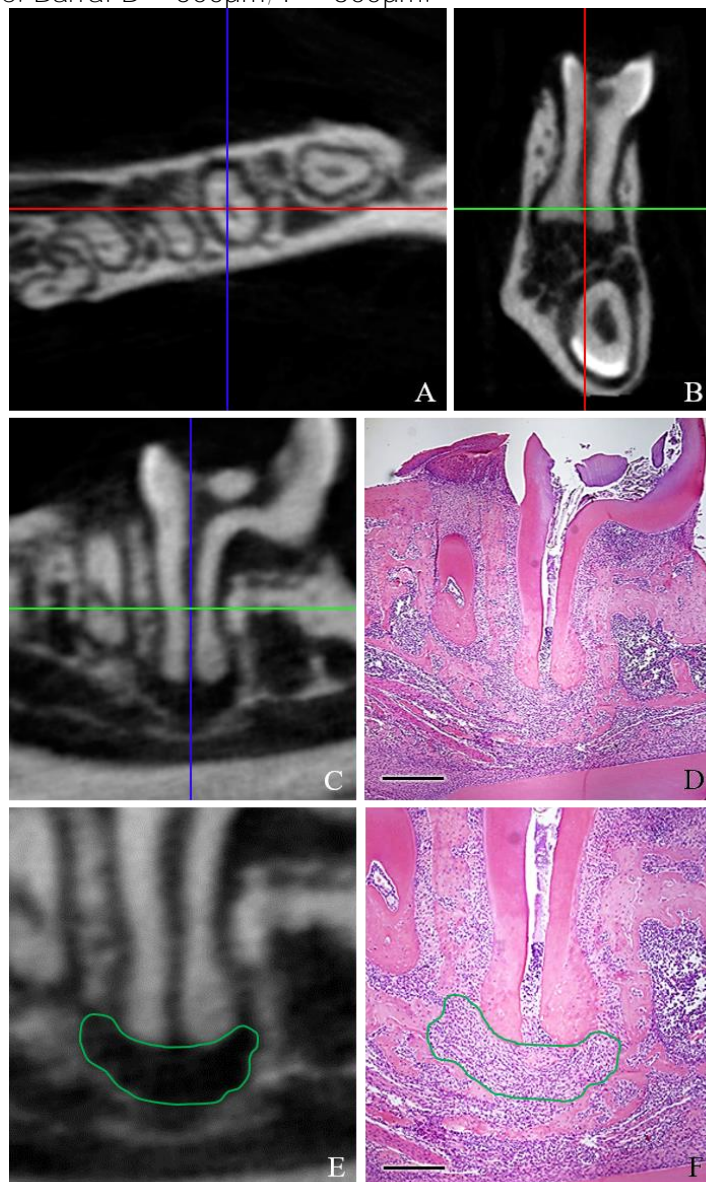
Micro-CT

Cada mandíbula foi separada em duas hemimandíbulas totalizando 28 hemimandíbulas que foram escaneadas em microtomógrafo SkyScan (Skyscan 1176 in vivo, Kontich, Bélgica). Para a seleção dos parâmetros de aquisição foi tomado como base o manual do microtomógrafo que indica o uso de filtro de **alumínio de 0,5mm e voxel de 18µm para tecidos ósseos de camundongos. Por consequência a kilovoltagem (kV), a amperagem e o tempo de exposição foram 50kV, 500µA e 300ms respectivamente (padronização do aparelho).** Foram usados a rotação de 180°, frame de 3 e passos de rotação de 0,5°. Em seguida, as imagens foram transportadas para o programa NRecon v.1.6.6.0 (Skyscan) e reconstruídas usando valores específicos para os parâmetros de smoothing (0%), beam-hardening correction (2%), ring artifact reduction (2%) and gray dataset (0.000000-0.112000). Estes valores foram definidos utilizando a ferramenta "***fine turning...***". que permite avaliar cada valor dos parâmetros de reconstrução possibilitando a seleção da imagem com menor quantidade de

ruídos/ artefatos. No programa Dataviewer, as imagens foram orientadas nos planos coronal, axial e sagital de maneira a obter orientação das imagens microtomográficas semelhante a orientação das imagens histológicas correspondentes. Estas orientações foram realizadas seguindo os eixos X (linha azul), Y (linha verde) e Z (linha vermelha), conforme mostrado na Figura 1. Depois de orientadas, as imagens do plano sagital foram salvas e transportadas para o programa CTAn (Skyscan) para análise do volume da lesão periapical na raiz distal do 1° molar inferior. A seleção dos cortes microtomográficos utilizados para mensuração do volume da lesão periapical foi baseada nos cortes histológicos correspondentes. A quantidade média de imagens/cortes microtomográficos utilizados para cada espécime foi de 36 que corresponderam a extensão de toda a lesão periapical envolvendo a raiz. Não foram selecionados cortes que não mostravam estrutura radicular, pois a área radiolúcida sem presença da raiz como referencial poderia ser confundida com ligamento periodontal. No programa CTAn (Skyscan) foi utilizado a ferramenta "COLOR" para facilitar a visualização e delimitação da margem da lesão periapical por meio do ROI (região de interesse) personalizado. Foram utilizados os valores de **threshold** de 0 e 45 e o valor do volume da lesão periapical em mm³ foi anotado. Todas as medidas foram realizadas por um avaliador previamente calibrado em dois momentos distintos em um intervalo de 2 semanas (Ahlowalia et al.¹, 2013).

Em uma etapa futura as mensurações do volume da lesão periapical serão efetuadas por outros dois avaliadores calibrados.

Figura 1 - Orientação das imagens microtomográficas nos planos axial (A), coronal (B) e sagital (C) obtendo imagens microtomográfica no plano sagital orientada de forma semelhante a imagem histológica correspondente (D). Delimitação da lesão periapical na imagem microtomográfica empregando o ROI (região de interesse) personalizado (E) e delimitação da lesão na imagem do corte histológico correspondente (F) (traçado verde). As linhas verde, azul e vermelho correspondem aos eixos Y, X e Z respectivamente. Barra: D = 500 μ m; F = 300 μ m.



Fonte: Autoria própria

Processamento Histotécnico

Após a reconstrução das imagens microtomográficas, as hemimandíbulas foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 4,13%, em pH 7-7,4, a 6°C trocada semanalmente durante 30 dias. Os espécimes foram submetidos ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (80%, 95% por 30 minutos cada e 100% em quatro trocas de 1 hora cada), diafanizadas em xilol (com 3 banhos de 30 minutos cada) e embebidos em parafina. Os blocos foram cortados longitudinalmente na direção mesio-distal obtendo-se cortes seriados, paralelos de 6µm de toda a extensão da lesão periapical. Para cada espécime foi obtida uma média de 87 cortes histológicos. Os cortes foram fotografados utilizando câmara digital (DP-71, Olympus, Japão) acoplada a um microscópio de luz convencional (BX-51, Olympus, Japão) em aumento de 65x.

A área da lesão periapical de cada corte foi mensurada por meio do programa Image J (1.48h, National Institutes of Health, NIH, Bethesda, Maryland, USA). A quantidade média de cortes mensurados por espécime foi de 29. Optamos por **mensurar a lesão periapical em um corte e “pular” dois cortes para teoricamente utilizar um corte histológico (6µm) para cada corte microtomográfico que apresenta 18µm de espessura. Isto para que o erro do método que ocorre durante as mensurações fosse o mesmo para as duas metodologias (histologia e micro CT).** Todas as medidas foram realizadas em dois momentos distintos com um intervalo de 2 semanas por um avaliador previamente calibrado (Ahlowalia et al.¹, 2013).

O volume da lesão periapical foi calculado utilizando estereologia aplicada aos dados histológicos por meio do princípio de Cavalieri; foi efetuada multiplicação da área da lesão periapical obtida de cada corte histológico pela distância do mesmo, e em seguida, foi somado volume de todos os valores obtendo o volume total da lesão (Raida et al.²³, 2012). Após a obtenção do volume da lesão periapical foi realizado o cálculo e a aplicação do fator de correção (Quester et al.²², 1997). Inicialmente foi calculado a espessura do total dos cortes microtomográficos (ETMCT) e a espessura total dos cortes histológicos (ETH) seguido do cálculo do fator de correção (FC):

$$ETMCT = \text{número total de cortes microtomográficos} \times \text{tamanho do voxel}$$

$$ETH = \text{número total de cortes histológicos} \times \text{espessura do corte histológico}$$

$$FC = \frac{ETMCT}{ETH}$$

O FC foi calculado para cada espécime e em seguida, foi determinado o FC médio. O FC médio de 1,27 foi aplicado ao volume da lesão obtido pelo princípio de Cavalieri. Após a obtenção dos valores finais do volume da lesão periapical estes foram comparados com o volume da lesão periapical obtido por micro-CT.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA.) e SPSS versão 20. O teste t pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre o volume da lesão periapical obtido por meio de micro-CT e por meio de cortes histológicos. O coeficiente de correlação intra-classe (ICC) foi usado para avaliar a reprodutibilidade intraexaminador e a concordância entre os métodos de avaliação do volume da lesão periapical. O modelo estatístico empregado para estimar o ICC foi análise de variância com efeitos mistos (*two-way mixed ANOVA model*). Foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados preliminares

O ICC intraexaminador foi de 0,99 para o volume da lesão periapical obtido em micro-CT e de 0,982 para os valores de volume obtidos nos cortes histológicos. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o volume da lesão periapical obtido por estereologia aplicada a cortes histológicos e por meio de micro-CT ($p=0,642$). O ICC comparando os resultados da mensuração das duas técnicas foi de 0,956 indicando alta concordância entre o volume da lesão periapical obtido em cortes histológicos e por micro-CT (Tabela 1).

Tabela1 - Médias e desvios padrões do volume da lesão periapical (mm³) obtidos por meio de avaliação histológica e microtomográfica, valor de p para o teste t pareado e coeficiente de correlação intraclasse (ICC)

	Histologia	Micro-CT	Histologia vs Micro-CT (valor de p)	Histologia vs Micro-CT (ICC)
Medidas	0,0968 (0,0287)	0,0978 (0,0267)	0,642	0,956

Micro-CT= microtomografia

Fonte: Autoria própria

Discussão

O propósito desse estudo foi avaliar a acurácia da micro-CT na análise do volume de lesões periapicais induzidas em dentes de camundongos empregando como padrão ouro os valores de volume obtidos primeiro de estereologia aplicada a cortes histológicos.

A histologia é o método mais utilizado para avaliação da lesão periapical (de Oliveira et al.⁶, 2015). Contudo, é uma metodologia que permite a avaliação bidimensional da lesão (Balto et al.³, 2000) e em um único plano (Müller et al.²⁰, 1998). Apesar de ser um método bidimensional, a histologia de tecido ósseo tem boa correlação com a arquitetura tridimensional (Thomsen et al.³², 2005) sendo possível obter o volume de estruturas por meio de estereologia aplicada aos dados obtidos em cortes histológicos (Mandarim-de-Lacerda¹⁸, 2003; Thomsen et al.³², 2005).

A estereologia baseada em histomorfometria é considerada padrão ouro para morfometria óssea (Müller et al.²⁰, 1998; Howard, Reed¹³ 2010), sendo considerada mais precisa do que as análises morfométricas bidimensionais (Noorafshan²¹ 2012). O uso da estereologia em estudos quantitativos exige o uso de poucos cortes histológicos para mensuração obtendo-se, mesmo assim, uma boa acurácia (Gundersen e Jensen¹¹ 1987).

No nosso trabalho utilizamos uma média de 29 cortes histológicos para a análise do volume da lesão periapical empregando o do princípio de Cavalieri. De acordo com Gundersen e Jensen¹¹ (1987), de maneira geral, o uso de 10 cortes poderia ser suficiente para a realização da estereologia de objetos irregulares. **No entanto, optamos por mensurar a lesão periapical em um corte histológico e “pular” dois cortes para teoricamente utilizar um corte histológico (6µm) para cada corte microtomográfico que apresenta 18µm de espessura. Isto para que o erro do método** que ocorre durante as mensurações fosse o mesmo para as duas metodologias (histologia e micro CT). Além disso, o uso de uma quantidade maior de cortes histológicos implica em intervalos de cortes menores e conseqüentemente características importantes das estruturas a serem analisadas estarão presentes (West³⁷ 2013), o que pode levar a uma análise mais precisa do espécime (Gundersen e Jensen¹¹ 1987).

O princípio de Cavalieri é um método estereológico (Mandarim-de-Lacerda¹⁸, 2003) usado para calcular o volume de objetos irregulares (Gundersen, Jensen¹¹,

1987), como a lesão periapical. Para a estimativa do volume correto do objeto é necessário que todos os cortes do espécime sejam paralelos entre si, a distância entre os cortes seja conhecida e a posição do primeiro corte seja aleatório (Raida et al.²³, 2012). Estas condições foram respeitadas no presente estudo.

Um fenômeno observado nas amostras submetidas ao processamento histotécnico é a alteração dimensional dos espécimes (Bahr et al.², 1957; Steigman et al.³⁰, 1984; Quester et al.²², 1997; Weisbecker³⁶ 2012). As etapas do processamento histológico como a fixação, desmineralização, desidratação e inclusão levam ao encolhimento do espécime (Bahr et al.², 1957; Steigman et al.³⁰, 1984; Quester et al.²², 1997) que é em torno de 25% para os espécimes submetidos ao processamento histotécnico com inclusão em parafina. Esta distorção pode ser corrigida por meio do uso do fator de correção (Quester et al.²², 1997).

Para a obtenção das imagens microtomográficas e análise da lesão periapical devem ser empregados parâmetros adequados de aquisição, reconstrução das imagens e análise da lesão, uma vez que a escolha de parâmetros inadequados pode levar a valores não verdadeiros da dimensão da lesão periapical (Kalatzis-Sousa et al.¹⁴, 2016). Em nosso estudo esses parâmetros foram padronizados tomando como base o manual do próprio aparelho que indica o uso de filtro de alumínio de 0,5mm e **voxel de 18µm para tecidos ósseos de camundongos. Por consequência a kV, a µA e o tempo de exposição foram 50, 500 e 300ms respectivamente.** Para reduzir o tempo de escaneamento e a radiação foram usados a rotação de 180°, frame de 3 e passos de rotação de 0,5° (SkyScan...²⁷, 2011). A literatura mostra que o uso da rotação parcial (180°) pode levar à redução de 50-73% da dose da radiação em comparação com uma rotação completa (360°) (Cook et al.⁵, 2015). No entanto, ambas as rotações em CBCT podem produzir precisão semelhante na detecção de lesões ósseas artificiais (Durack et al.⁸, 2011; Lennon et al.¹⁵, 2011).

Após a aquisição, as imagens microtomográficas são reconstruídas. O uso de parâmetros inadequados de reconstrução leva a distorção das margens do objeto, a presença de artefatos, alteração do contraste da imagem e por consequência alteração das características da lesão periapical (Kalatzis-Sousa et al.¹⁴, 2016). Em nosso estudo utilizamos os parâmetros 0% de **smoothing**, 2% de **beam-hardening correction**, 2% de **ring artifact reduction** e 0.000-0.112 **gray dataset** que foram os que levaram a imagem com menor quantidade de ruídos/artefatos.

Para a mensuração da lesão periapical foi utilizado o ROI personalizado, ou seja, a delimitação da lesão foi feita manualmente pelo avaliador. Não foram empregados os ROIs não personalizados como exemplo o retangular, redondo ou poligonal, pois estes incluem regiões que não fazem parte da lesão periapical como ligamento periodontal, região medular e canal radicular gerando valores não verdadeiros da dimensão da lesão periapical (Kalatzis-Sousa et al.¹⁴, 2016).

Os resultados do presente estudo mostraram que há uma alta concordância entre o volume da lesão periapical obtido em micro-CT e o volume da lesão obtido por meio de estereologia aplicada a valores histomorfométricos. Na literatura, há estudo que comparou a área da lesão periapical obtida histomorfometricamente com a área da lesão obtida em micro-CT, mostrando alta correlação entre as metodologias (Balto et al.³, 2000). Por outro lado de Oliveira et al.⁶ (2015) encontraram fraca correlação entre a área da lesão periapical obtida histomorfometricamente com a área mensurada em micro-CT. Outros estudos correlacionaram a área da lesão periapical obtida histomorfometricamente com o volume da lesão periapical obtido em micro-CT (von Stechow et al.³⁴, 2003; Sun et al.³¹, 2014; Yang et al.³⁸, 2014; de Oliveira et al.⁶, 2015). A maioria deles encontrou alta correlação entre área mensurada nos cortes histológicos com o volume mensurado na micro-CT (von Stechow et al.³⁴, 2003; Sun et al.³¹, 2014; Yang et al.³⁸, 2014). Apenas de Oliveira et al.⁶ (2015) encontraram fraca correlação entre área da lesão mensurada em cortes histológicos com o volume da lesão obtidos em micro-CT. No entanto, nenhum estudo comparou volume da lesão obtido por cortes histológicos com o volume obtido em micro-CT.

Os resultados preliminares do presente trabalho permitiram concluir que a micro-CT é uma metodologia precisa para a análise do volume da lesão periapical em camundongos. Em etapa futura as mensurações do volume da lesão periapical serão efetuadas por outros dois avaliadores calibrados.

Referências

1. Ahlowalia MS, Patel S, Anwar HM, Cama G, Austin RS, Wilson R, et al. Accuracy of CBCT for volumetric measurement of simulated periapical lesions. *Int Endod J*. 2013; 46(6): 538-46.
2. Bahr GF, Bloom G, Friberg U. Volume changes of tissues in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment. *Exp Cell Res*. 1957; 12(2): 342-55.
3. Balto K, Müller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P. Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *J Dent Res*. 2000; 79(1): 35-40.
4. Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Mol Imaging*. 2004; 3(1): 55-62.
5. Cook VC, Timock AM, Crowe JJ, Wang M, Covell DA, Jr. Accuracy of alveolar bone measurements from cone beam computed tomography acquired using varying settings. *Orthod Craniofac Res*. 2015; 18(1): 127-36.
6. de Oliveira KM, Silva RA, Küchler EC, Queiroz AM, Nelson Filho P, da Silva LA. Correlation between histomorphometric and micro-computed tomography analysis of periapical lesions in mice model. *Ultrastruct Pathol*. 2015; 39(3): 187-91.
7. de Paula-Silva FW, Wu MK, Leonardo MR, da Silva LA, Wesselink PR. Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography scans in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *J Endod*. 2009; 35(7): 1009-12.
8. Durack C, Patel S, Davies J, Wilson R, Mannocci F. Diagnostic accuracy of small volume cone beam computed tomography and intraoral periapical radiography for the detection of simulated external inflammatory root resorption. *Int Endod J*. 2011; 44(2): 136-47.
9. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, et al. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *J Endod*. 2010; 36(2): 244-50.
10. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011 Jan 17; 3. [Epub ahead of print]
11. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987; 147(Pt 3): 229-63.
12. Hao L, Chen W, McConnell M, Zhu Z, Li S, Reddy M, et al. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infect Immun*. 2015; 83(4): 1235-45.
13. Howard CV, Reed MG. *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. 2nd. Ed. Liverpool: QTP; 2010.
14. Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J*. 2016 Mar 19. [Epub ahead of print]
15. Lennon S, Patel S, Foschi F, Wilson R, Davies J, Mannocci F. Diagnostic accuracy of limited-volume cone-beam computed tomography in the detection of periapical bone loss: 360 degrees scans versus 180 degrees scans. *Int Endod J*. 2011; 44(12): 1118-27.

16. Ma J, Chen W, Zhang L, Tucker B, Zhu G, Sasaki H, et al. RNA interference-mediated silencing of *Atp6i* prevents both periapical bone erosion and inflammation in the mouse model of endodontic disease. *Infect Immun*. 2013; 81(4): 1021-30.
17. Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J*. 2012; 45(4): 354-62.
18. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003; 75(4): 469-86.
19. Matsui H, Yamasaki M, Nakata K, Amano K, Nakamura H. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *Int Endod J*. 2011; 44(8): 739-45.
20. Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*. 1998; 23(1): 59-66.
21. Noorafshan A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2014; 196(1): 57-66.
22. Quester R, Schroder R. The shrinkage of the human brain stem during formalin fixation and embedding in paraffin. *J Neurosci Methods*. 1997; 75(1): 81-9.
23. Raida Z, Hundahl CA, Kelsen J, Nyengaard JR, Hay-Schmidt A. Reduced infarct size in neuroglobin-null mice after experimental stroke in vivo. *Exp Transl Stroke Med*. 2012; 4(1): 15.
24. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010; 36(8): 1277-88.
25. Rider D, Furusho H, Xu S, Trachtenberg AJ, Kuo WP, Hirai K, et al. Elevated CD14 (cluster of differentiation 14) and toll-like receptor (TLR) 4 signaling deteriorate periapical inflammation in TLR2 deficient mice. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016; Jun 17.
26. Silva MJ, Sousa LM, Lara VP, Cardoso FP, Junior GM, Totola AH, et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *J Dent Res*. 2011; 90(4): 495-500.
27. SkyScan 1176: in vivo X-Ray microtomograph: instruction manual. [internet] Kontich: SkyScan: 2011; [acesso 2013 jan 10] Disponível em: <http://umanitoba.ca/faculties/medicine/units/cacs/sam/media/1176UserManual.pdf>.]
28. Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol*. 2014; 59(9): 944-53.
29. Spin-Neto R, Marcantonio E, Jr., Gotfredsen E, Wenzel A. Exploring CBCT-based DICOM files. A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. *J Digit Imaging*. 2011; 24(6): 959-66.
30. Steigman S, Weinreb M, Jr., Michaeli Y. Histomorphometric evaluation of the dimensional changes in rat-incisor tissues following histological processing and embedding in paraffin wax and glycol methacrylate. *Arch Oral Biol*. 1984; 29(5): 395-8.

31. Sun Z, Wang L, Peng B. Kinetics of glycogen synthase kinase (GSK)3 β and phosphorylated GSK3 β (Ser 9) expression in experimentally induced periapical lesions. *Int Endod J*. 2014; 47(12): 1107-16.
32. Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc*. 2005; 218(Pt 2): 171-9.
33. Vande Velde G, Poelmans J, De Langhe E, Hillen A, Vanoirbeek J, Himmelreich U, et al. Longitudinal micro-CT provides biomarkers of lung disease that can be used to assess the effect of therapy in preclinical mouse models, and reveal compensatory changes in lung volume. *Dis Model Mech*. 2016; 9(1): 91-8.
34. von Stechow D, Balto K, Stashenko P, Müller R. Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *J Endod*. 2003; 29(4): 252-6.
35. Wang L, Zhang R, Xiong H, Peng B. The involvement of platelet-derived growth factor-A in the course of apical periodontitis. *Int Endod J*. 2011; 44(1): 65-71.
36. Weisbecker V. Distortion in formalin-fixed brains: using geometric morphometrics to quantify the worst-case scenario in mice. *Brain Struct Funct*. 2012; 217(2): 677-85.
37. West MJ. Getting started in stereology. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013; 2013(4): 287-97.
38. Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17 $^{+}$ T-cell and foxp3 $^{+}$ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*. 2014; 40(1): 56-62.
39. Zou GY. Sample size formulas for estimating intraclass correlation coefficients with precision and assurance. *Stat Med*. 2012; 31(29): 3972-81.

4 DISCUSSÃO

Embora considerado padrão ouro para a análise de lesões periapicais (von Stechow et al.⁵⁶, 2003), o método histológico é considerado limitante por se tratar de uma metodologia invasiva e destrutiva na qual a amostra fica inutilizada para que sejam realizadas análises em outros planos (Müller et al.^{29,30}, 1996, 1998). Já a micro CT, metodologia não destrutiva, além de possibilitar a análise em diferentes planos (Balto et al.³, 2000), apresenta como um de seus principais benefícios demandar menor tempo de execução para a obtenção dos dados. Em ambas é possível obter, além do cálculo da área da lesão, o volume da mesma.

Entretanto, não existem evidências científicas, até o presente momento, que comprovem a precisão e eficácia do micro CT para avaliação do volume da lesão periapical em ratos e camundongos. A correlação da área da lesão periapical obtida de cortes histológicos com o volume da lesão obtido de imagens microtomográficas é o que se tem em estudos anteriores já realizados sobre o assunto.

Em função da irregularidade da forma do objeto, Spin-Neto et al.⁴⁵ (2011) indicam que o ideal é realizar a mensuração do volume deste, e não da sua área, pois medir a área da parte central desse objeto pode levar a resultados incorretos.

De acordo com Thomsen et al.⁵¹ (2005), embora seja um método bidimensional, a histologia de tecido ósseo tem boa correlação com a arquitetura tridimensional. É possível, por meio de estereologia aplicada aos cortes histológicos, obter o volume das estruturas (Mandarim-de-Lacerda²⁵, 2003; Thomsen et al.⁵¹, 2005). Esta metodologia é considerada padrão ouro para morfometria óssea (Müller et al.³⁰, 1998; Howard, Reed¹⁶ 2010).

No presente estudo, optou-se por utilizar 1 corte histológico de 6µm para cada corte microtomográfico de 18µm, embora Gundersen e Jensen¹⁴ (1987) mostrem que o uso de 10 cortes seriam suficientes para a realização da estereologia. Enquanto que West⁵⁹ (2013) afirma que o uso de uma quantidade maior de cortes histológicos implica em intervalos de cortes menores e conseqüentemente características importantes das estruturas a serem analisadas estarão presentes.

O princípio de Cavalieri é um método estereológico (Mandarim-de-Lacerda²⁵, 2003) usado para calcular o volume de objetos irregulares (Gundersen, Jensen¹⁴, 1987), como a lesão periapical. De acordo com Raida et al.³³ (2012) a fim de se realizar uma estimativa correta do volume do objeto, é necessário que todos os cortes do espécime sejam paralelos entre si, a distância entre os cortes seja conhecida e a

posição do primeiro corte seja aleatória, condições estas que foram rigorosamente respeitadas no presente estudo.

Quando se realiza uma mensuração de lesão periapical de imagens microtomográficas é necessário o uso de parâmetros que, durante o processo de aquisição, reconstrução e análise das imagens microtomográficas, podem ter influência direta sobre as características finais da imagem (van Vlijmen et al.⁵⁴, 2011).

Na literatura, entretanto, não se encontram informações delimitadoras quanto aos parâmetros utilizados na aquisição das amostras (tipo e a espessura do filtro, **tamanho do voxel, kV, μ A, tempo de exposição e de escaneamento, passos de rotação, *frame***, rotação de 180° ou 360° e tipo de plano - axial, coronal e sagital), na reconstrução das imagens (***smoothing, beam hardening correction, ring artifact reduction and grayscale dataset***) e na análise da lesão periapical (plano de orientação, tipo de ROI - região de interesse e valores de ***threshold***). A definição dos respectivos parâmetros apresentou-se como tendo sido realizada de maneira quase arbitrária, quando imagens microtomográficas são usadas para a avaliação de lesões periapicais em ratos e camundongos. A falta de padronização pode levar à obtenção de diferentes valores de tamanho da lesão periapical e conseqüentemente comprometer a reprodutibilidade e a validade das medidas das imagens (Spin-Neto et al.⁴⁵, 2011).

Assim, na revisão sistemática realizada, mostrou-se que não existe um protocolo definido quanto à aquisição e análise das imagens da lesão periapical em camundongos. Além disso, os parâmetros de aquisição, reconstrução e análise não foram relatados adequadamente nos estudos que avaliaram a lesão periapical, podendo comprometer o impacto científico dos estudos.

No presente estudo, o manual do próprio aparelho foi utilizado como base para padronização desses parâmetros, que indica o uso de filtro de alumínio de 0,5mm **e voxel de 18 μ m para tecidos ósseos de camundongos. Dessa forma, a kV, a μ A e o tempo de exposição foram 50, 500 e 300ms, respectivamente.**

A fim de se reduzir o tempo de escaneamento e a radiação foram usados a rotação de 180°, *frame* de 3 e passos de rotação de 0,5° (SkyScan⁴², 2011). O uso da rotação parcial (180°), de acordo com a literatura, pode levar à redução de 50-73% da dose da radiação em comparação com uma rotação completa (360°) (Cook et al.⁷, 2015). Ambas as rotações, entretanto, em CBCT, podem produzir precisão semelhante na detecção de lesões ósseas artificiais (Durack et al.¹⁰, 2011; Lennon et al.²⁰, 2011).

As imagens microtomográficas são reconstruídas logo após a aquisição. Na revisão sistemática realizada, mostrou-se que o uso de parâmetros inadequados de reconstrução leva à distorção das margens do objeto, a presença de artefatos, alteração do contraste da imagem e por consequência alteração das características da lesão periapical. Assim, no presente estudo, utilizou-se os parâmetros 0% de *smoothing*, 2% de *beam-hardening correction*, 2% de *ring artifact reduction* e 0.000-0.112 *gray dataset* que geraram imagens com menor quantidade de ruídos/artefatos.

ROI personalizado foi utilizado para a mensuração da lesão periapical, ou seja, delimitou-se manualmente a lesão pelo avaliador. ROIs não personalizados como o retangular, o redondo ou o poligonal, não foram empregados, pois na revisão sistemática observou-se que estes incluem regiões que não fazem parte da lesão periapical como ligamento periodontal, região medular e canal radicular, gerando valores não verdadeiros da dimensão da lesão periapical.

Assim, no presente trabalho, analisou-se o volume da lesão periapical por meio de estereologia à partir de cortes histológicos, correlacionando-o com o volume da lesão periapical obtido por microtomografia.

Resultados preliminares demonstraram que a micro CT se apresenta como uma metodologia precisa para a mensuração do volume da lesão periapical em pequenos roedores.

5 CONCLUSÃO

- A revisão da literatura (Publicação 1) mostrou que não há um protocolo definido para a aquisição, reconstrução e análise de imagens microtomográficas da lesão periapical em ratos e camundongos. Além disso, os parâmetros de aquisição, reconstrução e análise não foram relatados adequadamente nos estudos que avaliaram a lesão periapical por meio de micro CT, o que pode comprometer a reprodução e o impacto científico dos estudos.
- **Na "Publicação 2" os resultados preliminares mostraram que a micro-CT é uma metodologia precisa para a análise do volume da lesão periapical em camundongos. Em etapa futura as mensurações do volume da lesão periapical serão efetuadas por outros dois avaliadores calibrados.**

REFERÊNCIAS*

1. Abudurexiti A, Kameda M, Sato E, Abderyim P, Enomoto T, Watanabe M, et al. Demonstration of iodine K-edge imaging by use of an energy-discrimination X-ray computed tomography system with a cadmium telluride detector. *Radiol Phys Technol.* 2010; 3(2): 127-35.
2. Ballrick JW, Palomo JM, Ruch E, Amberman BD, Hans MG. Image distortion and spatial resolution of a commercially available cone-beam computed tomography machine. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008; 134(4): 573-82.
3. Balto K, Müller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P. Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *J Dent Res.* 2000; 79(1): 35-40.
4. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun.* 2001; 69(2): 744-50.
5. Balto K, White R, Mueller R, Stashenko P. A mouse model of inflammatory root resorption induced by pulpal infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93(4): 461-8.
6. Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Mol Imaging.* 2004; 3(1): 55-62.
7. Cook VC, Timock AM, Crowe JJ, Wang M, Covell DA, Jr. Accuracy of alveolar bone measurements from cone beam computed tomography acquired using varying settings. *Orthod Craniofac Res.* 2015; 18(1): 127-36.
8. Davies J, Johnson B, Drage N. Effective doses from cone beam CT investigation of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol.* 2012; 41(1): 30-6.
9. de Oliveira KM, Silva RA, Küchler EC, Queiroz AM, Nelson Filho P, da Silva LA. Correlation between histomorphometric and micro-computed tomography analysis of periapical lesions in mice model. *Ultrastruct Pathol.* 2015; 39(3): 187-91.

*Esta tese está estruturada de acordo com o Guia de Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-normalizacao-marco-2015.pdf>

10. Durack C, Patel S, Davies J, Wilson R, Mannocci F. Diagnostic accuracy of small volume cone beam computed tomography and intraoral periapical radiography for the detection of simulated external inflammatory root resorption. *Int Endod J*. 2011; 44(2): 136-47.
11. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, et al. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *J Endod*. 2010; 36(2): 244-50.
12. Grauer D, Cevidanes LS, Proffit WR. Working with DICOM craniofacial images. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009; 136(3): 460-70.
13. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011 Jan 17; 3. [Epub ahead of print]
14. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987; 147(Pt 3): 229-63.
15. Hao L, Chen W, McConnell M, Zhu Z, Li S, Reddy M, et al. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infect Immun*. 2015; 83(4): 1235-45.
16. Howard CV, Reed MG. *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. 2nd. ed. Liverpool: QTP; 2010.
17. Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J*. 2016 Mar 19. [Epub ahead of print].
18. **Kamburoğlu K, Kursun S. A comparison of the diagnostic accuracy of CBCT images of different voxel resolutions used to detect simulated small internal resorption cavities. *Int Endod J* 2010; 43(9): 798-807.**
19. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res*. 2013; 28(7): 1631-40.
20. Lennon S, Patel S, Foschi F, Wilson R, Davies J, Mannocci F. Diagnostic accuracy of limited-volume cone-beam computed tomography in the detection of periapical bone loss: 360 degrees scans versus 180 degrees scans. *Int Endod J*. 2011; 44(12): 1118-27.

21. Liedke GS, da Silveira HE, da Silveira HL, Dutra V, de Figueiredo JA. Influence of voxel size in the diagnostic ability of cone beam tomography to evaluate simulated external root resorption. *J Endod.* 2009; 35(2): 233-5.
22. Loubele M, Jacobs R, Maes F, Denis K, White S, Coudyzer W, et al. Image quality vs radiation dose of four cone beam computed tomography scanners. *Dentomaxillofac Radiol.* 2008; 37(6): 309-18.
23. Ludlow JB, Davies-Ludlow LE, Brooks SL, Howerton WB. Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and i-CAT. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006; 35(4): 219-26.
24. Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 354-62.
25. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003; 75(4): 469-86.
26. Maret D, Telmon N, Peters OA, Lepage B, Treil J, Inglese JM, et al. Effect of voxel size on the accuracy of 3D reconstructions with cone beam CT. *Dentomaxillofac Radiol.* 2012; 41(8): 649-55.
27. Matsui H, Yamasaki M, Nakata K, Amano K, Nakamura H. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *Int Endod J.* 2011; 44(8): 739-45.
28. McAbee J, Li Q, Yu H, Kirkwood KL. Sexual dimorphism in periapical inflammation and bone loss from mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 deficient mice. *J Endod.* 2012; 38(8): 1097-100.
29. Muller R, Hahn M, Vogel M, Delling G, Ruegsegger P. Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. *Bone.* 1996; 18(3): 215-20.
30. Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone.* 1998; 23(1): 59-66.
31. Palomo JM, Rao PS, Hans MG. Influence of CBCT exposure conditions on radiation dose. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(6): 773-82.

32. Philips D. Image processing in C - analysing and enhancing digital images. 2nd. ed. Kansas: **R & D Publications**; 2000.
33. Raida Z, Hundahl CA, Kelsen J, Nyengaard JR, Hay-Schmidt A. Reduced infarct size in neuroglobin-null mice after experimental stroke in vivo. *Exp Transl Stroke Med.* 2012; 4(1): 15.
34. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36(8): 1277-88.
35. Ritman EL. Small-animal CT - Its difference from, and impact on, clinical CT. *Nucl Instrum Methods Phys Res A.* 2007; 580(2): 968-70.
36. Rittling SR, Zetterberg C, Yagiz K, Skinner S, Suzuki N, Fujimura A, et al. Protective role of osteopontin in endodontic infection. *Immunology.* 2010; 129(1): 105-14.
37. Scarfe WC, Farman AG, Sukovic P. Clinical applications of cone-beam computed tomography in dental practice. *J Can Dent Assoc.* 2006; 72(1): 75-80.
38. Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods.* 2010; 50(1): 2-13.
39. Schlueter B, Kim KB, Oliver D, Sortiroopoulos G. Cone beam computed tomography 3D reconstruction of the mandibular condyle. *Angle Orthod.* 2008; 78(5): 880-8.
40. Sharir A, Ramniceanu G, Brumfeld V. High resolution 3D imaging of ex-vivo biological samples by micro CT. *J Vis Exp.* 2011; (52): pii 2688.
41. Silva MJ, Sousa LM, Lara VP, Cardoso FP, Junior GM, Totola AH, et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 495-500.
42. SkyScan 1176: in vivo X-Ray microtomograph: instruction manual. [internet] Kontich: SkyScan: 2011; [acesso 2013 jan 10] Disponível em: <http://umanitoba.ca/faculties/medicine/units/cacs/sam/media/1176UserManual.pdf>.]
43. Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(9): 944-53.

44. Spin-Neto R, Gotfredsen E, Wenzel A. Impact of voxel size variation on CBCT-based diagnostic outcome in dentistry: a systematic review. *J Digit Imaging*. 2013; 26(4): 813-20.
45. Spin-Neto R, Marcantonio E, Jr., Gotfredsen E, Wenzel A. Exploring CBCT-based DICOM files. A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. *J Digit Imaging*. 2011; 24(6): 959-66.
46. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(4): 498-521.
47. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 78(4): 494-502.
48. Sun Z, Wang L, Peng B. Kinetics of glycogen synthase kinase (GSK)3beta and phosphorylated GSK3beta (Ser 9) expression in experimentally induced periapical lesions. *Int Endod J*. 2014; 47(12): 1107-16.
49. Tang Y, Zhou X, Gao B, Xu X, Sun J, Cheng L, et al. Modulation of Wnt/beta-catenin signaling attenuates periapical bone lesions. *J Dent Res*. 2014; 93(2): 175-82.
50. Teixeira RC, Rubira CM, Assis GF, Lauris JR, Cestari TM, Rubira-Bullen IR. Radiological and histopathological evaluation of experimentally-induced periapical lesion in rats. *J Appl Oral Sci*. 2011; 19(5): 500-4.
51. Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc*. 2005; 218(Pt 2): 171-9.
52. Van Geet M, Swennen R. Quantitative 3D-fracture analysis by means of microfocus X-ray computer tomography (mu CT): an example from coal. *Geophysical Research Letters*. 2001; 28(17): 3333-6.
53. Van Geet M, Swennen R, Wevers M. Quantitative analysis of reservoir rocks by microfocus X-ray computerised tomography. *Sedimentary Geology*. 2000; 132(1-2): 25-36.
54. van Vlijmen OJ, Rangel FA, Bergé SJ, Bronkhorst EM, Becking AG, Kuijpers-Jagtman AM. Measurements on 3D models of human skulls derived from two different cone beam CT scanners. *Clin Oral Investig*. 2011; 15(5): 721-7.

55. Vizzotto MB, Silveira PF, Arus NA, Montagner F, Gomes BP, da Silveira HE. CBCT for the assessment of second mesiobuccal (MB2) canals in maxillary molar teeth: effect of voxel size and presence of root filling. *Int Endod J*. 2013; 46(9): 870-6.
56. von Stechow D, Balto K, Stashenko P, Müller R. Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *J Endod*. 2003; 29(4): 252-6.
57. Wan C, Yuan G, Yang J, Sun Q, Zhang L, Zhang J, et al. MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis. *J Endod*. 2014; 40(5): 658-64.
58. Wang L, Zhang R, Xiong H, Peng B. The involvement of platelet-derived growth factor-A in the course of apical periodontitis. *Int Endod J*. 2011; 44(1): 65-71.
59. West MJ. Getting started in stereology. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013; 2013(4): 287-97.
60. Willekens I, Buls N, Lahoutte T, Baeyens L, Vanhove C, Caveliers V, et al. Evaluation of the radiation dose in micro-CT with optimization of the scan protocol. *Contrast Media Mol Imaging*. 2010; 5(4): 201-7.
61. Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*. 2014; 40(1): 56-62.
62. Zarb F, McEntee MF, Rainford L. A multi-phased study of optimisation methodologies and radiation dose savings for head CT examinations. *Radiat Prot Dosimetry*. 2015; 163(4): 480-90.

ANEXO A – e-mail resposta da Wiley permitindo o uso da Publicação 1 nesta tese de doutorado.

Natália Kalatzis

From: Natália Kalatzis
Sent: quinta-feira, 28 de abril de 2016 17:43
To: 'permissions@wiley.com'
Attachments: WileyWorldBankELA.pdf

Permissions Department
 John Wiley & Sons Inc.

04/28/216

My name is Natália Guimarães Kalatzis Sousa, I am author of the paper " Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G.

Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. Int Endod J. 2016 Mar 19. doi:10.1111/iej.12633".

The paper is part of my doctoral thesis and I want to use the study in my thesis.

In the " EXCLUSIVE LICENSE AGREEMENT TO PUBLISH IN THE JOURNAL - Wiley" (attached), is not clear if I can use in my thesis the full paper like the first time I sent to the International Endodontic Journal. If the answer is yes, how should I proceed? Can I use the full text if I include, in the thesis, the legend: " This is the pre-peer reviewed version of the following article: FULL CITE, which has been published in final form at [Link to final article]"?

It is important to mention that the doctoral thesis will be available in the institutional repository (internet) of my school.

Thanks for your attention,

Natália Kalatzis

-----Original Message-----

From: Wiley Global Permissions [mailto:permissions@wiley.com]
 Sent: terça-feira, 10 de maio de 2016 10:04
 To: Natália Kalatzis
 Subject: RE:

Dear Natália Kalatzis

Thank you for your request.

Permission is granted for you to use the material requested for your thesis/dissertation subject to the usual acknowledgements (author, title of material, title of book/journal, ourselves as publisher) and on the understanding that you will reapply for permission if you wish to distribute or publish your thesis/dissertation commercially. You must also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material; this can be found on the copyright page if the material is a book or within the article if it is a journal.

Permission is granted solely for use in conjunction with the thesis, and the material may not be posted online separately.

Any third party material is expressly excluded from this permission. If any of the material you wish to use appears within our work with credit to another source, authorisation from that source must be obtained

Best wishes,

Rebecca Cook
 Permissions Assistant
 John Wiley & Sons Ltd
 The Atrium
 Southern Gate, Chichester
 West Sussex, PO19 8SQ
 UK

ANEXO B – Autorização da Wiley para o uso da Publicação 1 nesta tese de doutorado.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 04, 2016

This Agreement between Natalia Kalatzis ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3902000523998
License date	Jul 04, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	International Endodontic Journal
Licensed Content Title	Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review
Licensed Content Author	N. G. Kalatzis-Sousa,R. Spin-Neto,A. Wenzel,M. Tanomaru-Filho,G. Faria
Licensed Content Date	Apr 8, 2016
Licensed Content Pages	1
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	USO DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA NA ANÁLISE DA LESÃO PERIAPICAL EM ANIMAIS DE PEQUENO PORTE: REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA E ESTUDO IN VIVO
Expected completion date	Aug 2016
Expected size (number of pages)	76
Requestor Location	Natalia Kalatzis-Sousa Humaitá Street 1680 Araraquara, Sao Paulo 14801903 Brazil Attn: Natalia Kalatzis-Sousa
Publisher Tax ID	EU826007151
Billing Type	Invoice
Billing Address	Natalia Kalatzis-Sousa Humaitá Street 1680 Araraquara, Brazil 14801903 Attn: Natalia Kalatzis-Sousa
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work

(collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and

conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

ANEXO C – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP para a realização da pesquisa.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 45/2014

Araraquara, 8 de abril de 2015.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "**ACURÁCIA E CONFIABILIDADE DA MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA NA AVALIAÇÃO DA LESÃO PERIAPICAL EM CAMUNDONGOS EMPREGANDO AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA COMO PADRÃO OURO**" (Proc. CEUA nº 45/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para OUTUBRO/2016.

Atenciosamente.

Prof. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari
Vice-coordenadora da CEUA

À
Profa. Dra. GISELE FARIA
DD. Pesquisadora Responsável
Departamento de Odontologia Restauradora

Não autorizo a reprodução deste trabalho até o dia 26/08/2018.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 26 de agosto de 2016

Natália Guimarães Kalatzis Sousa