



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

KARLA ROVARIS DA SILVA

**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS E PROTOCOLOS DE
AQUISIÇÃO E RECONSTRUÇÃO DE IMAGENS DE
MICROTOMOGRFIA PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES
DE CÁRIE INCIPIENTES**

***COMPARISON OF ACQUISITION AND RECONSTRUCTION
PARAMETERS AND PROTOCOLS OF
MICROTOMOGRAPHY IMAGES FOR THE DIAGNOSIS OF
INCIPIENT CARIES LESIONS***

PIRACICABA

2017

KARLA ROVARIS DA SILVA

**COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS E PROTOCOLOS DE
AQUISIÇÃO E RECONSTRUÇÃO DE IMAGENS DE
MICROTOMOGRÁFIA PARA O DIAGNÓSTICO DE LESÕES
DE CÁRIE INCIPIENTES**

***COMPARISON OF ACQUISITION AND RECONSTRUCTION
PARAMETERS AND PROTOCOLS OF
MICROTOMOGRAPHY IMAGES FOR THE DIAGNOSIS OF
INCIPIENT CARIES LESIONS***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Radiologia Odontológica, na Área de Radiologia Odontológica.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Oral Radiology, in Oral Radiology area.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Haiter Neto

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Karla Rovaris da Silva e orientada pelo Prof. Dr. Francisco Haiter Neto

PIRACICABA

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si38c Silva, Karla Rovaris da, 1987-
Comparação de parâmetros e protocolos de aquisição e reconstrução de imagens de microtomografia para o diagnóstico de lesões de cárie incipientes / Karla Rovaris da Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Francisco Haiter Neto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Microtomografia por raio-X. 2. Cárie dentária. 3. Diagnóstico por imagem.
I. Haiter Neto, Francisco, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparison of acquisition and reconstruction parameters and protocols of microtomography images for the diagnosis of incipient caries lesions

Palavras-chave em inglês:

X-ray microtomography

Dental caries

Diagnostic imaging

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutora em Radiologia Odontológica

Banca examinadora:

Francisco Haiter Neto [Orientador]

Sergio Lins de Azevedo Vaz

Frederico Sampaio Neves

Karla de Faria Vasconcelos

Matheus Lima de Oliveira

Data de defesa: 27-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Radiologia Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27 de Julho de 2017, considerou a candidata KARLA ROVARIS DA SILVA aprovada.

PROF. DR. FRANCISCO HAITER NETO

PROF. DR. SERGIO LINS DE AZEVEDO VAZ

PROF. DR. FREDERICO SAMPAIO NEVES

PROF^a. DR^a. KARLA DE FARIA VASCONCELOS

PROF. DR. MATHEUS LIMA DE OLIVEIRA

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pela amizade e confiança, pelas inúmeras oportunidades concedidas e principalmente pela inspiração.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) e à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e a todos os funcionários da FOP, em especial aos da Radiologia: Luciane Satollo, Sara, Waldeck e Fernando, pela amizade e pela gentileza de sempre.

À CAPES, pela concessão de bolsas de estudos tanto pela Demanda Social, quanto pelo Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE), que viabilizaram as minhas experiências no doutorado;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Radiologia Odontológica da FOP/UNICAMP, pelo convívio e conhecimento compartilhado. Em especial aos professores Deborah e Matheus, pela amizade, por todos os conhecimentos compartilhados e pela inspiração.

Ao meu coorientador neozelandes, Prof. Dr. Donald Schwass, pela hospitalidade e por viabilizar um sonho.

À toda equipe de funcionários, alunos e professores da University of Otago, que com toda sua bondade me acolheu, em especial aos amigos Carolina Loch e Andrew que tornaram a minha passagem mais leve e feliz.

Aos professores que compuseram a banca da minha qualificação, Prof. Dr. Yuri Nejaim, Profa. Dra. Lúcia Trazzi e Profa. Dra. Deborah Queiroz, que contribuíram para o refinamento deste trabalho;

Aos professores da banca da minha defesa de tese, Prof^a. Dr^a. Karla Vasconcelos, Prof. Dr. Sérgio Lins, Prof. Dr. Matheus de Oliveira, Prof. Dr. Frederico Sampaio, pela disponibilidade e contribuição;

As amigas Polyane Mazucatto, Anne Oenning e Taruska Vasconcelos, pela dedicação e envolvimento com este trabalho.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Radiologia Odontológica pelo convívio e por fazerem meus dias em Piracicaba mais felizes.

À minha querida família por me apoiar nos meus desafios e nunca duvidar de que eu seria capaz.

RESUMO

Os objetivos no presente estudo foram: avaliar a acurácia da Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) na identificação de lesões de cárie incipientes em dentes posteriores; e avaliar a influência de parâmetros e protocolos de aquisição e reconstrução no diagnóstico das lesões. Seis dentes posteriores resultando em 12 faces proximais, 6 hípidas e 6 com lesões incipientes de cárie, foram utilizados. Os escaneamentos foram feitos em dois microtomógrafos, SkyScan 1172 e 1174 (Bruker, Kontich, Belgium), que diferem em potência, tendo 100kVp e 100 μ A e 50kVp e 800 μ A, respectivamente. Parâmetros de aquisição como: *rotation step*, *frame*, filtros, rotação parcial e total foram variados resultando em 16 escaneamentos por dente e cada escaneamento foi reconstruído com 0,15 e 30% de *Beam Hardening Correction* (BHC). Ao final, 576 grupos de imagens foram avaliados por três examinadores utilizando uma escala de 5 pontos quanto a presença/ausência de lesão de cárie nas faces proximais. O preparo histológico das amostras foi realizado e a análise dos cortes sob luz polarizada foi o padrão-ouro deste trabalho. Não foi observada diferença estatística significativa entre os aparelhos e ambos obtiveram resultados excelentes quanto à acurácia. O equipamento 1174 atingiu 70% e o 1172 atingiu 60% de protocolos com acurácia perfeita. Os parâmetros de *rotation step*, *frame*, filtros, rotação parcial e total de forma isolada não influenciaram significativamente os resultados. Quando diferenças significativas, porém pontuais, nos resultados do 1174, foram identificadas, o parâmetro de melhor qualidade resultou em maior acurácia. Quanto aos protocolos do 1174, apenas os protocolos que agruparam os piores parâmetros de aquisição e sem aplicação de BHC diferiram dos demais, apresentando resultados de acurácia satisfatórios/regulares, 0,881 e 0,653. Os protocolos do aparelho 1172 não diferiram entre si. Quando a ferramenta de BHC foi testada, a mesma se mostrou eficaz em aumentar a acurácia dos protocolos para 81,25% de protocolos com acurácia perfeita e corrigir os dois piores protocolos citados anteriormente, ambos chegando à acurácia perfeita. Não foi observada diferença estatística quanto à aplicação ou níveis de BHC para os demais protocolos. Como conclusão, a Micro-CT se mostrou ser um método acurado para a identificação das lesões de cárie incipientes. Os parâmetros de aquisição isolados não tiveram influência determinante sobre o diagnóstico, porém, quando os piores parâmetros foram agrupados, observou-se uma queda significativa na acurácia do método. Apesar de não ter mostrado diferença estatística na maior parte das comparações (0,15,30%), a ferramenta BHC aumentou a acurácia geral dos protocolos e corrigiu protocolos de acurácia insatisfatória.

Palavras-chave: Microtomografia computadorizada por Raio-X; Cárie Dentária; Diagnóstico por Imagem.

ABSTRACT

The objectives in the present study were: to evaluate the accuracy of Micro Computed Tomography (Micro-CT) in the identification of incipient caries lesions in posterior teeth; and to evaluate the influence of acquisition and reconstruction parameters and protocols in the diagnosis of the lesions. Six posterior teeth resulting in 12 proximal, 6 sound and 6 incipient caries lesions were used. The scans were done in two equipment, SkyScan 1172 and 1174 (Bruker, Kontich, Belgium), which differ in power, having 100kVp and 100 μ A and 50kVp and 800 μ A, respectively. Acquisition parameters such as: rotation step, frame, filters, partial and total rotation were varied resulting in 16 scans per tooth and each scan was reconstructed using 0,15 and 30% of Beam Hardening Correction (BHC). At the end, 576 groups of images were evaluated by three examiners using a 5-point scale for the presence/absence of caries lesion on the proximal faces. The histological preparation of the samples was performed and the analysis of the sections under polarized light was the gold standard of this study. No statistically significant difference was observed between the devices, although both had excellent results in terms of accuracy. Equipment 1174 reached 70% and 1172 reached 60% of protocols with perfect accuracy. The parameters of rotation step, frame, filters, partial and total rotation isolated did not significantly influence the results. When significant differences, however punctual in the results of 1174, were identified, the parameter of better quality resulted in greater accuracy. For the 1174 protocols, only the protocols that grouped the worst acquisition parameters and without BHC application differed from the others, presenting satisfactory/regular accuracy results, 0.881 and 0.653. The protocols of 1172 device did not differ from each other. When the BHC tool was tested, it proved to be effective in increasing the accuracy to 81.25% of perfect accuracy protocols and correcting the two worst protocols cited, both of which reached perfect accuracy. No statistical difference was observed regarding the application or correction levels for the other protocols. In conclusion, Micro-CT presented an excellent performance in the identification of incipient caries lesions. The isolated acquisition parameters had no decisive influence on the diagnosis, but when the worst parameters were grouped, a significant decrease in the accuracy of the method was observed. Although it did not show statistical difference in most comparisons (0,15,30%), the BHC tool increased the overall accuracy of the protocols and corrected protocols of unsatisfactory accuracy.

Keywords: X-Ray Microtomography; Dental Caries; Diagnostic Imaging.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 ARTIGOS	15
2.1 Artigo 1: Reliability of Micro-computed tomography acquisition protocols for the diagnosis of incipient caries lesions	15
2.2 Artigo 2: Beam Hardening Correction Tool improves the diagnosis of incipient caries lesions in Micro-CT images	33
3 DISCUSSÃO	51
4 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
Apêndice 1 – Metodologia Expandida	58
ANEXOS	
Anexo 1 – Certificado emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas	69
Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo	70

1 INTRODUÇÃO

Um significativo avanço tecnológico vem sendo percebido no âmbito da Imaginologia Odontológica. Dentre as novas modalidades adotadas estão a radiografia digital, ressonância magnética, ultrassom e tomografia computadorizada (Patel et al., 2009; Neelakantan et al., 2010). Perante as dificuldades e limitações na obtenção de informações para o diagnóstico por meio da utilização de radiografias convencionais bidimensionais, as imagens tridimensionais começaram a atrair grande interesse dos cirurgiões-dentistas (Garib et al., 2007).

No final da década de 90, um tomógrafo de alta resolução, denominado microtomógrafo, foi desenvolvido para obter imagens tridimensionais de pequenos objetos *in vitro* e *in vivo* (Muller et al., 1998). A microtomografia computadorizada (Micro-CT) é uma técnica não destrutiva que reconstrói imagens de amostras em escala micrométrica. Na biologia, a microtomografia computadorizada é utilizada em diferentes estruturas, inclusive no estudo de tecidos humanos (Mizutani et al., 2008). Estruturas ósseas e dentárias estão sendo vastamente pesquisadas por meio desse método (Verma et al., 2011; Chappard et al., 2005).

Em 1998, a Micro-CT foi validada como um método tridimensional de análise do osso trabecular, por meio da comparação com a histomorfometria (Muller et al., 1998). A técnica não substitui por completo a avaliação histológica, no entanto, a Micro-CT possibilita a aquisição de importantes índices de qualidade óssea de forma tridimensional (Chappard et al., 2005).

A Micro-CT vem sendo utilizada expressivamente no estudo dos tecidos dentários (Paque et al., 2011; Peters e Paque, 2011), pois consiste em um método

não destrutivo e acurado de avaliação. Além disso, fornece algumas informações anatômicas que até então não eram possíveis com os métodos bidimensionais convencionais (Paque et al., 2010). Na Endodontia, foi observada a capacidade de examinar a anatomia dos canais radiculares em detalhes finos, mostrando que os métodos de análise utilizados até então não refletiam por completo essas variações (Yamada et al., 2011; De Oliveira et al., 2011).

A microtomografia computadorizada e, mais recentemente, a nanotomografia, oferecem inovação e possibilitam o estudo *ex vivo* dos tecidos duros, de forma quantitativa e qualitativa, sem a necessidade de destruir o espécime (Schwass et al., 2009; Chalas et al., 2017). Preconiza-se que a secção das amostras seja evitada para preservá-las, sendo assim, métodos não-destrutivos, após serem devidamente validados perante os métodos de referência, passarão a servir como padrão-ouro (Anderson et al., 1996).

O exame histológico é o padrão-ouro dentre as ferramentas para diagnóstico de lesões de cárie *ex vivo*, sendo capaz de ilustrar a verdadeira condição anatomo-patológica do tecido (Hintze e Wenzel, 2002; Kucuk et al., 2016; Zhao et al., 2017). Apesar de ter sua superioridade comprovada, este método também apresenta algumas deficiências, tais como: o possível dano ao tecido cariado durante a secção do dente; a verdadeira profundidade da lesão pode ser perdida entre os cortes histológicos; o longo tempo para processamento das amostras (Jablonski-Momeni et al., 2008; Haiter-Neto et al., 2008).

A tecnologia microtomográfica também tem sido investigada como possível substituta da análise histológica na detecção de lesões de cáries proximais. Para tal, imagens foram adquiridas no aparelho SkyScan 1172 (Bruker, Kontich, Belgium) com os seguintes parâmetros: 100kV, 98 μ A, filtro de alumínio de 1mm, 8,09 μ m de

tamanho de *voxel*, numa matriz de 1024x1024, com 180° de rotação e parcela de giro de 0,23° e 2 *frames*, resultando num tempo de escaneamento entre uma hora e meia e duas horas. Nas condições analisadas, na avaliação de lesões não-cavidades, os autores afirmam que o Micro-CT não estabeleceu concordância satisfatória com a análise histológica e contraindicam o método, afirmando que o mesmo não é uma alternativa eficaz para a detecção de cáries proximais (Mitropoulos et al., 2010).

Ainda com o intuito de validar a Micro-CT como padrão-ouro perante a comparação com a análise histológica, em estudo de metodologia similar, 48 faces proximais de primeiros molares foram avaliadas. As imagens de Micro-CT foram obtidas no aparelho SkyScan 1076 sob os seguintes parâmetros: 100 kV, 100µA, 9.05µm de tamanho de *voxel*, filtro de alumínio de 1mm, parcela de giro de 0,3° e 4 *frames*, que resultou num tempo de aquisição de 1:27h. Obtiveram uma concordância interexaminador de 0,87 a 0,93 (coeficiente Kappa) e observaram uma alta correlação (0.88) entre o Micro-CT e a histologia. Por não terem encontrado diferença estatística significativa entre os dois métodos os autores afirmam que a Micro-CT pode ser usada como um método de escolha para a detecção de cáries proximais em primeiros molares (Soviero et al., 2012).

A Micro-CT também já foi testada perante a Microradiografia Transversal (TMR) para a mensuração de lesões de cárie em esmalte. Para tal finalidade, molares humanos com manchas brancas naturais foram escaneados variando alguns parâmetros energéticos de aquisição e os filtros, 100 kV foi mantido e foi variada a microamperagem e o filtro em: 50 uA (0,5 mm de Al filtro), 165 uA (0,5 mm Al/ 0,3 mm de Cu), e 200 uA (0,5 mm de Al/Cu de 0,4 mm), com e sem redução de artefato de endurecimento do feixe (*beam hardening correction*). Mesmo sem *beam*

hardening correction (BHC), os filtros Al/Cu combinados reduziram com sucesso o efeito de endurecimento feixe. Além disso os autores afirmaram que o Micro-CT pode ser usado como uma alternativa não destrutiva frente ao TMR com parâmetros comparáveis para a estudo de lesões de cárie em esmalte (Hamba et al., 2012).

Tendo em vista que o material humano para pesquisa está cada vez mais escasso, métodos destrutivos como a análise histológica tendem a ser substituídos por métodos conservadores de análise. Os métodos não-destrutivos são geralmente os de escolha na avaliação das amostras. No diagnóstico de lesões de cárie *in vitro*, a Micro-CT foi citada como o instrumento mais apropriado (Huysmans e Logbottom, 2004). Porém a mesma precisa ser testada e comparada com o padrão-ouro tradicional desse tipo de avaliação, para que assim possa ser recomendada como um substituto desse método.

Até o momento, poucos estudos acerca desse assunto, microtomografia computadorizada como padrão-ouro para o diagnóstico de cárie, foram encontrados na literatura e os mesmos não observaram concordância absoluta entre o método proposto e o padrão-ouro. Apenas a variação energética e de filtros foi testada em um dos estudos e sabe-se que existem variados tipos de aparelhos e parâmetros alteráveis para aquisição e reconstrução das imagens. O tempo de trabalho e o espaço para arquivamento necessários são fatores importantes na escolha desses protocolos. Tais parâmetros e protocolos, que aparentemente influenciam fortemente a qualidade das imagens, devem ser testados e entendidos na sua plenitude, para que sejam devidamente selecionados e usados como ferramentas aliadas no processo de diagnóstico das alterações.

O estabelecimento de um protocolo ideal é de extrema importância para evitar que dentes humanos sejam destruídos para a obtenção de um padrão-ouro. Dessa

forma, um banco de dentes padronizados e já analisados por Micro-CT poderia ser reutilizado para testes de novos aparelhos de imagem (radiografia digital e tomografia) e filtros que surgirem no mercado. Portanto, o objetivo geral do presente trabalho foi testar a microtomografia computadorizada para o diagnóstico de lesões de cárie naturais não-cavitadas, avaliando diferentes parâmetros e protocolos de aquisição e reconstrução de imagem.

2 ARTIGOS

2.1 Artigo 1: Reliability of Micro-computed tomography acquisition protocols for the diagnosis of incipient caries lesions

Karla Rovaris, DDS, MS¹

Polyane Mazucatto Queiroz DDS, MS¹

Carolina Loch, BSc, MS, PhD²

Taruska Vasconcelos, DDS, MS, PhD¹

Anne Caroline Costa Oenning, DDS, MS, PhD¹

Donald R Schwass, BSc, BDS, DClinDent (Pros) FPFA³

Francisco Haiter-Neto, DDS, MS, PhD¹

¹Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Brazil

²Department of Oral Sciences, Faculty of Dentistry, University of Otago, Dunedin, New Zealand

³Clinical Director, Office of the Dean, Faculty of Dentistry, University of Otago, Dunedin, New Zealand

Corresponding author:

Karla Rovaris

Piracicaba Dental School, Department of Oral Diagnosis, Area of Oral Radiology

901, Limeira Avenue, zip code: 13414-903, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil

Phone/fax number: +55 (19) 2106-5327

E-mail: karlarovaris@gmail.com

Abstract

Objective: To test Micro-CT and compare acquisition parameters and protocols for diagnosis of incipient proximal caries lesions and to validate the method against ground section histology. **Methods:** Twelve posterior teeth proximal surfaces: 6 sound and 6 containing natural white spot lesions were analysed. Two Micro-CT devices were used; SkyScan 1172 and 1174. Each tooth was scanned 32 times, resulting in 192 scans. Different settings of rotation step, number of frames, partial or full rotation, and filters were combined. Datasets were evaluated independently by three experienced oral radiologists. The area under the ROC curve, representing the accuracy, was obtained for each protocol and then each parameter was isolated to observe the influence of each factor in image acquisition. **Results:** There was no statistical significant difference between images generated by both scanners ($p>0.05$). The SkyScan 1174 and 1172 produced images that allowed perfectly accurate caries diagnose in 50% and 43%, respectively, of the protocols tested. When isolated, each tested parameter did not influence significantly the diagnosis of incipient caries lesions. Protocol 5 for the Skyscan 1174 device, which included less ideal parameters (1 frame, 0.7° rotation step, 0.5mm Al filter, 180° rotation) showed significant less caries detection potential and statistically differed from the other protocols ($p<0.05$). No significant difference was found among Skyscan 1172 device protocols. **Conclusions:** Individual tested parameters did not influence on the diagnostic value of this method and most of the Micro-CT protocols tested can be used to detect incipient lesions caries on proximal surfaces of posterior teeth.

Keywords: X-Ray Microtomography; Dental Caries; Diagnostic Imaging.

Introduction

Any system that aims to detect carious lesions needs to be validated before being used in the clinical setting. Light microscopy imaging using ground sections is the gold standard, commonly used to validate devices employed to diagnose dental caries.¹ However, ground section histology is a tissue-destructive method which may not show the true depth of the caries lesions, as the process of sectioning and polishing the slices can wear away the specific area where the caries lesion has its greater penetration depth.²

In the late 1990s, micro-computed tomography (Micro-CT) using high resolution tomographs was developed to obtain three-dimensional images of small objects.³ Micro-CT is a non-destructive technique that virtually reconstructs samples on a micrometer scale and is used in the study of varied structures, including human tissues.⁴ In recent years, bone and teeth have been extensively researched using this method.^{5,6}

Two main studies have tested the accuracy of Micro-CT on the diagnosis of proximal caries lesions validated against ground section histology.^{7,8} Soviero *et al.* (2012) analysed cavitated lesions and considered Micro-CT was a reliable diagnostic instrument.⁷ On the other hand, Mitropoulos *et al.* reported Micro-CT was not a reliable technique in the diagnosis of proximal caries lesions, however, only non-cavitated lesions were analysed.⁸

To the best of our knowledge few references have investigated the reliability of Micro-CT for diagnosis of carious lesions and how equipment settings might affect this process. Settings such as energetic parameters and filter variation have been tested and compared to transverse microradiography analyses.⁹ It is widely known that many parameters can be altered during acquisition and reconstruction of

images, strongly influencing their overall quality and future diagnostic potential. Therefore, these parameters need to be tested and better understood to aid in the diagnostic process. This study aimed to evaluate the Micro-CT accuracy and compare different acquisition parameters and protocols for Micro-CT images used in the diagnosis of incipient caries lesions.

Materials and Methods

Sample preparation

Following ethical approval, 6 extracted human posterior teeth were collected and subjected to clinical and radiographic inspection. A total of 12 proximal surfaces were evaluated: 6 sound and 6 containing natural white spot lesions. Exclusion criteria included the presence of cavitated caries lesions or restorations. Periapical radiographs, used to screen for exclusion criteria, were obtained with the paralleling technique, using the dental intraoral digital system VistaScan (Dürr Dental, Beitigheim-Bissingen, Germany), images were acquired with 7 mA, 70 kVp and 0.06 s.

Image acquisition

Micro-CT scans were performed using two different devices models: Skyscan 1174 μ CT unit (Bruker, Kontich, Belgium), using the following settings: 50 kV, 800 μ A, and Skyscan 1172 μ CT unit (Bruker, Kontich, Belgium), using 100 kV and 100 μ A. The following parameters (Table 1) were used to acquire the images:

Each tooth was scanned 32 times with 16 different scan protocols per device used, so 192 file folders were generated. The acquisition protocols used in SkyScan 1172 and Skyscan1174 are shown in Table 2. During acquisition, the long axis of the teeth was always kept vertical and aligned with the orientation planes. The

parameters used to reconstruct the images were: 0 of Beam Hardening Correction, 2 of smoothing and 7 of Ring Artefact Correction.

Image assessment

Due to the large number of repetitions of images acquired from the same tooth, reconstructed images of analysed teeth were reoriented in different positions using the DataViewer software (Bruker, Kontich, Belgium). This was done to minimise evaluator bias by reducing the chance of examiners being able to identify the sample used.

Datasets were randomized and evaluated independently by three oral radiologists, each with more than 5 years of experience of diagnostic imaging. The examiners were calibrated and trained in the recognition of lesions, and on how to use the Dataviewer software.

A total of 192 datasets were evaluated by each examiner and the total volume of the teeth was analysed. In order to avoid/reduce visual fatigue and sample identification, at each moment of evaluation, the examiner only evaluated 30 images, it was done only 3 times per week. A 5-point scale was used to identify the presence/absence of caries lesions in proximal surfaces (Fig.1): 1 - absent, 2 - probably absent, 3 - uncertain, 4 - probably present and 5 - present. After one month, 30% of the datasets were reevaluated to test the inter/intra-examiner agreement.

Histological preparation and examination

Teeth were cleaned with ethanol and individually embedded in epoxy resin (Epofix Cold Setting Embedding Resin, Struers, Copenhagen, Denmark). After

setting for 24 hours, blocks were serially sectioned into 1000 μm thick sections in the mesio-distal plane, using a 300 μm diamond blade under water irrigation. The tooth sections were subsequently polished under irrigation to reach the approximate thickness of 100 μm . During this process, the slices were constantly checked under a microscope to avoid over-grinding and loss of the carious lesion. Sections were ultrasonically cleaned and slices were mounted using transparent varnish. Two experienced and pre-calibrated observers examined the sections using a Leica DMLP light microscope (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) under polarized light. A two-point scale was used to identify the presence or absence of caries lesions, as follows: 0 - absence, 1 – presence.

Statistical Analysis

Data was tabulated and the area under the receiver operator characteristic (ROC) curve was obtained for each protocol. Areas under the ROC curve, representing the accuracy, of all protocols were compared between devices, using test t. Each parameter was isolated, in order to individually observe the influence of each acquisition parameter on the image, using test t. Combined protocols were also compared to each other using ANOVA. For all tests, the statistical significance was set at 5%. Tests were performed using MedCalc 15.8 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Kappa index was calculated to intra and inter-examiner agreement.

Results

Table 3 presents Kappa index values for intra and inter-examiner agreement for the detection of carious lesions, showing high agreement values.

There was no significant difference in caries diagnosis accuracy between the two different devices used (SkyScan 1172 and 1174) ($p > 0.05$) (Table 4). SkyScan 1174 produced images that allowed perfect accuracy in caries diagnose in 50% of the protocols tested, while SkyScan 1172 in 43% of the protocols.

Table 4 lists the accuracy values (represented by the area under the ROC curve) of each protocol for the diagnosis of caries lesions.

Considering the results from the Skyscan1174 device:

There was no significant difference in caries diagnostic potential in the number of frames used (1 or 3) for most of the images obtained ($p > 0.05$, 7 paired comparisons). Only one paired comparisons showed a statistically significant difference ($p < 0.05$). In this case, a protocol using 1 frame had less accuracy (0.653) compared to the same protocol using 3 frames (0.881).

When comparing the rotation step (0.3° and 0.7°) there was no significant difference between protocols in most of the cases ($p > 0.05$, 7 paired comparisons). Only one protocol showed a statistically significant difference ($p < 0.001$), 0.7° protocol with area on the Roc curve of 0.653 vs. 0.3° protocol area over the Roc curve of 1.

There was no significant difference in most of comparisons ($p > 0.05$, 6 paired comparisons) between 0.5mm Al and 1.0mm Al filters. In both cases where there was statistical difference between filters ($p < 0.05$), the 1mm Al filter had a better performance.

In most comparisons between protocols (7 paired comparisons), there was no difference ($p > 0.05$) in accuracy between images acquired with 180° and 360° rotation. In the only case where there was significant difference, images reconstructed with 360° had higher accuracy values than images obtained with 180° .

Considering the results from the Skyscan 1172 device, when comparing isolated parameters as: frames, rotation step, filters and partial or full-rotation, there were no statistical differences ($p>0.05$).

Although no significant difference was observed between isolated parameters in most cases for the Skyscan 1174 device results, the protocol which used parameters which gave poorer results (Protocol 5 = 1 frame, 0.7° rotation step, 0.5mm Al filter, 180° rotation) had significant lower accuracy statistically ($p<0.05$) compared to the other protocols. Another similar protocol where the number of frames was increased to 3 (Protocol 7) also resulted in a significantly lower accuracy ($p<0.05$) when compared to the other protocols.

No significant difference was observed between protocols from the Skyscan 1172 device, although protocol 5 had also the lowest accuracy, 0.898.

Discussion

In clinical practice, visual inspection and bi-dimensional radiographic images have been routinely used in the diagnosis of proximal caries lesions.¹⁰ Despite this, much has been reported about the inaccuracy of bitewing radiographs for detecting carious lesions.^{11,12}

The diagnose of incipient lesions affecting only enamel has been reported as a challenge for most imaging modalities that use radiation.¹³ Mitropoulos *et al.* (2010) considered Micro-CT was an ineffective technique for diagnosis of incipient caries. In their study, Micro-CT evaluation was in disagreement with histological results. Mitropoulos *et al.* (2010) interpreted this disagreement as relating to the inherent problem of radiographic and tomographic techniques for detecting the subtle onset of demineralization.⁸ Contrasting with their findings, our study showed high levels of

diagnostic accuracy from Micro-CT images. Here, all the lesions studied were confined to the enamel and most of them were located in the outer half of enamel.

Intra and inter-examiner values showed almost perfect agreement¹⁴, demonstrating that Micro-CT imaging are consistent images even when there is no evidence of cavitation.

In an attempt to automate the quantification of caries observed in Micro-CT images and to correlate those with histological findings, the authors showed a good result for automatic quantification of dentin lesions but emphasized the importance of obtaining better quality images for caries lesions restricted to the enamel.¹⁵

In a later study, attempting to validate Micro-CT in comparison with transverse microradiography, tested varied energy acquisition parameters, the use of different filters and the application of reconstruction beam hardening correction (BHC) to improve image quality. They found that when they used a 0.5mm Al filter and no BHC, Micro-CT results did not correlate with TMR.⁹ The present results corroborate with the results cited, lower caries detection accuracy was also obtained when using the 0.5mm Al filter. Both single component (Al) and combined filters (Al / Cu) have been used in previous investigations, of caries lesions detection, but without being compared.^{16,17}

Under the testing conditions analysed, each parameter isolated did not have a determinant influence on the diagnosis of incipient caries lesions. However, whenever the difference was observed, poorer parameters (0.7°, 1 frame, 0.5 mm Al filter and partial rotation of 180°, 50kVp) resulted in images with lower accuracy for caries detection. When these parameters were grouped into a single protocol (P5), this protocol presented a statistically significant lower accuracy of detection than

other tested protocols (area value over the ROC curve = 0.653). In contrast, the protocol which used all the parameters supportive of better performance (P12) (0.3° rotation step, 3 frames, 1mm Al and full rotation of 360°) had high agreement with histological standard. No differences were observed for the various protocols used for the Skyscan 1172 device, probably because this equipment works with higher energy, 100kVp, and the energy overcame any influences from the worst combination of parameters.

Ground section histology is considered the gold standard method for diagnostic cariology in research. However, this method has several limitations, due to the destructive nature of preparation requiring long and laborious tissue processing. In addition, for small caries lesions, it is difficult to obtain the specific slice in which the lesion presents its greatest depth.¹⁸

Soviero *et al* (2012) showed that three enamel caries lesions detected via Micro-CT imaging were not visualized in the histological analysis. Similarly, a caries lesion that was diagnosed as a dentine lesion using Micro-CT, was then confirmed as an enamel-only lesion by histological examination. The authors emphasized that the differences observed between Micro-CT and histology should be treated with caution, considering that the sectioning of the samples can cause loss of a significant volume of hard tissue such that caries lesions can be easily lost during processing.⁷ This highlights the need for the development and validation of non-destructive techniques for the diagnosis of caries lesions.¹⁹ In the present study, histological examination confirmed the findings via Micro-CT for the presence or absence of caries lesions. However, it is emphasized that caution is advised when preparing specimens to avoid loss of critical parts of the tooth in the region of interest.

Although it is known that two different methods have an inherent possibility of disagreement, and that replicates of the same method could also result in different results,²⁰ the present study showed an almost perfect agreement between both Micro-CT devices protocols and histology. Therefore, Micro-CT seems to be an appropriate diagnostic method for the detection of incipient caries affecting proximal surfaces of teeth and individual tested parameters did not significantly influence the diagnostic value of this method, with only two of the more extreme protocols contraindicating this finding. Its preferable that users choose, between the satisfactory protocols, those who requires less time of acquisition and processing (P1 and P9).

REFERENCES

1. Jablonski-Momeni A, Ricketts DN, Stachniss V, Maschka R, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Occlusal caries: evaluation of direct microscopy versus digital imaging used for two histological classification systems. *J Dent* 2009;37:204-11.
2. Ricketts DNJ, Watson TF, Liepins PJ, Kidd EAM. A comparison of two histological validating techniques for occlusal caries. *J Dent* 1998; 26:89-96.
3. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23: 59–66.
4. Mizutani R, Takeuchi A, Uesugi K, Ohyama M, Takekoshi S, Osamura RY, Suzuki Y. Three-dimensional microtomographic imaging of human brain cortex. *Brain Res.* 2008a; 1199:53–61.
5. Zou W, Hunter N, Swain MV. Application of polychromatic μ CT for mineral density determination. *J Dent Res* 2011; 90:18–30.
6. Verma P; Love. RA Micro-CT study of the mesiobuccal root canal morphology of the maxillary first molar tooth. *Int Endod J* 2011; 44(3): 210-7.
7. Soviero VM, Leal SC, Silva RC, Azevedo RB. Validity of Micro-CT for in vitro detection of proximal carious lesions in primary molars. *J Dent* 2012; 40:35-45.

8. Mitropoulos P, Rahiotis C, Stamatakis H, Kakaboura A. Diagnostic performance of the visual caries classification system ICDAS II versus radiography and micro-computed tomography for proximal caries detection: An in vitro study. *J Dent* 2010;38:859-867.
9. Hamba H, Nikaido T, Sadr A, Nakashima S, Tagami J. Enamel lesion parameter correlation between polychromatic Micro-CT and TMR. *J Dent Res* 2012;91(6):586-91.
10. Rindal DB, Gordan VV, Litaker MS, Bader JD, Fellows JL, Qvist V, et al. Methods dentists use to diagnoses primary caries lesions prior to restorative treatment: findings from The Dental PBRN. *J Dent* 2010;38:1027-32.
11. Ekstrand KR, Ricketts DNJ, Kidd EAM. Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth on the occlusal surface: an in vitro examination. *Caries Res* 1997;31:224-31.
12. Hintze H, Wenzel A. Clinical and laboratory radiographic caries diagnosis. A study of the same teeth. *Dentomaxillofac Radiol* 1996;25:115-8.
13. Wenzel A. Bitewing and digital bitewing radiography for detection of caries lesions. *J D Res* 2004;83:C72-5.
14. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
15. Taylor AM, Satterthwaite JD, Ellwood RP, Pretty IA. An automated assessment algorithm for micro-CT images of occlusal caries. *The Surgeon* 2010;8:334-40.
16. Lo EC, Zhi QH, Itthagaran A. Comparing two quantitative methods for studying remineralization of artificial caries. *J Dent* 2010;38:352-59.
17. Neves AA, Coutinho E, Vivian CM, Jaecques SV, Van Meerbeck B. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. *Dent Mater* 2010;26:579-88.
18. Wenzel A, Hintze H. The choice of gold standard for evaluating tests for caries diagnosis. *Dentomaxillofac Radiol* 1999;28:132-6.
19. Huysmans MC, Longbottom C. The challenges of validating diagnostic methods and selecting appropriate gold standards. *J Dent Res* 2004;83:C48-52.
20. Martin Bland J, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet* 1986;327:307-10.

Tables

Table 1.

Table 1. Parameters used to acquire the Micro-CT images.

1172 / 1174			
FILTER 1172		FILTER 1174	
0.5mm Al	0.5mm Al + Cu	0.5mm Al	1mm Al
ROTATION STEP (for both)			
0.3°		0.7°	
FRAME (for both)			
1		3	
VOXEL SIZE (for both)			
14.1µm			
ROTATION (for both)			
180°		360°	

Table 2.

Table 2. Acquisition protocols for both devices.

PROTOCOL	FRAME	ROT STEP	ROTATION	1172 FILTER	1174 FILTER
P 1	1	0.3°	180°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 2	1	0.3°	360°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 3	3	0.3°	180°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 4	3	0.3°	360°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 5	1	0.7°	180°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 6	1	0.7°	360°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 7	3	0.7°	180°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 8	3	0.7°	360°	0.5mm Al	0.5mm Al
P 9	1	0.3°	180°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al
P 10	1	0.3°	360°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al
P 11	3	0.3°	180°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al
P 12	3	0.3°	360°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al
P 13	1	0.7°	180°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al
P 14	1	0.7°	360°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al
P 15	3	0.7°	180°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al
P 16	3	0.7°	360°	0.5mm Al+Cu	1.0mm Al

Table 3.

Table 3. Kappa index of intra and inter-rater agreement for the diagnosis of carious lesion.

	E1	E2	E3
E1	0,849	0,877	0,868
E2	-	0,881	0,895
E3	-	-	0,96

E:examiner.

Table 4.

Table 4. Area under the ROC curve for each protocol tested.

Protocol	Area under ROC curve 1174	Area under ROC curve 1172	p- value
P 1	1.0	0.944	0.145
P 2	0.971	0.941	0.572
P 3	0.969	1.0	0.294
P 4	1.0	1.0	1
P 5	0.653*	0.898	0.003+
P 6	0.971	0.904	0.522
P 7	0.881*	0.935	0.67
P 8	0.969	1.0	0.294
P 9	1.0	0.971	0.318
P 10	1.0	1.0	1
P 11	1.0	1.0	1
P 12	1.0	1.0	1
P 13	1.0	0.907	0.067
P 14	0.972	1.0	0.317
P 15	1.0	0.944	1
P 16	0.972	0.969	0.942

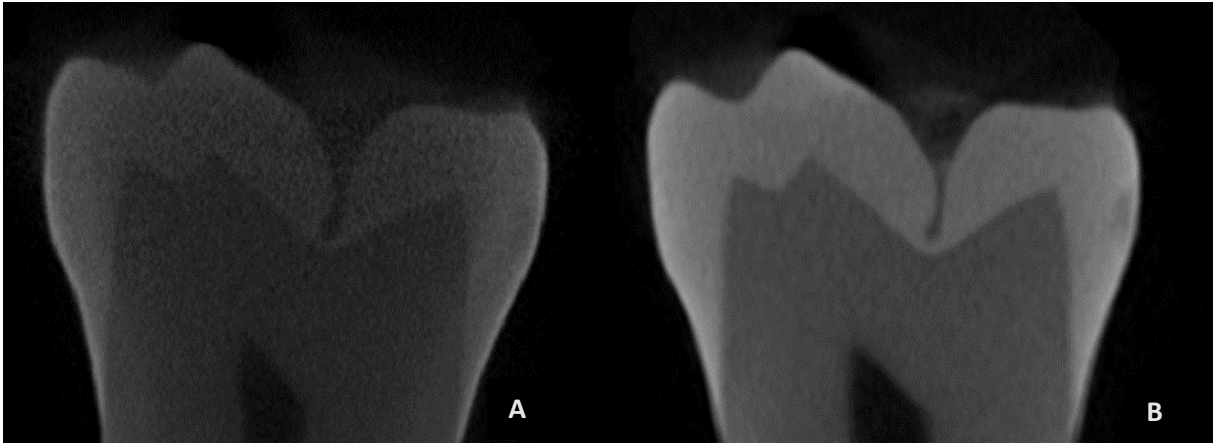
P: protocol.

*Significant differences within the same column.

+Significant difference within the same line.

Figure Caption

Figure 1. Coronal reconstructions, images of protocol 5 (A) and 12 (B) from the Skyscan 1774 device, evidencing differences in the visibility of existing incipient caries lesions.

Figure 1

2 ARTIGO

2.2 Artigo 2: Beam Hardening Correction Tool improves the diagnosis of incipient caries lesions in Micro-CT images

Karla Rovaris, DDS, MS¹

Saulo Leonardo Sousa Melo, DDS, MSD, PhD, MS²

Polyane Mazucatto Queiroz DDS, MS¹

Carolina Loch, BS, MS, PhD³

Donald R. Schwass, DDS, MS, PhD⁴

Francisco Haiter-Neto, DDS, MS, PhD¹

¹Department of Oral Diagnosis. Piracicaba Dental School. University of Campinas, Brazil.

²Department of Oral Pathology, Radiology and Medicine. College of Dentistry. University of Iowa, USA.

³Department of Oral Sciences, Faculty of Dentistry, University of Otago, Dunedin, New Zealand.

⁴Clinical Director, Office of the Dean, Faculty of Dentistry, University of Otago, Dunedin, New Zealand

Corresponding author:

Karla Rovaris

Piracicaba Dental School, Department of Oral Diagnosis, Area of Oral Radiology

901, Limeira Avenue, Zip code: 13414-903, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil

Phone/fax number: +55 (19) 2106-5327

Abstract

Objective: To evaluate the effect of Beam Hardening Correction tool (BHC) for Microtomography images used in the diagnosis of incipient proximal caries lesions.

Methods: Six posterior teeth, with 6 sound proximal surfaces and 6 containing natural white spot lesions, were scanned using SkyScan1174 device. Each tooth was scanned 16 times, due to the combination of the acquisition parameters, and reconstructed 3 times, applying different levels of BHC (0,15 and 30%). The 288 datasets were analysed by three examiners. Gold standard was obtained by the microscopic analyses under polarized light. Area under the ROC curve was obtained for each protocol and the BHC parameter was isolated, to individually observe the influence of this parameter of reconstruction. **Results:** Microtomography images were accurate for the diagnosis of incipient caries lesions even without using the BHC tool. Accuracy was perfect in 50% of the protocols without BHC. When adding the artifact correction the number of protocols that reached perfect accuracy rose to 81.25%. No difference was found between the protocols that used 15 or 30% BHC. Only in four confrontations was found statistically significant difference, images that had BHC were more accurate. Two protocols that didn't use the BHC, reached accuracy scores of 0.653 and 0.881 and were improved to perfect accuracy with BHC application. **Conclusions:** Micro-CT showed an excellent accuracy to detect proximal incipient caries lesions. Although there was no statistically significant difference between the groups (0, 15, 30%), BHC increased the overall accuracy of protocols and corrected poor protocols results.

Keywords: X-Ray Microtomography; Dental Caries; Diagnostic Imaging.

Introduction

The computed microtomography (Micro-CT) has been validated as a three-dimensional *in vitro* method of access and analysis of trabecular bone¹ and has been used expressively in dentistry, especially in endodontics.^{2,3} It consists of a non-destructive and accurate method of evaluating the geometry of mineralized structures.

Microtomographic technology has also been investigated in the detection of proximal caries lesions^{4,5} as a possible substitute for histological analysis. One study reported a high correlation with no statistical difference between Micro-CT and histology, suggesting the Micro-CT as a method of choice for the detection of proximal caries in first molars.⁶ On the other hand, a different group applied similar methodology to evaluate non-cavitated caries lesions using a single scanning and imaging reconstruction protocol, and found that Micro-CT did not establish satisfactory agreement with the histological analysis. They concluded that Micro-CT was not an effective alternative for the detection of proximal caries.⁷

The polychromatic nature of the x-rays is inherently linked to beam hardening. This phenomenon is due to the absorption of some photons by the surface of the material while the more penetrating photons continue the route through it. Given that the less penetrating photons are being blocked by the material, the average energy of the beam increases, i.e. the beam becomes harder and more penetrating. This behavior may result in images presenting an area of greater radiopacity at its periphery, even when the material presents a homogeneous density.⁸⁻¹¹

The effects of beam-hardening artifacts on *in vitro* caries models have been quantitatively tested.¹⁰ There are two main ways to reduce the generation and the effects of beam hardening: (1) by using physical filters; or (2) by applying the Beam

Hardening Correction tool (BHC). Single (Al) and combined (Al/Cu) component filters have been individually used in researches, but, to the best of our knowledge, have never been confronted.^{12,13} Energy acquisition parameters, several filters, and the BHC were tested on the improvement of the image quality, in an attempt to validate Micro-CT when using transverse microradiography (TMR) as the gold standard. The 0.5mm-Al filter and the non-application of BHC were associated to worse results, and were not correlated to TMR, unlike the other protocols.¹⁴

The diagnostic value of Micro-CT for the evaluation of carious lesions was already investigated, but there is a gap on how scanning and reconstruction settings may affect the image quality. The correction of beam hardening is of paramount importance in studies that deal with incipient caries lesions since it impairs the density of the outermost enamel layer. Due to the need for testing these parameters, the present study aimed to evaluate the effect of a BHC on Micro-CT images used in the diagnosis of incipient caries lesions.

Material and Methods

Sample preparation

The institutional review board approval was obtained and 6 extracted human posterior teeth resulting in 12 surfaces, 6 sound surfaces and 6 presenting natural white spot lesions, were collected and subjected to clinical and radiographic inspection to be included in the sample of this study. Exclusion criteria consisted of teeth with cavitated caries lesions and restorations. Periapical radiographs were obtained with the paralleling technique, using the dental intraoral digital system VistaScan (Dürr Dental, Beitigheim-Bissingen, Germany), images were acquired with 7 mA, 70 kVp and 0.06 s.

Images acquisition

Micro-CT scans were performed in the Skyscan 1174 (Bruker, Kontich, Belgium) at 50 kV and 800 μ A. The parameters used to acquire the images are shown in Table 1.

Each tooth was scanned on 16 different combinations of the parameters, and 6 teeth were used, a total of 96 scans were obtained. Then, all the datasets were reconstructed 3 times, without applying BHC and using 15 and 30% of BHC (Fig.1), resulting in 288 groups of images. The ring artefact correction (RAC) value was maintained for all datasets. The protocols used are shown in Table 2.

Image assessment

Datasets were randomized and different positions were adopted for the same tooth to minimize the memorization of the lesions by the evaluators. These variations were accomplished after the reconstruction of the images, using the DataViewer software (Bruker, Kontich, Belgium); no variation of position was adopted on the scanning process.

Three oral radiologists with more than 5 years of experience in diagnostic imaging independently evaluated the images. The evaluators were calibrated through demonstrative training on the use of the Dataviewer software (Bruker, Kontich, Belgium). The evaluation was conducted 3 times per week and only 30 datasets per time, to avoid the memorization of the teeth by the examiners and visual fatigue. The total volume of the teeth was analysed dynamically.

The 288 datasets were evaluated. In order to classify the presence and absence of caries lesions, the evaluators used a scale of 5 points: 1 - absent, 2 - probably absent, 3 - uncertain, 4 - probably present and 5 - present. Thirty per cent of

the images were re-evaluated, 1 month after finishing the first evaluation in order to calculate the intra/inter-examiner agreement.

Histological preparation and examination

The sample was cleaned with ethanol and individually embedded in epoxy resin (Epofix Cold Setting Embedding Resin, Struers, Copenhagen, Denmark). After sitting for 24hs, the blocks were serially sectioned into 1000 µm thick sections in the mesio-distal direction, using a 300 µm diamond-watered blade. The tooth sections were polished under irrigation to reach the approximate thickness of 100 µm. During this process, the slices were constantly checked under the microscope to avoid overgrinding and loss of the carious lesion. Sections were ultrasonically cleaned and slices were mounted using transparent varnish. Two experienced and pre-calibrated observers examined the sections using a Leica DMLP light microscope (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) under polarized light. A two-point scale was used to identify the presence or absence of caries lesions, as follows: 0 – absence, 1 – presence.

Statistical Analysis

Data were tabulated and the area under the ROC curve, representing the accuracy, was obtained for each protocol. The BHC parameter was isolated to observe its influence on the image individually, and test t was used. The significance level was set at 5%. The software used for statistical analysis was MedCalc 15.8 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Results

Microtomography images were accurate for the diagnosis of incipient caries lesions even without using the BHC tool. In 50% of the protocols with 0% BHC, accuracy was perfect in relation to histology. When adding the BHC the number of protocols that reached perfect accuracy rose to 81.25%.

Although this improvement of accuracy with the application of the correction occurred, of the 32 comparisons between the protocols without and with (15 or 30%) BHC, only in four confrontations statistically significant difference $p < 0,05$ (Table 3) was found. And when there was a difference, the images that had correction of BH were more accurate compared to those that did not have BHC. Protocols with accuracy scores of 0.653 and 0.881 changed to perfect accuracy with BHC application. No difference was found between the protocols that used 15 or 30% BHC.

In the Table 4 are presented the Kappa index values for intra and inter-examiner agreement for the detection of carious lesion. According to Landis & Kock (1977)¹⁵, it is possible to observe that the intra and inter-examiner agreement for the diagnosis of caries lesion was almost perfect.

Discussion

It is recommended that sample section should be avoided in order to preserve it, so the future requires non-destructive methods, which, after being validated against the reference methods, serve as a gold standard.¹⁶ Microtomography offers innovation and enable quantitative and qualitative in vitro study of human hard tissues without the need to destroy the specimen.⁴

Histological examination is the gold standard among the tools for *ex vivo* diagnosis of carious lesions, which is able to illustrate the true anatomic-pathological condition of the tissue.¹⁷ Despite its proven superiority, this method also presents some deficiencies, such as: possible damage to the carious tissue during the section of the tooth; the true depth of the lesion may be lost between histological sections; the long time to process the samples.^{18,19}

The intra and inter-examiner agreement showed values close to perfection.¹⁵ Micro-CT was consistent even in the detection of incipient lesions like white spots without any evidence of cavitation.

The two protocols (13 and 19) with lower accuracy (0.653 and 0.881) did not use the BHC and were acquired with worse quality scanning parameters, the filter used was the less thick, 0.5mm Al. The combination of these worse parameters with the non-use of BHC resulted in images of doubtful quality for the diagnosis of incipient caries lesions. Even in studies that did not aim to test the quality of the Micro-CT images, the importance of the quality of images is emphasized and placed as a very important factor to make the method accurate.²⁰

A pilot study was performed to choose the level of correction to be used in this study and corrections over 30% worsened the images, so the levels of 15% and 30% were chosen. After an appropriate correction of beam hardening, the effect of beam hardening should disappear.¹⁰ In spite of presenting different methodologies, the use of BHC, even without being the tested parameter, has already been recommended in other studies that used samples of sound and/or demineralized dental tissues.^{21,22}

In the present study, the BHC was able to improve the images of the worst protocols to the point of obtaining a perfect accuracy, the tool played an extremely

important role. On an in vitro caries model, when comparing the effect of BHC on the images of a polychromatic Micro-CT, based on a monochromatic source, the authors stated that after the correction the diagnostic error index of the two groups of images (polychromatic and monochromatic) is equal, showing the efficiency of the tool in correcting the effects of the beam hardening artifact.¹⁰ Other studies of similar methodology also found a worse performance when the BHC was not employed.¹¹

Evaluating the most varied objectives, but having in common the model of Micro-CT images of teeth with carious lesions, all studies used devices that reached about 100kVp.^{5,6,7,10,11,20,22,23} In a previous study devices of 50kVp and 100kVp were compared and no difference was found between them, and the 50kVp device had perfect accuracy in a greater number of times, which justified the use of images of this device for the BHC test. The present study allows the use of lower energy devices with satisfactory and perfectly accurate results.

In conclusion, the use of the BHC tool is indicated to achieve perfect results when using Micro-CT to detect incipient caries lesions. As the use of BHC resulted in perfect accuracy for all protocols, its preferable that users choose those who requires less time of acquisition and processing.

REFERENCES

- 1- Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23: 59–66.
- 2- Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *International Endodontic Journal* 2011; 44: 148–53.
- 3- Peters OA; Paqué F. Root canal preparation of maxillary molars with the self-adjusting file: a micro-computed tomography study. *J Endod* 2011; 37(1): 53-7.
- 4- Schwass DR, Swain MV, Purton DG, Leichter JW. A system of calibrating microtomography for use in caries research. *Caries Research* 2009;43(4):314-21.
- 5- Cochrane NJ, Anderson P, Davis GR, Adams GG, Stacey MA, Reynolds EC. An x-ray microtomographic study of natural white-spot enamel lesions. *Journal of Dental Research* 2012;91(2):185-191.
- 6- Soviero VM, Leal SC, Silva RC, Azevedo RB. Validity of Micro-CT for in vitro detection of proximal carious lesions in primary molars. *Journal of Dentistry* 2010; 40:35-40.
- 7- Mitropoulos P, Rahiotis C, Stamatkis H, Kkaboura A. Diagnostic performance of visual caries classification system ICDAS II versus radiography and micro-computer tomography for proximal caries detection: an in vitro study. *Journal of Dentistry* 2010; 38:859-867.
- 8- Zou W, Hunter N, Swain MV. Application of polychromatic Micro-CT for mineral density determination. *Journal of Dental Research* 2011;90:18-30.
- 9- Mulder L, Koolstra JH, Van Eijden TM. Accuracy of Micro-CT in the quantitative determination of the degree and distribution of mineralization in developing bone. *Acta Radiologica* 2004;45:769-77.
- 10- Kovacs M, Danyi R, Erdelyi M, Fejerdy P, Dobo-Nagy C. Distortional effect of beam-hardening artifacts on Micro-CT: a simulation study based on na in vitro caries model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:591-599.
- 11- Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Effects od CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assesment using micro-computed tomography. *Journal of Dentistry* 2011;39:405-413.

- 12- Lo EC, Zhi QH, Itthagarun A. Comparing two quantitative methods for studying remineralization of artificial caries. *Journal of Dentistry* 2010;38:352-59.
- 13- Neves AA, Coutinho E, Vivian CM, Jaecques SV, Van Meerbeek B. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. *Dental Materials* 2010;26:579-88.
- 14- Hamba H, Nikaido T, Sadr A, Nakashima S, Tagami J. Enamel lesion parameter correlation between polychromatic Micro-CT and TMR. *Journal of Dental Research* 2012;91(6):586-91.
- 15- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
- 16- Anderson P, Elliott JC, Bode U, Jones SJ. A comparison of the mineral content of enamel and dentine in human premolars and enamel pearl measured by x-ray microtomography. *Archives of Oral Biology* 1996; 41:281-290.
- 17- Hintze H, Wenzel A. Influence of the validation method on diagnostic accuracy for caries. A comparison of six digital and two conventional radiographic systems. *Dentomaxillofacial Radiology* 2002;31:44-49.
- 18- Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Research* 2008;42:79-87.
- 19- Haiter-Neto F, dos Anjos Pontual A, Frydenberg M, Wenzel A. Detection of non-cavitated approximal caries lesions in digital images from seven solid-state receptors with particular focus on task-specific enhancement filters. An ex vivo study in human teeth. *Clinical Oral Investigations* 2008;12:217-223.
- 20- Taylor AM, Satterthwaite JD, Ellwood RP, Pretty IA. An automated assessment algorithm for micro-CT images of occlusal caries. *The Surgeon* 2010;8:334-40.
- 21- Clementino Luedman TN, Kunzelmann KH. Mineral concentration of natural human teeth by a commercial micro-CT. *Dental Materials Journal* 2006;25:113-19.
- 22- Neves A de A, Coutinho E, Vivan Cardoso M, Jaecques SV, Van Meerbeek B. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. *Dental Material* 2010;26:579-88.
- 23- Schwass DR, Leichter JW, Purton DG, Swain MV. Evaluating the efficiency of caries removal using an Er:YAG laser driven by fluorescence feedback control. *Archives of oral Biology* 2013;58:603-10.

Tables

Table 1. Parameters used to acquire the images.

Scanning	
FILTER	
0.5mm Al	1mm Al
ROTATION STEP	
0.3°	0.7°
FRAME	
1	3
VOXEL SIZE	
14.1µm	
ROTATION	
180°	360°

Tables

Table 2. Protocols resulting from different acquisition and reconstruction parameters combination.

PROTOCOL	FRAME	ROT STEP	ROTATION	AI FILTER (mm)	BHC
P 1	1	0.3°	180°	0.5	0
P 2	1	0.3°	180°	0.5	15
P 3	1	0.3°	180°	0.5	30
P 4	1	0.3°	360°	0.5	0
P 5	1	0.3°	360°	0.5	15
P 6	1	0.3°	360°	0.5	30
P 7	3	0.3°	180°	0.5	0
P 8	3	0.3°	180°	0.5	15
P 9	3	0.3°	180°	0.5	30
P 10	3	0.3°	360°	0.5	0
P 11	3	0.3°	360°	0.5	15
P 12	3	0.3°	360°	0.5	30
P 13	1	0.7°	180°	0.5	0
P 14	1	0.7°	180°	0.5	15
P 15	1	0.7°	180°	0.5	30
P 16	1	0.7°	360°	0.5	0
P 17	1	0.7°	360°	0.5	15
P 18	1	0.7°	360°	0.5	30
P 19	3	0.7°	180°	0.5	0
P 20	3	0.7°	180°	0.5	15
P 21	3	0.7°	180°	0.5	30
P 22	3	0.7°	360°	0.5	0
P 23	3	0.7°	360°	0.5	15
P 24	3	0.7°	360°	0.5	30
P 25	1	0.3°	180°	1.0	0
P 26	1	0.3°	180°	1.0	15
P 27	1	0.3°	180°	1.0	30
P 28	1	0.3°	360°	1.0	0
P 29	1	0.3°	360°	1.0	15
P 30	1	0.3°	360°	1.0	30
P 31	3	0.3°	180°	1.0	0
P 32	3	0.3°	180°	1.0	15
P 33	3	0.3°	180°	1.0	30
P 34	3	0.3°	360°	1.0	0
P 35	3	0.3°	360°	1.0	15
P 36	3	0.3°	360°	1.0	30
P 37	1	0.7°	180°	1.0	0
P 38	1	0.7°	180°	1.0	15
P 39	1	0.7°	180°	1.0	30
P 40	1	0.7°	360°	1.0	0

P 41	1	0.7°	360°	1.0	15
P 42	1	0.7°	360°	1.0	30
P 43	3	0.7°	180°	1.0	0
P 44	3	0.7°	180°	1.0	15
P 45	3	0.7°	180°	1.0	30
P 46	3	0.7°	360°	1.0	0
P 47	3	0.7°	360°	1.0	15
P 48	3	0.7°	360°	1.0	30

Tables

Table 3. Area under the ROC curve for each protocol tested and p-value of all the protocols confrontations.

Protocols	Area under ROC			<i>p-value</i>		
	0% BHC	15% BHC	30% BHC	0vs.15	0vs.30	15vs.30
P1vs.P2vs.P3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P4vs.P5vs.P6	0.971	1.0	1.0	0.318	0.318	1.0
P7vs.P8vs.P9	0.969	1.0	1.0	0.294	0.294	1.0
P10vs.P11vs.P12	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P13vs.P14vs.P15	0.653	0.969	1.0	<0.001*	<0.001*	0.318
P16vs.P17vs.P18	0.971	1.0	1.0	0.318	0.318	1.0
P19vs.P20vs.P21	0.881	1.0	1.0	0.027*	0.027*	1.0
P22vs.P23vs.P24	0.969	1.0	1.0	0.294	0.294	1.0
P25vs.P26vs.P27	1.0	1.0	0.972	1.0	0.317	0.317
P28vs.P29vs.P30	1.0	0.998	0.965	0.479	0.277	0.273
P31vs.P32vs.P33	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P34vs.P35vs.P36	1.0	0.972	1.0	0.317	1.0	0.317
P37vs.P38vs.P39	1.0	0.972	1.0	0.317	1.0	0.317
P40vs.P41vs.P42	0.972	1.0	0.997	0.317	0.383	0.479
P43vs.P44vs.P45	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
P46vs.P47vs.P48	0.972	0.972	1.0	1.0	0.317	0.317

Vs. Versus.

*Significant difference on paired comparison.

Tables

Table 4. Kappa index of intra and inter-rater agreement for the diagnosis of carious lesion.

	E1	E2	E3
E1	0,894	0,883	0,881
E2	-	0,935	0,875
E3	-	-	0,928

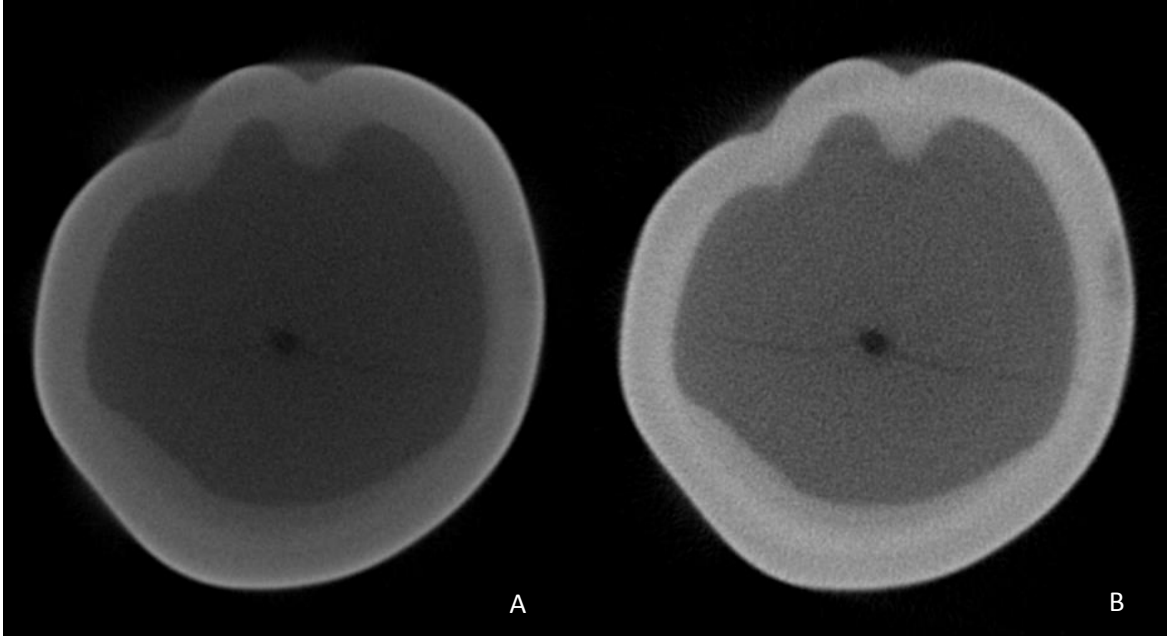
E:examiner.

Figure Caption

Figure 1. Axial reconstructions, without BHC (A) and with 30% BHC (B), evidencing the difference in visibility of the existing incipient caries lesion.

Figure

Figure 1



3 DISCUSSÃO

Acurácia perfeita foi encontrada na grande maioria dos protocolos analisados. Dois estudos principais testaram a acurácia da Micro-CT no diagnóstico de lesões de cáries proximais utilizando a histologia como padrão-ouro (Mitropoulos et al., 2010; Soviero et al., 2012). Corroborando com os resultados da presente pesquisa, ao analisar lesões cavitadas, Soviero et al. (2012) consideraram que a Micro-CT é um instrumento de diagnóstico confiável. Por outro lado, Mitropoulos et al. (2010) relataram que a Micro-CT não é um método confiável para diagnosticar lesões proximais de cárie. Neste estudo, apenas lesões não cavitadas foram analisadas (Mitropoulos et al., 2010).

Foram avaliados dois microtomógrafos diferentes, o SkyScan 1174 e SkyScan 1172 (Bruker, Kontich, Belgium), a principal diferença entre os dois é a potência, o aparelho 1174 trabalha com o máximo de 50kVp e 800 μ A e o 1172 com 100kVp e 100 μ A. Esperava-se que o aparelho com maior energia tivesse resultados melhores, devido à grande densidade do esmalte e a ocorrência do artefato de endurecimento do feixe, porém, os aparelhos não mostraram diferença significativa e surpreendentemente o aparelho 1174 teve um maior número de protocolos com acurácia perfeita. Vale salientar que a qualidade da imagem não foi avaliada, apenas a capacidade de diagnóstico das lesões de interesse. Em um estudo em que o modelo de cárie de esmalte foi utilizado e a microamperagem foi variada, também não foi observada influência direta da variação de energia no valor de diagnóstico das imagens avaliadas (Hamba et al., 2012).

Embora na maioria dos casos não tenha sido observada diferença significativa entre os fatores isolados, conforme demonstrado nos resultados, observou-se que o protocolo no qual todos esses fatores de "baixa qualidade" (1 frame, parcela de giro de 0,7°, filtro Al de 0,5mm e 180° de rotação) foram utilizados combinados (Protocolo 5), houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a todos os demais protocolos estudados, com menor valor de acurácia para este protocolo. Observou-se também que o protocolo semelhante a este, mas que houve apenas um aumento no número de *frames* para 3 (Protocolo 7), também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à maioria dos protocolos realizados.

Todos os demais protocolos não diferiram entre si. Vale salientar que neste caso, protocolos que demandam menos tempo e menor espaço para armazenamento podem ser utilizados sem perda no diagnóstico.

É interessante realçar que os dois protocolos de menor precisão, que obtiveram resultados de acurácia de 0,653 e 0,881, apresentados no primeiro artigo, não utilizaram o BHC. Quando a ferramenta de BHC foi aplicada sobre as imagens desse protocolo de aquisição, a acurácia foi perfeita. A acurácia perfeita foi encontrada em 50% dos protocolos que não utilizaram o BHC, quando a ferramenta foi utilizada, 81,25% dos protocolos foram perfeitos em detectar as lesões de cárie incipientes, o que demonstra o poder da ferramenta tanto de corrigir imagens inicialmente insatisfatórias como de aumentar a taxa de acerto das respostas. Em estudos de metodologia similar, porém de caráter quantitativo, o BHC vem sendo preconizado como importante aliado quando se trabalha com lesões de cárie (Clementino Luedman e Kunzelmann, 2006; Neves et al., 2010; Kovacs et al., 2009).

A concordância intra e inter-examinador mostrou valores próximos à perfeição, demonstrando que o Micro-CT é consistente na avaliação de lesões de mancha branca sem qualquer evidência de cavitação.

A histologia é apresentada como o método padrão-ouro para estudos de cariologia, mas apesar disso, os autores realçam suas limitações, uma delas é o tempo exigido para o seu processo. O método por ser destrutivo impossibilita o acompanhamento de lesões de carie produzidas *in vitro* e nos casos de lesões de cárie muito pequenas torna-se muito difícil obter o corte específico no qual a lesão apresenta sua maior e real profundidade (Wenzel e Hintze, 1999). Durante o processamento das amostras do presente estudo, não ocorreram intercorrências que inviabilizassem a posterior análise, porém, realçamos o cuidado e tempo necessários para uma fiel avaliação das lesões de carie incipientes através deste método.

Recomenda-se que a secção de amostra seja evitada a fim de preservá-las, de modo que o futuro requer métodos não destrutivos que, depois de serem validados em relação aos métodos de referência, serviriam como padrão-ouro (Anderson et al., 1996). Após a validação, que foi um dos objetivos deste estudo e

dos demais citados (Mitropoulos et al., 2010; Soviero et al., 2012), a microtomografia computadorizada vem oferecendo inovação e permite a avaliação quantitativa e qualitativa de forma acurada para o estudo *in vitro* de tecidos duros humanos sem a necessidade de destruir a amostra (Schwass et al., 2009).

4 CONCLUSÃO

- A Micro-CT mostrou-se acurada na identificação de lesões de mancha branca proximais não cavitadas em dentes posteriores.
- Não foi observada influência significativa dos parâmetros de aquisição, quando isolados, para o diagnóstico das lesões.
- Foi observada diferença significativa entre dois protocolos e os demais, os quais agrupavam os piores parâmetros de aquisição e a não utilização do BHC. Os mesmos tiveram resultados inferiores e são contraindicados para a presente finalidade.
- Apesar de não ter sido observada diferença estatística significativa, na maior parte das vezes, entre os grupos (0,15,30% de BHC). O BHC aumentou a acurácia geral dos protocolos e corrigiu dois protocolos de resultados insatisfatórios, estes apresentaram diferença estatística significativa entre os resultados das imagens com e sem BHC.

REFERÊNCIAS

- 1- Anderson P, Elliott JC, Bode U, Jones SJ. A comparison of the mineral content of enamel and dentine in human premolars and enamel pearl measured by x-ray microtomography. *Arch Oral Biol* 1996; 41:281-290.
- 2- Chalas R et al. Observations of mineralised tissues of teeth in X-ray micro-computed tomography. *Folia Morphol (Warsz)* 2017;76(2):143-148.
- 3- Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Basle MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and micro CT. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; 20: 1177–1184.
- 4- Clementino_Luedman TN, Kunzelmann KH. Mineral concentration of natural human teeth by a commercial micro-CT. *Dental Materials Journal* 2006;25:113-19.
- 5- De Oliveira RCG, Leles CR, Lindh C, Ribeiro-Rotta RF. Bone tissue microarchitectural characteristics at dental implant sites. Part 1: Identification of clinical-related parameters. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011; 000–000.doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02243.x.
- 6- Garib DG, Raymundo Junior R, Raymundo MV, Raymundo DV, Ferreira SN. Tomografia computadorizada de feixe cônico (Cone beam): entendendo este novo método de diagnóstico por imagem com promissora aplicabilidade na Ortodontia. *Maringá* 2007; 12(2): 139-56.
- 7- Haiter-Neto F, dos Anjos Potual A, Frydenberg M, Wenzel A. Detection of non-cavitated approximal caries lesions in digital images from seven solid-state receptors with particular focus on task-specific enhancement filters. An ex vivo study in human teeth. *Clinical Oral Investigations* 2008;12:217-23.
- 8- Hamba H, Nikaido T, Sadr A, Nakashima S, Tagami J. Enamel lesion parameter correlations between Polychromatic Micro-CT and TMr. *Journal of Dental Research* 2012;91(6):568-591.
- 9- Hintze H, Wenzel A. Influence of the validation method on diagnostic accuracy for caries. A comparison of six digital and two conventional radiographic systems. *Dentomaxillofacial Radiology* 2002;31:44-49.
- 10- Huysmans MC, Logbottom C. The challenges of validating diagnostic methods and selecting appropriate gold standards. *Journal of Dental Research* 2004;83:48-52.

- 11-Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Research* 2008;42:79-87.
- 12-Kovacs M, Danyi R, Erdelyi M, Fejerdy P, Dobo-Nagy C. Distortional effect of beam-hardening artifacts on Micro-CT: a simulation study based on an in vitro caries model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:591-599.
- 13-Kucuk EB, Malkoc S, Demir A. Microcomputed tomography evaluation of white spot lesion remineralization with various procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016;150(3):483-90.
- 14-Mitropoulos P, Rahiotis C, Stamatkis H, Kkaboura A. Diagnostic performance of visual caries classification system ICDAS II versus radiography and micro-computer tomography for proximal caries detection: an in vitro study. *Journal of Dentistry* 2010; 38:859-867.
- 15-Mizutani R, Takeuchi A, Uesugi K, Ohyama M, Takekoshi S, Osamura RY, Suzuki Y. Three-dimensional microtomographic imaging of human brain cortex. *Brain Res*. 2008a; 1199:53–61.
- 16-Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23: 59–66.
- 17-Neelakantan P, Subbarao C, Subbarao CV. Comparative evaluation of modified canal staining and clearing technique, cone-beam computed tomography, peripheral quantitative computed tomography, spiral computed tomography, and plain and contrast medium-enhanced digital radiography in studying root canal morphology. *Journal of Endodontics*. 2010 ; 36(9):1547–51.
- 18-Neves A de A, Coutinho E, Vivan Cardoso M, Jacques SV, Van Meerbeek B. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. *Dental Material* 2010;26:579-88.
- 19-Paquè F, Zehnder M, Marending M. Apical fit of initial K-files in maxillary molars assessed by micro-computed tomography. *International Endodontic Journal* 2010; 43: 328–335.

- 20-Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *International Endodontic Journal* 2011; 44: 148–53.
- 21-Patel S, Dawood A, Whaites E, Pitt Ford T. New dimensions in endodontic imaging: part 1. Conventional and alternative radiographic systems. *International Endodontic Journal* 2009; 42: 447:62.
- 22-Peters OA; Paqué F. Root canal preparation of maxillary molars with the self-adjusting file: a micro-computed tomography study. *J Endod* 2011; 37(1): 53-7.
- 23-Schwass DR, Swain MV, Purton DG, Leichter JW. A system of calibrating Microtomography for use in Caries Research. *Caries Research* 2009; 43:314-321.
- 24-Soviero VM, Leal SC, Silva RC, Azevedo RB. Validity of Micro-CT for in vitro detection of proximal carious lesions in primary molars. *Journal of Dentistry* 2012; 40:35-40.
- 25-Verma P; Love. A Micro CT study of the mesiobuccal root canal morphology of the maxillary first molar tooth. *Int Endod J* 2011; 44(3): 210-7.
- 26-Wenzel A, Hintze H. The choice of gold standard for evaluating tests for caries diagnosis. *Dentomaxillofacial Radiology* 1999;28:132-6.
- 27-Yamada M, Ide Y, Matsunaga S, Kato H, Nakagawa K. Three-dimensional analysis of mesiobuccal root canal of Japanese maxillary first molar using Micro-CT. *Bull Tokyo Dent Coll* 2011; 52(2): 77-84.
- 28-Zhao IS, Mei ML, Li QL, Lo EC, Chu CH. Arresting simulated dentine caries with adjunctive application of silver nitrate solution and sodium fluoride varnish: an in vitro study. *Int Dent J* 2017 Mar 22.
- 29-Zou W, Hunter N, Swain MV. Application of polychromatic μ CT for mineral density determination. *J. Dent. Res* 2011; 90:18–30.

Apêndice

Metodologia Expandida

Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp sob o CAAE 10762812.0.0000.5418.

Amostra

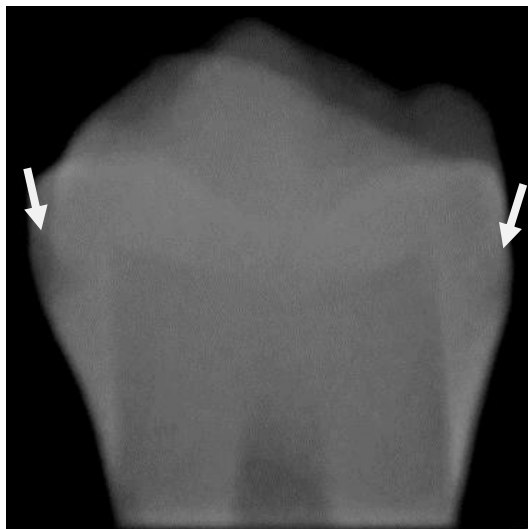
Seis dentes posteriores (12 faces proximais) provenientes do banco de dentes do departamento de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas foram utilizados neste trabalho. Os critérios de inclusão dessa amostra foram: ausência de cavidade e material restaurador nas faces proximais e oclusais; presença de lesão de mancha branca em no mínimo uma das faces proximais. Ou seja, das doze faces proximais utilizadas, 6 estavam hígidas e 6 com lesões incipientes de cárie. A figura 1 ilustra faces acometidas pela lesão de cárie incipiente.

Fig. 1. Fotografia dos dentes molar e pré-molar apresentando cárie incipiente em suas faces proximais.



Radiografias periapicais (Fig.2) foram realizadas, para certificar os critérios de inclusão e exclusão, utilizando o sistema digital VistaScan (Dürr Dental, Beitigheim-Bissingen, Germany); as imagens foram adquiridas com parâmetros de 7 mA, 70 kVp e 0.06 s. A técnica do paralelismo foi adotada para obtenção das radiografias.

Fig. 2. Radiografia do dente pré-molar apresentando cárie incipiente em suas faces proximais e ausência de material restaurador e cárie oclusal.



Aquisição das imagens (Microtomografia computadorizada)

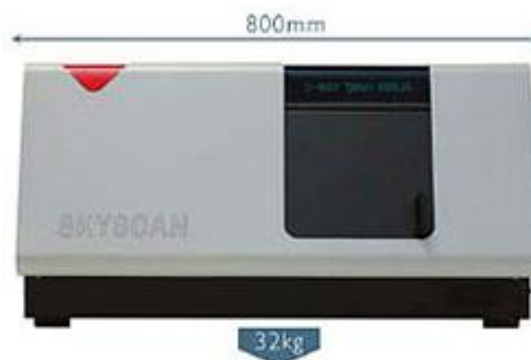
Dois microtomógrafos foram utilizados neste estudo, SkyScan 1172 e o 1174, ambos da empresa SkyScan (Bruker, Kontich, Belgium). Os mesmos foram escolhidos por serem os modelos mais frequentemente usados em pesquisas na área da Odontologia. Seguem os detalhes técnicos de cada modelo:

Fig. 3. Detalhes técnicos dos aparelhos SkyScan 1172 e 1174:

SkyScan 1172		
Fonte de Raios X: até 100 kV - 100 μ A - 10w	Detector CCD 11MP	Resolução máxima: 0.5 μ m



SkyScan 1174		
Fonte de Raios X: até 50 kV - 800 μ A - 40w	Detector CCD 1.3MP	Resolução máxima: 6 μ m



Uma calibração prévia aos escaneamentos foi realizada para ajustar o tempo de exposição necessário para cada filtro. Esse procedimento é feito de acordo com a medição da atenuação dos feixes de raios X sem a amostra (manual disponibilizado pela empresa foi seguido para tais calibrações). Vale salientar a importância desse passo, uma vez que o tempo de exposição adequado influencia na qualidade da imagem de microtomografia computadorizada.

Os dentes foram estabilizados no suporte do aparelho com cianoacrilato para evitar a movimentação durante a aquisição das imagens. Os parâmetros energéticos não foram variados entre as aquisições, os aparelhos funcionaram com sua potência máxima, SkyScan 1172 (Bruker, Kontich, Belgium) com 100kVp e 100 μ A e SkyScan 1174 (Bruker, Kontich Belgium) com 50kVp e 800 μ A. Os demais parâmetros variados durante a aquisição das imagens foram:

1172		1174	
FILTRO		FILTRO	
0,5mm Al	0,5mm Al+Cu	0,5mm Al	1mm Al
ROTATION STEP		ROTATION STEP	
0.3°	0.7°	0.3°	0.7°
FRAME		FRAME	
1	3	1	3
TAMANHO DO VOXEL		TAMANHO DO VOXEL	
14.1 μ m		14.1 μ m	
GIRO		GIRO	
180°	360°	180°	360°

Quanto aos parâmetros variados na aquisição:

Filtros: Foram utilizados dois tipos de filtros em cada um dos aparelhos. No aparelho 1172 estavam disponíveis os filtros de 0,5mm de alumínio e 0,5mm de alumínio + cobre. Já no aparelho 1174 foram utilizados os filtros de 0,5mm de alumínio e o filtro de 1mm de alumínio. A recomendação do manual dos aparelhos é que filtros mais espessos sejam utilizados quanto maior for a densidade da amostra.

Rotation step (parcela de giro): No aparelho de microtomografia computadorizada a amostra gira em torno do seu próprio eixo e a fonte e o receptor de imagem encontram-se estáticos. A parcela de giro consiste em pequenos movimentos de

rotação que a amostra faz para adquirir cada imagem, ou seja, se o *rotation step* escolhido for de 1°, a cada 1° de rotação uma bases será adquiridas. O manual do aparelho indica que quanto menor o detalhe a ser observado menor deve ser o passo dado, ou seja, menor deve ser a parcela de giro.

Frame averaging: A cada parcela de giro, um número x de imagens pode ser adquirida, ou seja, se a cada 1° quisermos 1 *frame*, uma imagem será gerada, se 2 *frames* forem solicitados do aparelho, duas imagens serão geradas. *Frame averaging* não é sinônimo de imagem base, não é observado o aumento no número de imagens base quando esse parâmetro é alterado pois uma média entre os frames adquiridos é utilizada.

Tamanho do voxel: É o tamanho da menor partícula da imagem. O microtomógrafo é um tomógrafo de feixe cônico de altíssima resolução, portanto, as particularidades do *voxel* se repetem nas duas técnicas.

Giro: Na microtomografia computadorizada as imagens podem ser adquiridas com a rotação total da amostra (360°) e com a rotação parcial da amostra (180°). A orientação dada pelo manual é de que giros totais devem ser utilizados em amostras densas, em que o feixe de raios X teria maior dificuldade de atravessar o material.

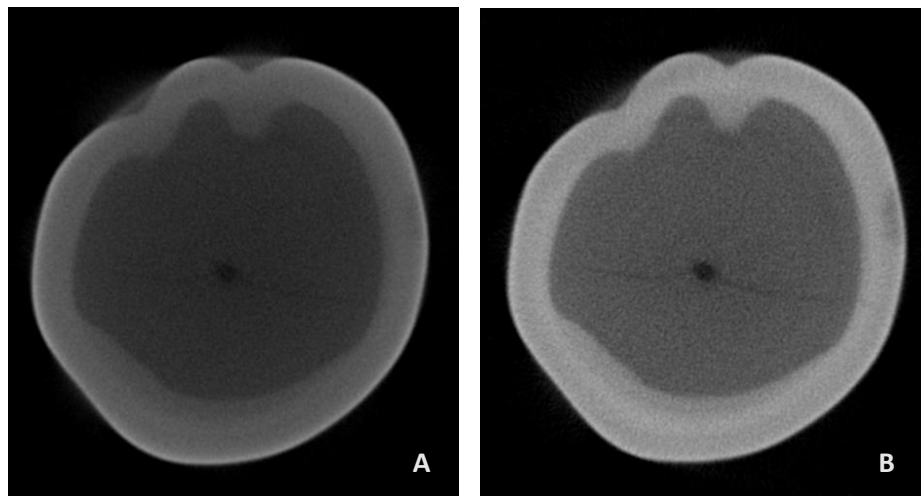
Reconstrução das imagens

RECONSTRUÇÃO		
BHC		
0	15	30
GIRO		
180°		360°
RAC		
7		

Quanto aos parâmetros variados ou utilizados na reconstrução:

Beam hardening correction (BHC): É a correção dos artefatos provenientes do endurecimento do feixe, na microtomografia computadorizada esse fenômeno se mostra mais evidente na diferença de densidade entre a borda mais externa e a borda mais interna do esmalte, diferença essa criada pela filtração dos feixes de raios X menos potentes pela superfície da amostra. Ou seja, a imagem sem correção apresenta a superfície do esmalte mais radiopaca do que sua porção mais interna. A ferramenta atua diminuindo a diferença de densidade entre as regiões do esmalte (Fig.4).

Fig. 4. Reconstruções axiais de imagens de Microtomografia computadorizada de um mesmo dente sem (A) e com aplicação (B) de 30% de BCH.



Ring artifact correction (RAC): É a correção do artefato em anel, inerente ao movimento de rotação que acontece durante a aquisição de imagem, esse artefato é bastante frequente nas imagens de microtomografia computadorizada. Esse parâmetro não foi variado, um valor médio escolhido entre as amostras foi utilizado.

Giro: As imagens foram adquiridas com um giro total da amostra e apenas no momento de reconstrução esse parâmetro foi variado. No protocolo de 180° apenas as imagens base da primeira metade do giro foram utilizadas para a reconstrução das amostras. No protocolo de 360° todas as imagens base foram utilizadas para a reconstrução das amostras. Todos os dentes foram escaneados partindo de uma posição original com a face vestibular voltada para a fonte de radiação.

Cada dente foi escaneado 32 vezes, 16 protocolos de escaneamento por aparelho, número resultante da combinação entre os parâmetros. Como foram utilizados 6 dentes, 192 escaneamentos foram feitos no total. Cada escaneamento foi reconstruído 3 vezes, portanto, foram geradas 576 pastas de arquivos no total.

Avaliação das imagens - Diagnóstico

Devido ao grande número de repetições de imagens adquiridas de uma mesma amostra/dente, para minimizar a memorização dos dentes e dos lados das lesões pelos avaliadores, diferentes posições foram adotadas para o mesmo dente. Ou seja, simulando a posição de um dente superior, simulando um dente inferior ou mesmo com a face lingual voltada para frente, dessa forma, a visualização e os lados das lesões estavam em constante alteração. Vale salientar que o longo eixo dos dentes sempre foi mantido alinhado aos planos de orientação, ou seja, nenhuma imagem foi avaliada de forma diagonal aos principais planos (axial, coronal e sagital). Estas diferenças de posição foram simuladas apenas por uma reorientação das imagens já reconstruídas utilizando o software Dataviewer (Bruker, Kontich, Belgium), não houve alteração de posição da amostra no momento da aquisição das imagens.

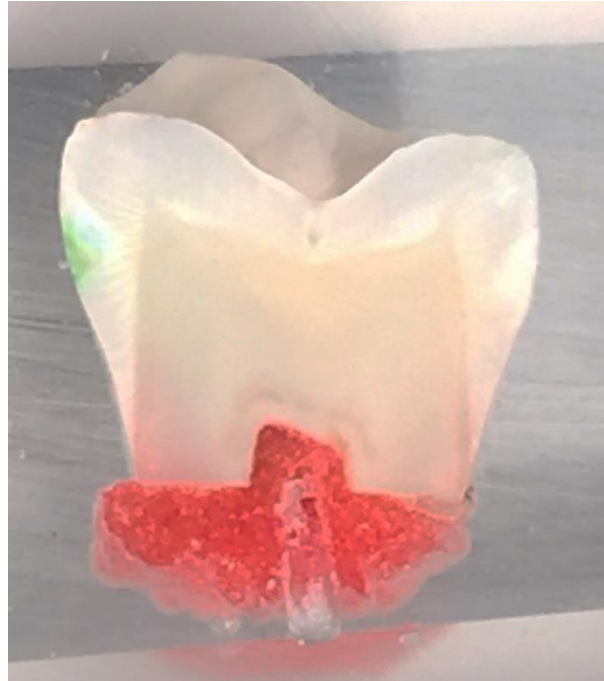
Os avaliadores foram calibrados por meio de treinamento demonstrativo de uso do *software* DataViewer (Bruker, Kontich, Belgium) e reconhecimento das lesões. Inicialmente, os 10 primeiros casos foram avaliados pelos três avaliadores separadamente, e foi feita a comparação entre estes resultados, desta vez, com os 3 avaliadores presentes. Diante do consenso de respostas corretas entre os avaliadores, foi dado prosseguimento nas avaliações.

Os avaliadores foram orientados da seguinte forma: à cada momento de avaliação, a qual só podia ser feita no máximo 3 vezes por semana, apenas 30 imagens deveriam ser avaliadas. Recomendações estas, com o intuito de evitar/diminuir a fadiga visual e a memorização das amostras. Os 576 grupos de imagens foram avaliados com o objetivo de classificar a presença e ausência das lesões de cárie, os avaliadores usaram uma escala de 5 pontos: 1 – ausente, 2 – provavelmente ausente, 3 – incerto, 4 – provavelmente presente e 5 – presente.

Preparo das amostras – Histologia

Depois de serem limpos com etanol, os dentes foram incorporados individualmente em resina acrílica (Epofix Cold Setting Embedding Resin, Struers, Copenhaga, Dinamarca). O tempo de solidificação levou 24 horas e depois os blocos foram seccionados em série em secções de 1000 μm de espessura na direção mesio-distal (Fig.5), utilizando um disco de diamante de 300 μm . As secções dos dentes foram lixadas sob irrigação para atingir a espessura de 100 μm , as fatias foram constantemente verificadas no microscópio (Fig.6) para evitar a destruição da região mais profunda da lesão cariada. Os resíduos sobre a amostra foram limpos utilizando o equipamento de ultrassom e depois o corte foi colado à lâmina de microscópio usando cola transparente.

Fig. 5. Fotografia do dente incluído em resina, no processo de preparo para a análise sob luz polarizada. Lesões incipientes de cárie visíveis em ambas as faces proximais.



Avaliação das imagens – Luz Polarizada

Dois observadores, diferentes dos avaliadores das imagens de microtomografia computadorizada, experientes e pré-calibrados, examinaram os cortes histológicos utilizando um microscópio Leica DMLP sob luz polarizada (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Alemanha) (Fig.7). Para classificar a presença e a ausência de lesões de cárie, os avaliadores utilizaram uma escala de 2 pontos: 0 – ausência, 1 – presença.

Fig. 6. Imagem de microscopia evidenciando a lesão de cárie, na face proximal de um dente pré-molar, atingindo apenas esmalte e sem cavar a estrutura.

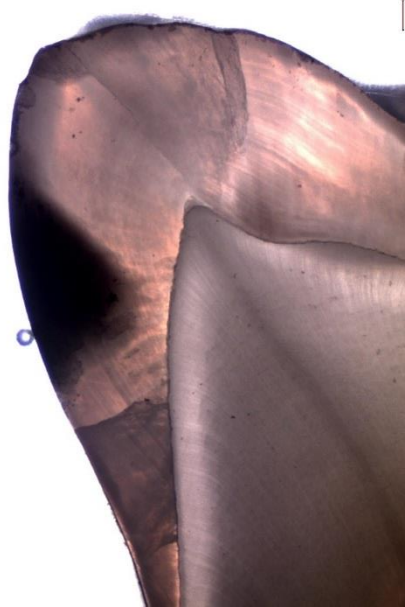
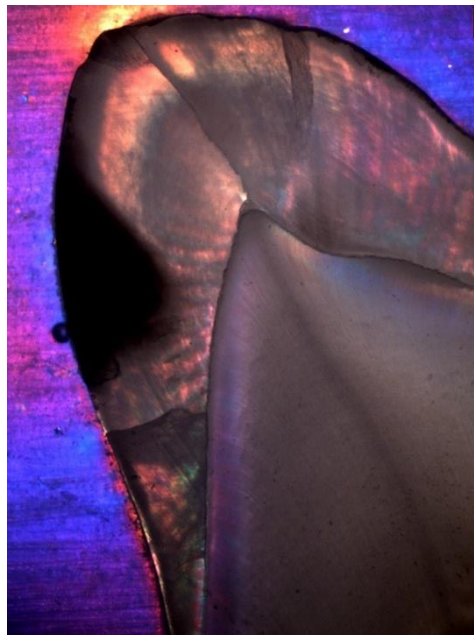


Fig. 7. Imagem de microscopia sob luz polarizada evidenciando a lesão de cárie, na face proximal de um dente pré-molar, atingindo apenas esmalte e sem cavar a estrutura.



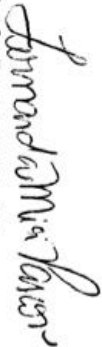



Análise dos dados

Os dados foram tabulados e a área sob a curva (ROC) foi obtida para cada protocolo. As áreas sob a curva ROC, que representam a acurácia, de todos os protocolos, foram comparadas entre dispositivos, usando teste t. Cada parâmetro foi isolado, a fim de observar individualmente a influência de cada parâmetro de aquisição/reconstrução na imagem, utilizando o teste t. Os protocolos combinados também foram comparados entre si usando ANOVA. Para todos os testes, a significância estatística foi estabelecida em 5%. Os testes foram realizados usando MedCalc 15.8 (MedCalc Software, Ostend, Bélgica).

ANEXO 1

Certificado emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas

	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</p>	
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação da correlação entre diferentes métodos de diagnóstico de lesões de cárie in vitro", protocolo CAE nº 10762812.0.0000.5418, dos pesquisadores Liana Matos Ferreira, Karla Rovaris da Silva e Francisco Haiter Neto, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 30 de março de 2017.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, certify that the project "Comparison of different types of image resolution in digital systems for the diagnosis of caries", CAE 10762812.0.0000.5418, of Liana Matos Ferreira, Karla Rovaris da Silva and Francisco Haiter Neto, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on March 03 2017.</p>		
 Prof. Fernanda Miori Pascon Vice Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jackie Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<p>Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparece como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>		

ANEXO 2

Comprovante de submissão do artigo

Submission Confirmation for Journal of Dentistry Entrada x  

 **Journal of Dentistry** <eesserver@eesmail.elsevier.com> 12:50 (Há 2 minutos) ☆  
para mim ▾

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#) x

Dear Ms. Rovaris,

Your submission entitled "Reliability of Micro-computed tomography acquisition protocols for the diagnosis of incipient caries lesions" has been received by the Journal of Dentistry.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/ijod/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Dentistry