

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 26/08/2018.



**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 MICROTOMOGRÁFIA 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 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.

**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,<sup>34</sup> 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.<sup>46,47</sup>, 1994, 1998; Graves et al.<sup>13</sup>, 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.<sup>27</sup>, 2011; Wang et al.<sup>58</sup>, 2011; Garlet et al.<sup>11</sup>, 2010; Silva et al.<sup>41</sup>, 2011; Maciel et al.<sup>24</sup>, 2012; Sousa et al.<sup>43</sup>, 2014; de Oliveira et al.<sup>9</sup>, 2015). Nesses modelos animais, a reabsorção óssea periapical pode ser avaliada por meio de radiografias convencionais ou digitais (Teixeira et al.<sup>50</sup>, 2011), cortes histológicos (von Stechow et al.<sup>56</sup>, 2003 ; Rittling et al.<sup>36</sup>, 2010 ; Teixeira et al.<sup>50</sup>, 2011; Sousa et al.<sup>43</sup>, 2014; Sun et al.<sup>48</sup>, 2014; Hao et al.<sup>15</sup>, 2015), ou ainda, mais recentemente, por meio de microtomografia computadorizada – micro CT (von Stechow et al.<sup>56</sup>, 2003 ; Rittling et al.<sup>36</sup>, 2010 ; McAbee et al.<sup>28</sup>, 2012; Sousa et al.<sup>43</sup>, 2014; Sun et al.<sup>48</sup>, 2014; de Oliveira et al.<sup>9</sup>, 2015; Hao et al.<sup>15</sup>, 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.<sup>56</sup>, 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.<sup>3</sup>, 2000; von Stechow et al.<sup>56</sup>, 2003).

Nos anos 70 foi introduzida a tomografia computadorizada (Schambach et al.<sup>38</sup>, 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.<sup>35</sup>, 2007). Posteriormente, surgiu a micro CT, que apresenta alta resolução de imagens (Cavanaugh et al.<sup>6</sup>, 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.<sup>56</sup>, 2003; Sun et al.<sup>48</sup>, 2014). Embora necessite de aparelho específico e operador treinado, a micro CT é um método rápido, reprodutível e não destrutivo (Balto et al.<sup>3</sup>, 2000), servindo

assim, como um grande aliado para as pesquisas de animais de pequeno porte (Schambach et al.<sup>38</sup>, 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.<sup>56</sup>, 2003) e axial (Sun et al.<sup>48</sup>, 2014; Yang et al.<sup>61</sup>, 2014).

Estudos empregando a micro CT para avaliar a lesão periapical em ratos e camundongos tem sido relatados na literatura (Balto et al.<sup>3-5</sup>, 2000, 2001, 2002; von Stechow et al.<sup>56</sup>, 2003; McAbee et al.<sup>28</sup>, 2012; Kang et al.<sup>19</sup>, 2013; Wan et al.<sup>57</sup>, 2014; Tang et al.<sup>49</sup>, 2014; Sun et al.<sup>48</sup>, 2014; Yang et al.<sup>61</sup>, 2014; Sousa et al.<sup>43</sup>, 2014; de Oliveira et al.<sup>9</sup>, 2015; Hao, et al.<sup>15</sup>, 2015). A maioria dos artigos avaliam apenas a área (Balto et al.<sup>3-5</sup>, 2000, 2001, 2002; von Stechow et al.<sup>56</sup>, 2003; McAbee et al.<sup>28</sup>, 2012; Wan et al.<sup>57</sup>, 2014; Sousa et al.<sup>43</sup>, 2014; de Oliveira et al.<sup>9</sup>, 2015) e alguns avaliam o volume da lesão periapical (von Stechow et al.<sup>56</sup>, 2003; Kang et al.<sup>19</sup>, 2013; Sun et al.<sup>48</sup>, 2014; Tang et al.<sup>49</sup>, 2014; Yang et al.<sup>61</sup>, 2014; de Oliveira et al.<sup>9</sup>, 2015; Hao et al.<sup>15</sup>, 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.<sup>43</sup>, 2014). De acordo com Spin-Neto et al.<sup>45</sup> (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.<sup>56</sup>, 2003; Sun et al.<sup>48</sup>, 2014; Yang et al.<sup>61</sup>, 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 -  $\mu$ A, 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.<sup>17</sup>, 2016).

O tamanho do voxel de uma imagem em 3D é equivalente à resolução de pixel em imagens 2D (Spin-Neto et al.<sup>44</sup>, 2013). O tamanho do voxel determina a resolução da imagem (Scarfe et al.<sup>37</sup>, 2006). Quanto menor o tamanho do voxel maior é a resolução e a nitidez das imagens (Ballrick et al.<sup>2</sup>, 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.<sup>21</sup>, 2009; Maret et al.<sup>26</sup>, 2012; Vizzotto et al.<sup>55</sup>, 2013). Liedke et al.<sup>21</sup> (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.<sup>26</sup> (2012) compararam a precisão da mensuração do volume dentário em imagens obtidas com voxel de 300, 200, 76 e 41 $\mu$ m. Observaram que os volumes foram semelhantes até os 200 $\mu$ m, mas com o voxel de 300 $\mu$ 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.<sup>23</sup>, 2006; Loubele et al.<sup>22</sup>, 2008); imagens tomográficas adquiridas em menor tamanho de voxel, exigem maior tempo de escaneamento (Palomo et al.<sup>31</sup>, 2008) e maior exposição à radiação (Ballrick et al.<sup>2</sup>, 2008; Davies et al.<sup>8</sup>, 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.<sup>18</sup>, 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 $\mu$ m (Sun et al.<sup>48</sup>, 2014; Sousa et al.<sup>43</sup>, 2014; Hao et al.<sup>15</sup>, 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.<sup>23</sup>, 2006, Palomo et al.<sup>31</sup>, 2008), rotação (Lennon et al.<sup>20</sup>, 2011, Cook et al.<sup>7</sup>, 2015) e passos de rotação (Willekens et al.<sup>60</sup>, 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.<sup>23</sup>, 2006, Palomo et al.<sup>31</sup>, 2008) aumentando o ruído das imagens (Zarb et al.<sup>62</sup>, 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 (SkyScan<sup>42</sup>, 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.<sup>20</sup>, 2011, Cook et al.<sup>7</sup>, 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.<sup>7</sup>, 2015). No entanto, ambas as rotações em CBCT podem produzir precisão semelhante na detecção de lesões ósseas artificiais (Durack et al.<sup>10</sup>, 2011, Lennon et al.<sup>20</sup>, 2011). Em relação ao passo de rotação, sabe-se que é inversamente proporcional à resolução de imagem (Abudurexiti et al.<sup>1</sup>, 2010, Willekens et al.<sup>60</sup>, 2010, Sharir et al.<sup>40</sup>, 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.<sup>60</sup>, 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.<sup>53</sup>, 2000; Van Geet e Swennen,<sup>52</sup> 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 (Philips<sup>32</sup>, 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.<sup>45</sup>, 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.<sup>12</sup>, 2009) que pode variar de 0 (branco) a 255 (preto) (Philips<sup>32</sup> 2000). Os valores de **threshold** escolhidos pelo operador devem ser capazes de representar com precisão o verdadeiro tamanho do objeto (Schlueter et al.<sup>39</sup>, 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).

## 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.