Universidade do Grande Rio "Professor José de Souza Herdy"

UNIGRANRIO

ISBELIA DESIREE GAZZANEO RAUSEO

DESINFECÇÃO E MODELAGEM DE CANAIS RADICULARES EM FORMA DE "C" APÓS PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO UTILIZANDO DOIS PROTOCOLOS: ESTUDO CORRELATIVO USANDO MÉTODO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR E MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

DUQUE DE CAXIAS - RJ
2020

ISBELIA DESIREE GAZZANEO RAUSEO

DESINFECÇÃO E MODELAGEM DE CANAIS RADICULARES EM FORMA DE "C" APÓS PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO UTILIZANDO DOIS PROTOCOLOS: ESTUDO CORRELATIVO USANDO MÉTODO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR E MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Clínica e Experimental da Universidade do Grande Rio – Prof. José de Souza Herdy (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Endodontia).

ORIENTADORES
Profa. Dra. Isabela das Neves Rôças Siqueira
Prof. Dr. José Freitas Siqueira Jr.

DUQUE DE CAXIAS - RJ
2020

Ficha catalográfica

Isbelia Desiree Gazzaneo Rauseo

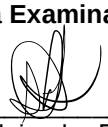
DESINFECÇÃO E MODELAGEM DE CANAIS RADICULARES EM FORMA DE C APÓS PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO UTILIZANDO DOIS PROTOCOLOS: ESTUDO CORRELATIVO USANDO MÉTODO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR E MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Tese apresentada à Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy" UNIGRANRIO para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

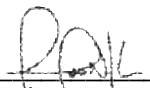
Área de Concentração:
Odontologia Clínica e Experimental

Aprovada em 25 de novembro de 2020

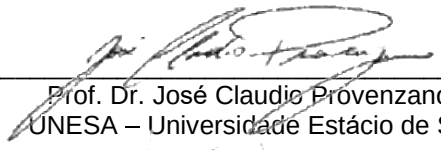
Banca Examinadora



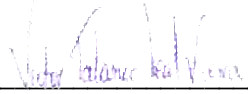
Prof. Dr. Alejandro Pérez Ron
UNIG – Universidade Iguaçu



Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio



Prof. Dr. José Claudio Provenzano
UNESA – Universidade Estácio de Sá



Profa. Dra. Victor Talarico Leal Vieira
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

DEDICATÓRIA

Á Deus por todas suas bendições e por permitir que eu fosse capaz de cumprir esta meta.

Á meus amados pais Nancys e Miguel por seu amor, incentivo e apoio incondicional todos os dias de minha vida, meus heróis, sem vocês nada seria possível. Os amo!!!.

Á Lucy e Zenobita (*in memorium*) os anjos que cuidam de mim do céu.

Á meu esposo Juan, o melhor companheiro e amigo, maior incentivador e exemplo a seguir, alma gêmea e amor da minha vida. Te amo!!!.

Á minhas hermas Mely e Ary, o melhor presente que Deus poderia me dar, amo vocês.

Á meu país, Venezuela, porque só com trabalho e estudo nós o levaremos adiante.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela vida, por ter saúde, por me permitir chegar até aqui, por me abençoar e dar forças para alcançar esse objetivo.

Ao Brasil e seu povo, por ter me oferecido a oportunidade de crescer profissionalmente da mão de pesquisadores do mais alto nível do mundo.

Á meus amados pais Nancys e Miguel. Obrigada por todo seu amor, incentivo e apoio incondicional todos os dias de minha vida. Por me ensinar o verdadeiro valor das coisas, a ser uma pessoa de bem, honesta e trabalhadora. Por todos os sacrifícios que fizeram ao longo de suas vidas por minhas hermas e por mim, assim como, para que eu pudesse estar aqui hoje. Tudo que conquistei até hoje deve-se ao amor e dedicação de vocês comigo. Meu amor por vocês é infinito.

Á meus mentores, Professor Doutor José Freitas Siqueira Junior e Professora Doutora Isabela das Neves Rôças Siqueira. Obrigada por todos seus ensinamentos, orientações, pela confiança e a oportunidade que me brindaram de aprender com os melhores pesquisadores do mundo. Por serem um exemplo de dedicação e competência na pesquisa em Microbiologia e Endodontia, contribuindo ao enriquecimento do conhecimento. É realmente uma honra trabalhar com vocês. Não tenho palavras para agradecer a paciência de vocês, dedicação, carinho e preocupação comigo.

Á meu esposo Juan Pacheco, amor da minha vida, cúmplice em todo momento e o melhor professor e companheiro de estudo que pude ter. Obrigada amor pelo apoio incondicional e pelos inúmeros conselhos. Ter feito o doutorado foi uma experiência extraordinária e compartilhar essa experiência com você foi o melhor que aconteceu em minha vida. Estou imensamente orgulhosa de você, você é meu exemplo a seguir. *Gracias infinitas amor, te todo!!!*

Ao Professor Doutor Flávio Rodrigues Ferreira Alves, pelo apoio inestimável e orientação na realização deste trabalho. Obrigada pelo estímulo, incentivo, exigências, ensinamentos e estar sempre disponível ante qualquer duvida, pela generosidade, suporte e amizade.

Aos Doutores Pablo Amoroso-Silva e Marília Marceliano-Alves, sem vocês não teria sido possível realizar este trabalho. Obrigada pela dedicação e ajuda, pelo tempo, ensinamentos e disponibilidade.

Á Patrícia Olivares, pelo apoio incondicional e risos compartidos na realização do presente trabalho.

Á minhas irmãs Mely e Ary, pelo carinho, apoio incondicional e palavras de encorajamento sempre que preciso. Eu sinto falta de vocês todos os dias da minha vida.

Á meus sogros, cunhadas e Nanda e Nina, pelo carinho e apoio.

Aos casais e amigos queridos Renata Val e Delmo Figueiró, Henrique Antunes e Suzana Fernandes Rempto Antunes e filhos, pelo carinho, amizade a ajuda brindada por vocês desde minha chegada ao Brasil, por tantos momentos compartidos e por me fazer sentir em casa e em família.

Á minhas queridas amigas Alejandra, Silvia e María Isabel, que sempre desde a distancia me brindaram tudo seu apoio e amizade incondicional. Saudades de vocês.

Á Flavia e Duda, pelo carinho, amizade e pelos tantos momentos e risos compartilhados.

Á minha amiga e colega Carol Alonso Amorim e família, pelo carinho, amizade e apoio brindado em momentos difíceis.

Ao Marlei Gomes da Silva, pela sua colaboração e grande contribuição na realização deste trabalho, sem a qual o presenta trabalho não teria sido possível.

Aos Professores pelos ensinamentos e dedicação ao longo do doutorado.

Aos colegas de doutorado, pelos momentos compartilhados, assim como a todos os que de uma ou outra forma colaboraram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Objetivo. Este estudo *ex vivo* comparou a capacidade de desinfecção e modelagem de dois protocolos de preparo em canais em forma de "C".

Métodos. Segundos molares inferiores com canais em forma de "C" do tipo I foram pareados com base na análise da microtomografía computadorizada (μCT) e distribuídos em 2 grupos. Os canais foram contaminados com cultura bacteriana mista e preparados por dois protocolos, ambos com irrigação de NaOCl 2,5%: XP-E (XP-endo Shaper suplementado com XP-endo Finisher) e BR-Hed (BioRaCe suplementado com lima Hedström). Escaneamentos de μCT e amostras bacteriológicas intracanais foram obtidos antes (escaneamento # 1 e S1) e após o preparo químico-mecânico (escaneamento # 2 e S2), e após a etapa suplementar (escaneamento # 3 e S3). A modelagem do canal foi avaliada por μCT e a desinfecção foi avaliada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Resultados. Os dados da μCT de XP-E (n = 21) e BR-Hed (n = 23) não revelaram diferenças significativas entre os grupos em relação ao volume do canal, área de superfície, índice de modelo de estrutura (SMI) e paredes preparadas após o preparo e após a etapa suplementar (P> 0,05). Todos esses parâmetros aumentaram significativamente após cada etapa de preparo (P <0,05), exceto para alterações de SMI após o XP-endo Finisher (P> 0,05). Dados bacteriológicos dos grupos XP-E (n = 21) e BR-Hed (n = 22) mostraram que 14 (66,7%) e 10 (45,5%) amostras S2 ainda apresentavam bactérias detectáveis, respectivamente. As cifras correspondentes para as etapas complementares com XP-endo Finisher e a lima Hedström foram 11 (52,4%) e 10 (45,5%), respectivamente. As contagens de bactérias em S1 diminuíram significativamente em S2 e S3 em ambos os grupos. A comparação intragrupo entre S2 e S3 mostrou uma redução de 66% nas contagens após o uso da lima Hedström e

18% após o uso da XP-endo Finisher (P> 0,05 para ambos os grupos). A redução quantitativa bacteriana não foi diferente entre os grupos (P> 0,05).

Conclusões. Os sistemas XP-endo Shaper e BioRaCe têm capacidade de desinfecção e modelagem semelhantes em canais em forma de "C". As etapas suplementares com a lima Hedström e o instrumento XP-endo Finisher foram igualmente eficazes para melhorar a modelagem, mas não foram suficientes para melhorar a desinfecção.

Palavras-chave: Canal radicular em forma de "C"; Redução bacteriana; Tratamento endodôntico; Microtomografía computadorizada; XP-endo Shaper; XP-endo Finisher

ABSTRACT

Aim. This *ex vivo* study compared the disinfection and shaping abilities of two preparation protocols in C-shaped canals.

Methods. Mandibular second molars with type I C-shaped canals were pair-matched based on micro-computed tomographic (micro-CT) analysis, and distributed into 2 groups. The canals were contaminated with a mixed bacterial culture and prepared by two protocols, both with 2.5% NaOCl irrigation: XP-E (XP-endo Shaper supplemented with XP-endo Finisher) and BR-Hed (BioRaCe supplemented with Hedström file). Micro-CT scans and intracanal bacteriologic samples were taken before (scan #1 and S1) and after preparation (scan #2 and S2), and after the supplementary step (scan #3 and S3). Canal shaping was evaluated by micro-CT and disinfection was assessed by quantitative polymerase chain reaction.

Results. Micro-CT data from XP-E (n=21) and BR-Hed (n=23) revealed no significant differences between groups regarding canal volume, surface area, structure model index (SMI), and prepared walls after preparation and after the supplementary step ($P > .05$). All these parameters significantly increased after each preparation step ($P < .05$), except for SMI changes after XP-endo Finisher ($P > .05$). Bacteriologic data from XP-E (n=21) and BR-Hed (n=22) groups showed that 14 (66.7%) and 10 (45.5%) S2 samples still had detectable bacteria, respectively. Corresponding figures for supplementary steps with XP-endo Finisher and Hedström file were 11 (52.4%) and 10 (45.5%), respectively. Bacterial counts in S1 significantly decreased in S2 and S3 in both groups. Intragroup comparison between S2 and S3 showed a 66% reduction in counts after using Hedström file and 18% after using XP-endo Finisher ($P > .05$ for both groups). Quantitative bacterial reduction was not different between groups ($P > .05$).

Conclusions. XP-Endo Shaper and BioRaCe systems have similar disinfecting and shaping abilities in C-shaped canals. Supplementary steps with Hedström file and XP- Endo Finisher

were similarly effective in improving shaping, but this was not sufficient to enhance disinfection.

Key Words: Bacterial reduction; C-shaped root canal; endodontic treatment; micro-computed tomography; XP-endo Shaper; XP-endo Finisher.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação 3D da configuração do canal em forma de "C" . (a) tipo de fusão; (b) tipo simétrico; (c) tipo assimétrico (GAO *et al*., 2006). 24

Figura 2 – Fluxogramas geral dos procedimentos para cada grupo experimental. 51

Figura 3 – Imagens tridimensionais representativas de segundos molares inferiores com canais radiculares em formato de "C": (a & d) pré-operatório (verde), (b & e) instrumentação pós-operatória com BioRaCe ou XP-endo Shaper (verde/vermelho) e (c & f) instrumentação suplementar com limas Hedström ou XP-endo Finisher. As imagens na parte superior representam o lado do sulco longitudinal do molar em forma de "C", enquanto as imagens na parte inferior representam o lado oposto do dente..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média ± desvio padrão (SD do inglês *standard deviation*), mediana e variação (mínima-máxima) do volume, área de superfície, índice do modelo de estrutura (SMI do inglês *structure model index*), e área de superfície do canal não preparada de canais radiculares em forma de "C" (*C-shaped*) antes e depois do preparo químico-mecânico e após etapas suplementares de desinfecção 58

Tabela 2 – Razão da taxa de incidência [do inglês "Incidence rate ratios" (IRR)] observada a partir da diferença nas contagens dos níveis de bactérias intracanais entre os pontos de tempo em cada grupo experimental 60

Tabela 3 – Dados moleculares sobre a carga microbiana intracanal antes (S1), após o preparo químico-mecânico (S2) e após as etapas suplementares (S3) em segundos molares inferiores com canais radiculares em forma de "C" 60

Tabela 4 – Diferenças na média das contagens bacterianas intracanal entre cada grupo experimental (BR-Hed e XP-E) em S1, S2 e S3 60

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

C1	Controle de esterilidade
C2	Controle de esterilidade
CHX	Digluconato de clorexidina
CT	Comprimento de trabalho
CP	Comprimento de patência
μCT	Microtomografia computadorizada
μm	Micrometro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minutos
mL	Mililitros
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Ncm	Newton por centímetro
NiTi	Níquel-Titânio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Revoluções por minuto
SAF	*Self Adjusting File*
SMI	*Structure Model Index*
S1	Amostras microbiológicas iniciais
S2	Amostras microbiológicas após o preparo químico-mecânico
S3	Amostras microbiológicas após procedimentos suplementares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. REVISÃO DE LITERATURA 19

2.1. Infecção persistente como a principal causa de insucesso endodôntico 19

2.2. O sistema de canais radiculares em forma de "C" 21

2.3. Microtomografia computadorizada na avaliação do preparo mecânico de canais em "C" 25

2.4. Técnicas de instrumentação com instrumentos convencionais Vs. instrumentos de nova geração e sua eficácia na redução bacteriana 28

2.5. Efeitos do NaOCl na desinfecção 32

2.6. O instrumento XP-endo Finisher na otimização suplementar da irrigação 33

2.7. Estudos Correlativos 34

2.8. Métodos Moleculares 36

3. JUSTIFICATIVA 40

4. HIPÓTESE 41

5. OBJETIVOS 42

5.1. Objetivo Geral 42

5.2. Objetivos Específicos 42

6. MATERIAIS E MÉTODOS 43

6.1. Cálculo amostral 43

6.2. Seleção e preparo dos espécimes 43

6.3. Escaneamento inicial e análise por μCT para seleção dos espécimes 44

6.4. Contaminação dos espécimes 45

6.5. Preparo químico-mecânico dos canais radiculares e procedimentos de coleta e processamento das amostras microbiológicas 46

6.6. Procedimentos antibacterianos suplementares 49

6.7. Avaliação da instrumentação através do μCT 52

6.8. Avaliação da ação antimicrobiana do preparo químico-mecânico por PCR quantitativo em tempo real 52

6.9. Análise Estatística 54

6.9.1. Análise μCT 54

6.9.2. Análise Microbiológica 55

7. RESULTADOS 56
7.1. Resultados da μCT 56
7.2. Resultados Microbiológicos 59
8. DISCUSSÃO 62
9. CONCLUSÃO 67
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68
11. ANEXOS 78

1. INTRODUÇÃO

O sucesso ou o fracasso do tratamento endodôntico é influenciado pela presença de microrganismos no sistema de canais radiculares no momento da obturação (ZANDI *et al.*, 2019) e, por isso, o preparo mecânico e os métodos de desinfecção química, especialmente usando a solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) como irrigante, realizados durante o tratamento endodôntico deveriam erradicar completamente ou pelo menos reduzir as populações microbianas a níveis compatíveis com o reparo dos tecidos perirradiculares (SUNDQVIST, 2003; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2008).

Um dos grandes obstáculos durante o tratamento endodôntico são as complexidades e variações anatômicas do sistema de canais radiculares (istmos, canais laterais, deltas apicais, ramificações, canais em forma de "C", achatados, ovais e curvos), já que os mesmos favorecem a permanência de tecido pulpar necrosado, detritos e biofilme, comprometendo assim o resultado do tratamento endodôntico (LACERDA *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2017).

O sistema de canais radiculares em forma de "C" ou *"C-Shaped"* é uma variação anatômica geralmente encontrada nos segundos molares inferiores, sendo mais prevalentes (39%-44.5%) nas populações asiáticas (JIN *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2011; VON ZUBEN *et al.*, 2017). Os dentes com essa variação caracteristicamente têm raízes fusionadas com um sulco longitudinal na face lingual ou vestibular da raiz, e sua anatomia interna é caracterizada pela presença de istmos complexos que conectam os canais mesial e distal ao longo do canal radicular (FAN *et al.*, 2004a).

Vários estudos realizados com análise por microtomografía computadorizada (μCT), confirmaram a incapacidade da instrumentação em preparar o interior destas variações anatômicas e, na tentativa de obter um melhor debridamento, alguns autores recomendam a combinação de dois ou mais sistemas / técnicas de instrumentação (YIN *et al.*, 2010;

SOLOMONOV *et al.*, 2012; AMOROSO-SILVA *et al.*, 2017). Além disso, os efeitos de limpeza e desinfecção atribuídos ao preparo químico-mecânico podem ser dificultados na presença de uma anatomia complexa, as quais podem não ser adequadamente acessadas e limpas por técnicas convencionais (PETERS *et al.*, 2010; VERSIANI *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Na tentativa de otimizar a desinfecção do sistema de canais radiculares, novos sistemas têm sido propostos substituindo os procedimentos químico-mecânicos convencionais ou suplementando seus efeitos (GU *et al.*, 2009; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2011). Um desses sistemas de preparo e otimização da irrigação inovadores é o XP-endo Shaper / XP-endo Finisher (FKG Dentaire, La Chaux- de-Fonds, Suíça), ambos fabricados com uma liga MaxWire de níquel-titânio (NiTi) (Brasseler, Savannah, USA) e operados com uma cinemática de rotação contínua no sentido horário (FKG Swiss Endo).

O Sistema XP-endo Shaper (30/.01) é composto por um instrumento único de modelagem de amplo espectro enquanto o Sistema XP-endo Finisher (25/.00) caracteriza-se por um instrumento desenhado para otimizar a desinfecção após a modelagem do canal. À temperatura ambiente, XP-endo Shaper tem uma forma de “S” ou “*snake-shaped*” que, à temperatura corpórea, tem a capacidade de se expandir e contrair para se adaptar ao canal radicular. Por sua parte, XP-endo Finisher à temperatura ambiente tem uma forma reta (fase martensítica), enquanto na temperatura corpórea assume uma forma de "colher" (fase austenítica) e ao girar no canal, esse formato faz o instrumento se expandir e contrair, aumentando as chances de tocar em mais paredes do canal e agitar a solução irrigadora (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suíça).

A literatura sugere que não existem diferenças na limpeza e modelagem de canais ovais com XP-endo Shaper quando foi comparado com outros instrumentos de uso único (LACERDA *et al.*, 2017). No entanto, em relação à desinfecção do sistema de canais

radiculares, quando foi comparado com um sistema de múltiplos instrumentos o Sistema XP-endo Shaper mostrou resultados superiores (BEDIER *et al.*, 2018), enquanto que em um estudo onde foi comparado com instrumentos únicos não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre eles (CARVALHO *et al.*, 2019).

Em relação ao Sistema XP-endo Finisher, estudos mostraram resultados favoráveis na remoção da *smear layer*, detritos, tecido orgânico, biofilme, bactérias e na promoção da distribuição do irrigante no canal radicular principal (ALVES *et al.*, 2016; AZIM *et al.*, 2016; BAO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019; PACHECO-YANES *et al.*, 2020).

Até o momento, nenhum estudo avaliou a capacidade de desinfeção e modelagem do Sistema XP-endo Shaper/XP-endo Finisher em segundos molares inferiores com canais em forma de “C” após o preparo químico-mecânico em comparação aos sistemas convencionais de preparo (BioRace/Hedström), utilizando o NaOCl a 2,5% como irrigante, com um estudo correlativo utilizando PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e μCT (Microtomografia Computadorizada). Este conhecimento pode ser de grande importância clínica, determinando se nestes tipos de variações anatômicas é necessária a utilização dessa nova geração de instrumentos tanto para o preparo químico-mecânico como para a suplementação da irrigação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecção persistente como a principal causa de insucesso endodôntico

A infecção persistente é causada por microrganismos presentes na infecção primária ou secundária, que persistem mesmo após aos procedimentos de desinfecção intrarradicular e aos períodos de privação de nutrientes em canais radiculares endodonticamente tratados (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2009), sendo caraterizada pelo aparecimento, manutenção ou pelo aumento do tamanho de uma lesão perirradicular, exsudato inflamatório e *flare-ups*. Os achados apontam o papel da infecção intrarradicular persistente como a principal causa do fracasso endodôntico (RICUCCI *et al.*, 2009).

Os microrganismos organizados na forma de biofilme possuem a capacidade de invadir o sistema de canais radiculares e estão presentes em infecções primárias, secundárias e persistentes; revestindo as paredes do canal principal, bem como se estendendo para canais laterais, ramificações, istmos e túbulos dentinários (RICUCCI & SIQUEIRA, 2008; RICUCCI & SIQUEIRA, 2010). É provável que algumas bactérias em biofilme não sejam afetadas pelos instrumentos endodônticos e pela irrigação (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2008), por isso é considerado uma das causas do fracasso em curto prazo do tratamento endodôntico (RICUCCI *et al.*, 2013).

RICUCCI & SIQUEIRA (2010) avaliaram a prevalência de biofilme em dentes com e sem tratamento endodôntico que apresentavam evidências de lesão perirradicular, através de técnicas histopatológicas e histobacteriológicas em um total de 106 amostras e encontraram presença de biofilme intrarradicular na porção apical em 77% dos canais radiculares (80% em infecções primárias e 74% em casos de fracasso). Por outro lado, biofilme extrarradicular foi observado em apenas 6% dos casos. Além disso, a presença de biofilme nas paredes de ramificações, istmos e túbulos dentinários, foi visualizado em 62% dos canais radiculares de

dentes com lesões perirradiculares radiograficamente pequenas e 82% dos canais radiculares de dentes com lesões perirradiculares grandes. A presença de biofilme estava significativamente associada com cistos, granulomas e abscessos.

Em um estudo recente, avaliou-se a susceptibilidade do biofilme misto localizado em túbulos dentinários às soluções desinfetantes. Os resultados demonstraram que a proporção de bactérias eliminadas em biofilme maduro (3 semanas) foi menor do que no biofilme jovem (1 semana) após 3 min de exposição à solução irrigadora. O NaOCl a 2% foi mais eficaz contra biofilme misto na dentina do que a solução de clorexidina (CHX) a 2%. Concluíram assim que o biofilme misto maduro nos túbulos dentinários é mais resistente aos desinfetantes do que o biofilme jovem (YANG *et al.*, 2016).

O microrganismo mais relacionado ao fracasso do tratamento endodôntico através de estudos utilizando método de cultura e métodos moleculares é a espécie *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), com uma prevalência variando entre 22% e 77% dos casos analisados (MÖLLER, 1966; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004; KAUFMAN *et al.*, 2005). Foi encontrado 9 vezes mais em dentes endodonticamente tratados com lesão perirradicular (RÔÇAS *et al.*, 2004), sugerindo que esta espécie pode ser inibida por outros membros da comunidade microbiana mista comumente encontrada em infecções primárias e que as condições ambientais adversas no canal radicular tratado não impedem sua persistência. Esta capacidade de sobreviver em monoinfecção, a períodos de escassez de nutrientes, à utilização de hidróxido de cálcio como medicação intracanal, além da sua capacidade de penetrar profundamente em túbulos dentinários, leva diversos autores a considerarem este microrganismo como principal patógeno envolvido no insucesso do tratamento (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado por SANTOS *et al.* (2011) que compararam a diversidade bacteriana de infecções dentárias agudas e crônicas através da técnica de Pirossequenciamento,

foi relatado que os membros do filo *Fusobacteria* eram mais abundantes e predominantes nas infecções agudas do que nas crônicas e verificaram que dos 13 filos representados neste estudo, *Verrucomicrobia* e *Gemmatimonadetes* não haviam sido previamente relatados em infecções endodônticas.

SAKAMOTO *et al.* (2008) relataram que 55% dos microrganismos encontrados em canais radiculares tratados eram bactérias ainda não cultivadas. Do mesmo modo, RÔÇAS *et al.* (2014) avaliaram a prevalência de espécies bacterianas ainda não cultivadas ou difíceis de cultivar em canais radiculares infectados e sua susceptibilidade ao preparo químico-mecânico em dentes com lesão perirradicular, utilizando o instrumento rotatório de níquel-titânio BioRaCe (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suíça) e a solução de NaOCl a 2,5% como irrigante. De acordo com esses autores, espécies da Família *Bacteroidaceae* spp. (24%) e *Fretibacterium fastidiosum* (20%) foram mais prevalentes associadas a lesão perirradicular.

Todos estes achados revelaram a alta prevalência de biofilme bacteriano além da grande diversidade bacteriana na porção apical dos canais radiculares e seu papel importante no desenvolvimento das infecções endodônticas.

2.2. O sistema de canais radiculares em forma de “C”

O sistema do canal radicular em forma de “C” ou “*C-Shaped*”, foi reportado pela primeira vez na literatura endodôntica por COOKE & COX (1979), e recebeu seu nome por conta da morfologia transversal da raiz e do canal radicular. Eles descreveram casos clínicos em que os canais radiculares dos dentes pareciam a letra maiúscula "C" quando a câmara pulpar foi aberta. Uma das características dos dentes com dita variação anatômica é que a câmara pulpar pode apresentar um único orifício de entrada do canal radicular em forma de fita com um arco de 180° ou mais. Nos molares inferiores, começa no ângulo da linha mesio-lingual e se estende ao redor da face vestibular ou lingual para terminar na porção distal da câmara pulpar

(COHEN & BURNS, 2002), enquanto que o assoalho da câmara pulpar encontra-se geralmente situado profundamente e pode assumir uma aparência anatômica incomum (FAN *et al.*, 2004a). O canal pode abrigar uma ampla gama de variações anatômicas, sendo classificados em dois grupos básicos: (1) aqueles com um canal em forma de "C", em forma de fita, do orifício da entrada no canal ao ápice e (2) aqueles com três ou mais canais distintos abaixo do orifício de entrada no canal em forma de "C" (COHEN & BURNS, 2002); e sua anatomia interna é caracterizada pela presença de istmos complexos que conectam os canais mesial e distal ao longo do canal radicular (FAN *et al.*, 2004a). Normalmente, essa variação anatômica é encontrada nos dentes com raízes fusionadas, as quais geralmente têm uma configuração cônica ou quadrada (MANNING, 1990; FAN *et al.*, 2004a).

A principal causa de raízes e canais em forma de "C" é a falha da Bainha Epitelial de Hertwig em se fundir com a superfície da raiz vestibular ou lingual (MANNING, 1990). Os canais em forma de "C" aparecem quando ocorre a fusão da face vestibular ou lingual das raízes mesial e distal. Essa fusão permanece irregular e as duas raízes permanecem conectadas por uma fita intraradicular, originando um assoalho da câmara pulpar profundo onde podem ser encontrados dois ou três canais no sulco em forma de "C", ou o formato em "C" pode ser contínuo ao longo do comprimento da raiz (BARNETT, 1986; MELTON *et al.*, 1991).

Geralmente, a variação anatômica do sistema de canais radiculares em forma de "C" é encontrada nos segundos molares inferiores, com uma maior prevalência (39%-44,5%) nas populações asiáticas (JIN *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2011; VON ZUBEN *et al.*, 2017). Apesar de sua alta ocorrência nos segundos molares inferiores (BOLGER & SCHINDLER, 1988; DANKNER *et al.*, 1990; JEROME, 1994), esta variação anatômica também tem sido reportada em primeiros molares inferiores (BOLGER & SCHINDLER, 1988), molares superiores (BOLGER & SCHINDLER, 1988; YILMAZ *et al.*, 2006) e até mesmo nos primeiros pré-molares inferiores (LU *et al.*, 2006). Quando presente de um lado da arcada

dentária, um canal em forma de "C" pode ser encontrado no dente contralateral em mais de 70% dos indivíduos (SABALA *et al.*, 1994; ZHENG *et al.*, 2011).

O sistema de canais radiculares em forma de "C" pode adotar inúmeras morfologias. A classificação original (MELTON *et al.*, 1991) foi modificada, com uma descrição mais detalhada da morfologia dos mesmos. A configuração dos canais em forma de "C" pode variar ao longo da profundidade. A aparência dos orifícios de entrada dos canais pode não ser condizente com a anatomia real destes (FAN *et al.*, 2004b).

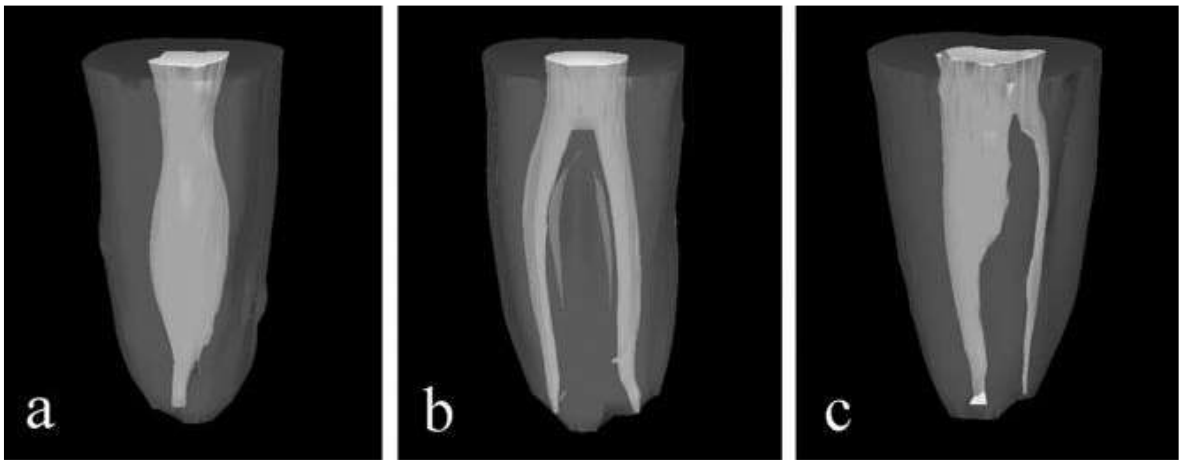
MELTON *et al.* (1991) propuseram uma classificação de canais em forma de "C" com base em sua forma de seção transversal (Categoria I, II e III), no entanto, não houve uma descrição clara da diferença entre as categorias II e III propostas pelos autores. Além disso, eles examinaram três níveis arbitrários da raiz e, portanto, encontra-se pouca informação descrevendo como a forma do canal pode mudar ao longo de seu comprimento. Por tal motivo, a mesma foi modificada por FAN *et al.* (2004a), levando em consideração suas características anatômicas (Categoria I – C1, II – C2, III – C3, IV – C4 e V – C5) e radiográficas (Tipo I, II e III) (FAN *et al.*, 2004b). É importante salientar que as classificações mencionadas são em 2 dimensões.

GAO *et al.* (2006), propuseram outra classificação dos canais em forma de "C", mas agora em 3 dimensões (3D) utilizando a microtomografia computadorizada (μCT). Foram utilizados 98 segundos molares inferiores extraídos com raízes fusionadas e que possuíam um sistema de canal radicular em forma de "C", coletados de uma população chinesa nativa. As imagens reconstruídas em 3D dos canais foram classificadas em três categorias (Fig. 1):

- Tipo I (fusão ou convergentes - *merging type*): Os canais se fusionam em um canal principal antes de sair no forame apical; área parcial de fusão da dentina pode aparecer na porção coronal e/ou do meio do sistema do canal.

- Tipo II (simétrico - *symmetrical type*): O canal mesial e o canal distal separados, localizados na parte mesial e na parte distal da raiz, respectivamente. Do ponto de vista vestíbulo-lingual, a simetria do canal mesial e do canal distal estava presente ao longo do eixo longitudinal da raiz.
- Tipo III (assimétrico - *asymmetrical type*): Canais mesial e distal separados eram evidentes. Do ponto de vista vestibular-lingual, o canal distal pode ter um grande istmo em toda a área da furca, o que comumente tornava o canal mesial e distal assimétrico.

Figura 1 – Classificação 3D da configuração do canal em forma de "C" . (a) tipo de fusão; (b) tipo simétrico; (c) tipo assimétrico (GAO *et al*., 2006).



No mesmo estudo, os autores além de proporem uma nova classificação dos canais em forma de "C", fizeram uma análise computacional das imagens transversais de cada espécime e mediram a espessura mínima da parede do canal. Os resultados mostraram que a espessura mínima da parede do canal no tipo I foi mais espessa do que no tipo II ou III na porção apical e média ($p < 0,05$). Em relação à prevalência de cada tipo de canal, foi encontrado que 32,65% dos espécimes apresentavam aparência do tipo de fusão, 38,78% do tipo simétrico e 28,57% do tipo assimétrico. Os autores concluíram que é sumamente importante ficar ciente da

configuração do sistema do canal radicular em forma de "C" e da localização da espessura mínima da parede para garantir um tratamento mais eficiente do canal radicular.

2.3. Microtomografia computadorizada na avaliação do preparo mecânico de canais em "C"

Para uma adequada execução dos procedimentos de limpeza e modelagem durante o preparo químico-mecânico, é fundamental o conhecimento da anatomia interna dos dentes e suas possíveis variações anatômicas. A presença dessas variações necessita ser reconhecida a fim de evitar uma instrumentação deficiente e uma consequente persistência bacteriana no sistema de canais radiculares. Assim, o conhecimento da anatomia interna é um pré-requisito fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico (VERTUCCI, 1984).

Múltiplos estudos, realizados com análise por μCT, confirmaram a incapacidade da instrumentação em preparar o interior das complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares. Os estudos por μCT do preparo de canais ovais, achatados ou irregulares, utilizando diferentes instrumentos, demonstraram que as irregularidades muitas vezes não são preparadas, podendo abrigar tecido necrosado, detritos e biofilme. Além disso, os efeitos desinfetantes dos instrumentos e dos irrigantes podem ser dificultados na presença de uma anatomia complexa como canais acessórios, istmos e deltas apicais, que podem não ser adequadamente acessados e limpos por técnicas convencionais (RHODES *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2000; PETERS *et al.*, 2001; HUBSCHER *et al.*, 2003; GU *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2010; METZGER *et al.*, 2010; PETERS *et al.*, 2010; VERSIANI *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2013, SIQUEIRA *et al.*, 2013; LACERDA *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2017).

CHEUNG & CHEUNG (2008) avaliaram a segurança e a eficácia de uma técnica de utilização de instrumentos rotatórios de NiTi na preparação do sistema de canais radiculares em forma de "C". Após a determinação do comprimento de trabalho, os canais radiculares foram

preparados utilizando uma combinação de dois instrumentos rotatórios de NiTi, ProFile (Dentsply Maillefer) e HERO Apical Classic (Micro-Mega, Besançon, França), com uma abordagem *crown-down*, na sequência: ProFile Orifice Shaper #3, #2, e em seguida, ProFile 25 e 20/0.06, nessa ordem, até o comprimento em que a resistência foi encontrada. Em seguida, foi realizada a preparação apical na seguinte sequência: (1) instrumento manual tipo K#15 até CT em um movimento de limagem suave; (2) ProFile 15, 20 e 25/0.06 até CT; e (3) HERO Apical Classic 30/0.06 até CT. Os resultados mostraram que apenas regiões isoladas na seção transversal do canal em forma de "C" foram preparadas pelos instrumentos. Todos os canais preparados apresentaram uma conicidade que correspondia ao do último instrumento utilizado. Os autores concluíram que a modelagem do sistema de canal em forma de "C" é incompleta com o uso de instrumentos rotatórios e deve ser auxiliada por irrigação associada ao uso de ultrassom. Embora os instrumentos rotatórios pareçam seguros nesses canais, não é recomendado um aumento adicional para uma dimensão apical maior que o tamanho 30/0.06.

YIN *et al.* (2010) avaliaram a eficácia da instrumentação de canais em forma de "C" com o sistema rotatório ProTaper e instrumentos manuais, utilizando μCT. Entre os parâmetros analisados pelos autores encontramos o volume de dentina removida, as áreas não instrumentadas do canal, o tempo necessário para a instrumentação e o erro iatrogênico da instrumentação. Os resultados mostraram que no grupo de instrumentação manual houve uma maior quantidade de remoção volumétrica de dentina (45%) e deixou menos área do canal não instrumentada (41.6%) do que o grupo ProTaper (27.7% e 59.6% respectivamente), obtendo uma diferença significativa em ambos parâmetros ($p < 0,01$). O tempo necessário para a instrumentação foi menor no grupo ProTaper do que no grupo de instrumentação manual, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Nenhuma quebra do instrumento ocorreu nos dois grupos, mas erros processuais mais evidentes foram detectados no grupo de instrumentação manual do que no grupo ProTaper. Os autores concluíram que o sistema

rotatório ProTaper manteve a curvatura do canal com rapidez e poucos erros de procedimento, enquanto a instrumentação tradicional pode preparar mais superfícies do canal. Neste estudo, os autores recomendaram a combinação das duas técnicas para obter um melhor debridamento na prática clínica. Após a instrumentação rotatória, as limas tipo K ou H podem ser introduzidas passivamente no canal e a limagem pode ser direcionada especificamente para as áreas de istmo.

Utilizando uma metodologia semelhante, SOLOMONOV *et al.* (2012) compararam a eficácia do sistema Self-Adjusting File (SAF; ReDent, Ra'anana, Israel) e o sistema ProTaper na modelagem de canais em forma de "C". As imagens obtidas pela μCT antes e após do tratamento foram reconstruídas e sobrepostas, e foi calculada a porcentagem da parede do canal não afetada pelo procedimento. Os resultados demonstraram que o sistema SAF apresentou 41% de paredes não preparadas, enquanto que para o sistema ProTaper, o percentual foi de 66% ($p<0,01$). O sistema SAF foi significativamente mais eficaz do que o sistema ProTaper no preparo de paredes de canal em formato "C".

AMOROSO-SILVA *et al.* (2017) avaliaram o efeito da instrumentação oscilatória a 90° com limas manuais em vários parâmetros morfológicos (volume, área e superfície não instrumentada) em canais radiculares em forma de "C" após a instrumentação usando Reciproc e SAF. Os resultados revelaram que a instrumentação com Reciproc aumentou significativamente o volume do canal em comparação com a instrumentação com SAF. Além disso, a comparação intragrupo revelou que os volumes do canal aumentaram significativamente após a instrumentação oscilatória a 90°. A instrumentação Reciproc e SAF produziu uma superfície não instrumentada do canal radicular de 28% e 34%, respectivamente, que não foi significativamente diferente. A instrumentação oscilatória final reduziu significativamente a superfície não instrumentada do canal radicular de 28% para 9% (Reciproc) e de 34% para 15% (SAF). Os terços apical e médio exibiram maiores superfícies

não instrumentadas do canal radicular após a primeira instrumentação que foi significativamente reduzida após a instrumentação oscilatória. Os autores determinaram que ambos sistemas estão associados a parâmetros morfológicos semelhantes após a instrumentação dos segundos molares inferiores com canais em forma de "C". Além disso, o uso final da instrumentação oscilatória a 90° usando limas manuais NiTi diminuiu significativamente a porcentagem das paredes do canal radicular não instrumentadas que permaneceram após a instrumentação Reciproc e SAF.

Mais recentemente, ZHAO *et al.* (2019) estudaram duas técnicas de instrumentação (Reciproc Blue e XP-endo Shaper) para determinar a porcentagem de áreas não instrumentadas no canal radicular. Os resultados obtidos mostraram que a porcentagem das áreas não instrumentadas foram de 33,04% para Reciproc Blue e 30,45% para XP-endo Shaper (P> 0,05). Nos dois grupos, o terço apical apresentou maior porcentagem de áreas não instrumentadas que o terço coronal (P <0,05). Concluindo que ambos sistemas foram associados a áreas não instrumentadas das paredes do canal similares após a instrumentação dos canais em forma de "C".

As complexidades anatômicas aumentam a dificuldade em avaliar a instrumentação do canal em forma de "C", portanto se faz indispensável a utilização de métodos de estudo não destrutivos para um melhor entendimento e planejamento nestes casos (ZHAO *et al.*, 2019). Na atualidade, a μCT tem sido considerada a ferramenta de pesquisa mais importante e precisa para o estudo da anatomia do sistema de canais radiculares, apesar da impossibilidade de sua utilização *in vivo* (PETERS *et al.*, 2000; VERSIANI *et al.*, 2012; VERSIANI *et al.*, 2013).

2.4. Técnicas de instrumentação com instrumentos convencionais Vs. instrumentos de nova geração e sua eficácia na redução bacteriana

Ao longo dos anos, as complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares continuam sendo um grande obstáculo durante o tratamento endodôntico, pois favorecem a permanência de tecido pulpar e bactérias em istmos, canais laterais e ramificações; especialmente em canais achatados, ovais e curvos. Na tentativa de vencer estes obstáculos, tem sido proposta a utilização de inúmeros instrumentos (PETERS *et al.*, 2001; DE MELO RIBEIRO *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013; VERSIANI *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, os canais radiculares são ampliados e modelados empregando uma série de instrumentos com diâmetros de ponta crescentes. Na última década, têm sido propostos os sistemas de instrumentação rotatória com múltiplos instrumentos, os quais consistem em uma série de instrumentos de NiTi utilizados no movimento de rotação contínua, visando simplificar a instrumentação dos canais radiculares e diminuir o tempo de trabalho requerido (NEVES *et al.*, 2016).

Um desses sistemas de múltiplos instrumentos é o sistema BioRaCe (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suíça), o qual emprega uma sequência baseada no conhecimento do diâmetro anatômico dos canais radiculares com o intuito de minimizar o número de instrumentos requeridos para limpar e modelar o terço apical, reduzindo a tensão sobre cada instrumento. Eles possuem as seguintes características físicas: a) ângulo de corte alternado; b) ponta inativa; c) secção transversal triangular sem guia radial e d) tratamento eletrolítico de sua superfície. O sistema BioRaCe possui 2 kits de instrumentos: básico e avançado. O kit básico contém 6 instrumentos (BR0 25/0.08, BR1 15/0.05, BR2 25/0.04, BR3 25/0.06, BR4 35/0.04 e BR5 40/0.04) e é recomendado para a maioria das anatomias radiculares. O Kit avançado contém 4 instrumentos: dois são usados em canais com curvaturas severas (BR4C 35/0.02 e BR5C 40/0.02) e dois estão indicados em canais mais amplos (BR6 50/0.04 e BR7 60/0.02) (DEBELIAN & TROPE, 2008).

Diferentes estudos, *ex vivo* e *in vivo*, têm sido realizados na tentativa de determinar se existe alguma diferença na redução bacteriana entre técnicas de preparo com múltiplos instrumentos (BioRaCe), instrumentos manuais e instrumentos únicos (convencionais) (ALVES *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013; MARTINHO *et al.*, 2014; MARINHO *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2016; GAZZANEO *et al.*, 2019). Os resultados revelaram, que na maioria dos estudos realizados não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tipos de sistemas de instrumentação testados, não entanto, o estudo de GAZZANEO *et al.* (2019) demonstrou que os efeitos combinados de múltiplos instrumentos, o alto volume de irrigação e o longo tempo de retenção do irrigante NaOCl tiveram uma influência positiva na desinfecção intracanal durante o preparo químico-mecânico.

Mais recentemente têm sido propostos instrumentos de nova geração na tentativa de otimizar a limpeza e modelagem do sistema de canis radiculares. O XP-endo Shaper é um desses sistemas de nova geração fabricado com uma liga MaxWire NiTi que proporciona uma maior elasticidade e memória de forma. Iniciam o preparo em sua fase martensítica (M), em temperatura ambiente e ao serem inseridas no canal, são expostas à temperatura corpórea e mudam de forma devido à memória de forma da fase austenítica (A). O formato da fase "A" em rotação, permite que o instrumento, segundo os fabricantes, alcance e limpe áreas normalmente impenetráveis diferente do que ocorreria com um instrumento padrão, devido a superelasticidade, flexibilidade e capacidade de expansão dentro do canal radicular, oferecida pela liga MaxWire. Além disso, sua reduzida conicidade lhes atribui uma elevada resistência à fadiga cíclica, o que permite realizar um preparo químico-mecânico eficaz minimizando os riscos de fraturas de instrumentos. Possui uma conicidade inicial de 0,01 e uma vez no interior do canal, o instrumento expande-se até 0,04. Outra de suas características é que o instrumento tem uma ponta Booster Tip, através da qual a modelagem dos canais inicia-se semelhante a

uma lima ISO 15 e finaliza o preparo semelhante ao ISO 30. Assim, por meio de um único instrumento, prepara o canal em uma conformação de 30/0,04 (FKG Swiss Endo).

Existem poucos estudos do Sistema XP-endo Shaper avaliando a redução bacteriana do sistema de canais radiculares.

Em um estudo realizado por ALVES *et al.* (2018), os autores avaliaram através dos métodos moleculares, a redução bacteriana promovida pelos instrumentos dos Sistemas XP-endo Shaper e Reciproc após o preparo mecânico em dentes extraídos e contaminados com *E. faecalis,* utilizando como irrigante a solução salina. Após a análise das amostras obtidas antes e após do preparo mecânico, os resultados revelaram que a redução bacteriana intracanal foi significativamente mais proeminente ao usar o Sistema XP-endo Shaper (P <0,001).

BEDIER *et al.* (2018) avaliaram o efeito antibacteriano de diferentes protocolos de preparo químico-mecânico, em canais mesiais de molares inferiores contaminados com *E. faecalis*, através da microscopia confocal de varredura a laser, obtendo uma diferença significativa entre o protocolo utilizando o instrumento XP-endo Shaper quando comparado com o sistema iRaCe.

CARVALHO *et al.* (2019) compararam através de métodos de cultura, a redução da carga bacteriana promovida pelo preparo químico-mecânico com XP-endo Shaper e Reciproc Blue, em dentes unirradiculares com canais ovais contaminados com *E. faecalis*, usando como soluções irrigadoras NaOCl a 2.5% e solução salina. Os autores encontraram que ambas técnicas de instrumentação promoveram a redução da carga bacteriana, independentemente da solução irrigadora, e que com o uso de NaOCl a redução bacteriana se incrementou em ambas técnicas de instrumentação.

Até o momento não se encontra relatado na literatura qual é o desempenho antibacteriano desses instrumentos em dentes que apresentam complexidades anatômicas como canais em forma de “C”.

2.5. Efeitos do NaOCl na desinfecção

A utilização de soluções irrigadoras dotadas de atividade antimicrobiana é um passo importante para um preparo químico-mecânico eficaz e para o sucesso do tratamento endodôntico, aumentando a eliminação bacteriana e facilitando a remoção de tecido necrosado e detritos do canal radicular. Os irrigantes podem impedir a compactação de tecido duro e dos remanescentes pulpares infectados na porção apical do canal radicular (HAAPASALO *et al.*, 2005). A limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares são altamente dependentes da ação mecânica da irrigação, devido ao fluxo e refluxo da solução no interior do canal radicular, assim como dos efeitos químicos pela ação antimicrobiana e solvente de matéria orgânica (SIQUEIRA *et al.*, 1997; SIQUEIRA *et al.*, 2000; ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010).

Várias substâncias foram propostas para este fim, mas o hipoclorito de sódio (NaOCl) é o mais utilizado devido a propriedades importantes como: capacidade de dissolução de tecido orgânico, atividade antimicrobiana, promover clareamento, capacidade de molhamento e ação detergente que promove a reação de saponificação que degrada ácidos graxos e lipídios (GROSSMAN & MEIMAM, 1941; BLOOMFIELD & MILES, 1979).

O NaOCl é utilizado em concentrações que variam de 0,5% a 5,25% sendo um potente agente antimicrobiano e solvente de remanescentes pulpares e componentes orgânicos da dentina (HAAPASALO *et al.*, 2005). Atualmente não há consenso sobre a concentração ideal a ser utilizada durante o tratamento endodôntico. A eficácia antimicrobiana do NaOCl baseia-se no seu pH elevado, relacionado com a inativação irreversível de sítios enzimáticos essenciais bacterianos, pelos íons hidroxila e pela reação de cloraminação (ESTRELA *et al.*, 1995; ESTRELA *et al.*, 2002), além de eliminar bactérias rapidamente, mesmo em baixas concentrações (HAAPASALO *et al.*, 2005).

Embora, um grande número de trabalhos não tenham encontrado diferença significativa alguma no efeito antibacteriano em relação a redução da sua concentração (CVEK *et al.*, 1976; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1985; SIQUEIRA *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2002; RADCLIFFE *et al.*, 2004; HAAPASALO *et al.*, 2005); outros estudos relatam que a ação antimicrobiana do NaOCl é significativamente mais eficaz quando utilizado a maior concentração (YESILSOY *et al.*, 1995; SIQUEIRA *et al.*, 1998; BERBER *et al.*, 2006; CLEGG *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

2.6. O instrumento XP-endo Finisher na otimização suplementar da irrigação

Na tentativa de otimizar os resultados obtidos com o tratamento endodôntico, novos sistemas e substâncias têm sido propostos para melhorar a desinfecção do sistema de canais radiculares, substituindo os procedimentos químico-mecânicos convencionais ou suplementando seus efeitos (GU *et al.*, 2009; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2011).

Os métodos de otimização têm o potencial de eliminar a necessidade de aplicar a medicação intracanal entre sessões do tratamento endodôntico, agilizando a desinfecção (sessão única), reduzindo ainda mais a carga bacteriana no canal radicular após o preparo químico-mecânico antes da obturação (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2011).

O XP-endo Finisher chega no mercado com a proposta de otimizar/suplementar o preparo químico-mecânico realizado. Este instrumento apresenta, de forma similar ao XP-endo Shaper, a liga MaxWire e as propriedades quanto a variações de temperatura. Segundo o fabricante, o instrumento promove a limpeza eficaz em áreas anatômicas complexas do canal radicular, onde o instrumento de NiTi convencional não consegue atingir, preservando estrutura dentinária.

Estudos *in vitro* demonstraram a eficácia do Sistema XP-endo Finisher para melhorar a desinfecção do sistema de canais radiculares, em canais achatados e circulares após o preparo químico-mecânico (ALVES *et al.*, 2016; BEDIER *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019); não

entanto, ainda não está reportado na literatura qual é o desempenho antibacteriano desses instrumentos em dentes que apresentam complexidades anatômicas como canais radiculares em forma de “C”.

2.7. Estudos Correlativos

Na atualidade, existe uma ampla gama de estudos avaliando diferentes âmbitos de interesse na área da Endodontia, não entanto, na maioria desses trabalhos são avaliados parâmetros individuais. Recentemente, vários estudos foram conduzidos por um grupo de renomados pesquisadores para investigar o que acontece com as áreas não instrumentadas da superfície do canal radicular, usando uma correlação entre a μCT e outro método de para avaliar a limpeza ou desinfecção do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA *et al.*, 2018).

SIQUEIRA *et al.* (2013) avaliaram a capacidade de desinfecção e modelagem de diferentes protocolos de preparo químico-mecânico utilizando os instrumentos Reciproc, SAF e Twisted File, por meio de μCT e contagem bacteriológica. Os canais foram contaminados com cepas de *E. faecalis* por 30 dias e em seguida distribuídos aleatoriamente de acordo com cada grupo. Amostras bacteriológicas foram coletadas antes e após a instrumentação dos canais e analisadas pela PCR e as imagens dos espécimes foram adquiridas também antes e após a instrumentação por meio de μCT. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos, quanto a desinfecção dos canais e nem quanto a modelagem dos canais radiculares. A análise correlativa não mostrou relação estatisticamente significativa entre a redução bacteriana e a média percentual de aumento de paredes instrumentadas. Os autores concluíram que todos os sistemas de instrumentação testados têm padrões de desinfecção e modelagem semelhantes durante a preparo químico-mecânico.

ALVES *et al.* (2016) correlacionaram os achados da μCT com contagens bacteriológicas e criopulverização após a realização de técnicas de desinfecção suplementares ao preparo

químico-mecânico. Após a contaminação dos espécimes com *E. faecalis*, os canais radiculares foram submetidos ao preparo químico-mecânico (sistema BT RaCe / irrigação com NaOCl a 2,5%). Na sequência, os dentes foram randomizados em dois grupos de acordo com a etapa de desinfecção suplementar: agitação do irrigante com o instrumento XP-endo Finisher ou irrigação passiva ultrassônica. Antes e após o preparo do canal, os dentes foram escaneados e amostras coletadas, para serem avaliadas por meio da PCR e submetidas análise do percentual de paredes não preparadas. Em seguida, os mesmos dentes foram contaminados e efetuados os procedimentos suplementares. Amostras da região de istmo e a 5mm apicais foram obtidas para realização da criopulverização. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre o percentual de paredes não preparadas e a redução microbiana. Em relação à criopulverização, nenhum dos tratamentos coadjuvantes reduziu a contagem de bactérias presentes na região de istmo. Em conclusão, este estudo demonstrou que ambos procedimentos suplementares da desinfecção diminuíram a presença de microrganismos no canal principal do sistema de canais radiculares, sendo que a utilização da XP-endo Finisher apresentou melhores resultados. No entanto, em ambos procedimentos suplementares, a desinfecção dos istmos de molares inferiores não foi eficaz.

Em outro estudo correlativo, usando a μCT e a histologia ou Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) SIQUEIRA *et al.* (2017), avaliaram o que acontece com as paredes do canal radicular de dentes necróticos e vitais que permaneceram não instrumentados após o preparo químico-mecânico usando instrumentos reciprocantes (Reciproc) e irrigação com NaOCl a 2,5%. Os canais foram escaneados antes e após o preparo químico-mecânico e as áreas não preparadas foram identificadas pela μCT e submetidas a análise histológica (para dentes com polpas vitais) e MEV (para dentes necróticos). Os resultados demonstraram que, na grande maioria dos espécimes, as áreas dos canais radiculares que permaneceram não atingidas pelo

preparo químico-mecânico encontravam-se cobertas com bactérias e/ou restos de tecido pulpar, principalmente no terço apical.

LACERDA *et al.* (2017) avaliaram a capacidade de limpeza e modelagem de três sistemas de instrumentação (SAF, TRUShape e XP-endo Shaper) em canais radiculares ovais de dentes extraídos com polpa vital através da μCT e da histologia. Os espécimes foram escaneados e os canais radiculares foram pareados e distribuídos de acordo com cada grupo experimental, para logo serem preparados usando como solução irrigadora o NaOCl a 5,25% (aquecida a 37ºC). Após o preparo químico-mecânico, os espécimes foram re-escaneados, as áreas não preparadas do canal radicular foram identificadas, medidas e depois avaliadas histologicamente quanto à quantidade de remanescentes pulpares em cada terço radicular. Os resultados revelaram que não houve diferença estatística significativa quando foi comparada a quantidade de áreas não preparadas entre os três sistemas de instrumentação ao longo do canal radicular. No entanto, quando foram comparados o SAF e o XP-endo Shaper no terço apical do canal radicular, o SAF mostrou uma quantidade significativamente menor de áreas não preparadas ($P<0,05$). Também não foi encontrada uma diferença significativa na capacidade de limpeza dos sistemas utilizados. Os autores concluíram que nenhum dos sistemas preparou 100% das paredes do canal radicular e, que a capacidade de limpeza dos 3 sistemas foi semelhante.

Esses achados demonstraram que as áreas não preparadas pelos instrumentos não são previsivelmente limpas e desinfetadas pela irrigação convencional com NaOCl. Além disso, também é demonstrado que essas áreas podem abrigar biofilmes bacterianos e material orgânico remanescente, o que pode ser um foco para infecções persistentes.

2.8. Métodos Moleculares

As infecções persistentes associadas ao fracasso do tratamento endodôntico são geralmente constituídas por uma comunidade microbiana mista, contendo de 1 a 5 espécies bacterianas em casos de canais aparentemente bem tratados e, aproximadamente, 55% dessas bactérias ainda não foram cultivadas (SAKAMOTO *et al.*, 2008; RÔÇAS & SIQUEIRA, 2010). É de extrema importância identificar as principais espécies bacterianas resistentes aos protocolos antibacterianos executados durante o tratamento endodôntico, na tentativa de entender o papel desses microrganismos na evolução e no resultado do tratamento, com a finalidade de estabelecer um protocolo de tratamento mais eficaz e previsível. O método de cultura tem sido utilizado como referência na avaliação da microbiota associada a várias doenças infecciosas, incluindo as infecções de origem endodôntica; apesar disso, as bactérias ainda não cultiváveis não podem ser detectadas e/ou identificadas utilizando esse método, sendo recentemente questionado como técnica de referência (“padrão ouro”) para identificação bacteriana (LOESCHE *et al.*, 1992; SAKAMOTO *et al.*, 2001; RÔÇAS *et al.*, 2011; SIQUEIRA, 2011).

Os métodos moleculares permitem a identificação dos microrganismos diretamente das amostras clínicas sem a necessidade de cultivo (SIQUEIRA *et al.*, 2000). Através destes métodos, é possível detectar espécies bacterianas difíceis de crescer em cultura, presentes em alta prevalência nas infecções endodônticas primárias, tais como: *Treponema denticola, Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gingivalis, Dialister pneumosintes, Prevotella tannerae, Filifactor alocis* e *Tannerella forsythia*; das quais a espécie *T. forsythia* não havia sido previamente identificada pelo método de cultura (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2003a; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2003b).

SIQUEIRA & RÔÇAS (2004) através do método molecular PCR *nested*, encontraram *Centipeda periodontii* em infecções endodônticas sintomáticas e assintomáticas, um microrganismo que nunca havia sido detectado pelo método de cultura em canais radiculares

infectados. Este microrganismo tem sido associado a diferentes formas de doença periodontal sendo detectado pela primeira vez em infecções endodônticas.

Os métodos moleculares permitiram não só a confirmação da associação de diversas bactérias previamente identificadas pelo método de cultura, mas também incluíram outras espécies difíceis de cultivar ou até mesmo não cultiváveis na lista de patógenos endodônticos; permitindo assim, uma melhor compreensão da infecção (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005a; SIQUEIRA *et al.*, 2007a; RÔÇAS & SIQUEIRA, 2011). Em conjunto, a cultura e os métodos moleculares revelaram diversas espécies (391 bactérias, 4 fungos e 1 arquéia) em infecções primárias. As bactérias que ainda não foram cultivadas são representadas por 136 espécies. Métodos moleculares identificaram 271 espécies, enquanto que 216 foram isolados por cultura. Dos totais detectados (391), 261 foram encontrados exclusivamente em infecções primárias (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2009).

A carga bacteriana intrarradicular é um fator relevante para a indução da doença perirradicular, portanto os objetivos microbiológicos do tratamento endodôntico são reduzir a carga bacteriana a níveis compatíveis com a cicatrização do tecido periradicular (em baixo do limiar patogênico), através do preparo químico-mecânico e medicação intracanal, além de manter essas contagens baixas, obturando adequadamente o sistema de canais radiculares (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2008; SIQUEIRA, 2011; RÔÇAS & SIQUEIRA, 2011; ZANDI *et al.*, 2019).

Embora os níveis de redução bacteriana que precisam ser atingidos durante o tratamento endodôntico ainda não estejam definidos, múltiplos estudos demostraram através da análise quantitativa (Real Time PCR) que todos os protocolos de preparo químico-mecânico, seguidos ou não de procedimentos antibacterianos suplementares ou medicação intracanal, produziram uma redução bacteriana altamente significativa variando entre $< 10^2$ e 10^5 por canal (VIANNA *et al.*, 2006; SAKAMOTO *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2007a; SIQUEIRA *et al.*, 2007b;

RÔÇAS & SIQUEIRA, 2011; PAIVA *et al.*, 2013; RÔÇAS *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2016; NEVES *et al.*, 2016; GAZZANEO *et al.*, 2019; ZANDI *et al.*, 2019). No entanto, nenhum desses estudos foi realizado em dentes com complexidades anatômicas como os canais radiculares em “C”.

3. JUSTIFICATIVA

Até o momento, não existem estudos correlacionando μCT e métodos de microbiologia molecular (qPCR) para avaliar a modelagem e desinfecção de canais radiculares em forma de "C". O sistema XP-endo Shaper/XP-endo Finisher, baseado no efeito de ação expandida, tem grande potencial de melhorar a modelagem e principalmente a desinfecção desses canais com anatomia complexa, em comparação com instrumentos convencionais. Tendo em vista o papel fundamental dos microrganismos nas infecções persistentes associadas ao fracasso da terapia endodôntica, este conhecimento pode ser de grande importância clínica, determinando se após o preparo químico-mecânico há necessidade ou não da agitação suplementar de irrigação.

4. HIPÓTESE

O preparo químico-mecânico, combinado com a suplementação da irrigação utilizando o sistema de instrumentação/agitação XP-endo Shaper/XP-endo Finisher em segundos molares inferiores com canais em forma de “C”, resultará em uma diminuição significativa da contagem bacteriana intracanal e das áreas não preparadas dos canais radiculares, em comparação a um sistema convencional de preparo acionado a motor, complementado pelo uso de instrumentos Hedström, sempre utilizando o NaOCl a 2,5% como irrigante.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar, comparar e correlacionar a modelagem e a redução microbiana, em canais radiculares em forma de "C" de segundos molares inferiores, promovida pelo preparo químico-mecânico/agitação suplementar do sistema XP-endo Shaper/XP-endo Finisher em comparação com uma técnica de preparo convencional (BioRace/Hedström) e utilizando o NaOCl a 2,5% como solução irrigadora.

5.2. Objetivos Específicos

- Determinar o percentual das paredes não preparadas pelos instrumentos testados utilizando μCT.
- Avaliar através da qPCR, a capacidade de desinfecção dos sistemas testados, após o preparo químico-mecânico e após a agitação suplementar, utilizando o NaOCl a 2,5% como irrigante.
- Correlacionar o percentual de paredes não preparadas com os sistemas testados e a carga bacteriana encontrada após o preparo químico-mecânico e após a agitação ou preparo suplementar.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Cálculo amostral

Para estimar o tamanho da amostra, foi realizado um cálculo amostral utilizando o Programa STATISTICA v8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA), estabelecendo um poder de 90% e uma probabilidade de erro α de 0,05%. O resultado sugeriu que pelo menos 21 dentes por grupo seriam necessários para a análise microbiológica e 12 para a análise μCT. Portanto, foram incluídos 24 dentes por grupo, considerando a possibilidade de perda da amostra durante o experimento.

6.2. Seleção e preparo dos espécimes

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, Duque de Caxias, RJ (CAAE: 33925820.2.0000.5283) (Anexo 1). A partir de uma amostra inicial de 300 segundos molares inferiores, extraídos por razões não relacionadas ao estudo, foram selecionados 48 dentes com raízes fusionadas e submetidos a uma análise por microtomografia computadorizada (μCT). Entre os critérios de inclusão temos: dentes com presença de canal radicular em C (*C-Shaped*), conforme definido por COOKE & COX (1979) e de acordo com a classificação tridimensional (Tipo I) de GAO *et al.*, 2006), dentes que não possuam tratamento endodôntico realizado, raízes completamente formadas e ausência de calcificações e de reabsorção interna.

A seguir, as coroas dos dentes foram seccionadas 4 mm acima do nível da junção amelocementária com o auxílio de um disco diamantado (Kg Sorensen, Ind. Com. Ltda, Barueri, SP), acionado em baixa rotação. As superfícies radiculares externas foram limpas com curetas periodontais e ultrassom (Profi Class, Dabi Atlante Ltda, Ribeirão Preto, SP). As raízes mésio-vestibulares foram marcadas com broca esférica 1012 (KG – Sorensen) para facilitar a

sua identificação clinica e nas imagens do μCT. Após refinamento do acesso à câmara pulpar, os canais radiculares foram explorados com um instrumento tipo K#10 (FKG Dentaire SA, LaChaux-de-Fonds, Suíça), até que a ponta do instrumento atingisse o forame apical e fosse visível sob magnificação.

Todos os dentes receberam numerações de 1 a 48 para facilitar a sua identificação, realizadas com broca esférica 1011 em alta rotação, na superfície externa da porção coronária da raiz.

6.3. Escaneamento inicial e análise por μCT para seleção dos espécimes

Foi realizado um escaneamento através do μCT para avaliação da anatomia interna dos canais radiculares e padronização das amostras quanto à anatomia e ao volume dos canais radiculares. Os espécimes foram digitalizados no microtomógrafo *SkyScan* 1174 v.2 (Bruker Micro-CT, Kontich, Bélgica), com uma resolução isotrópica de 19,86 μm, 50Kv, 800 μA; estabelecendo uma rotação de 180°, com passos de rotação de 0.9° utilizando um filtro de alumínio de 0.5 mm de espessura. Para o escaneamento, cada espécime foi fixado em um suporte com cera utilidade (Technew, Rio de Janeiro, RJ).

Na sequência, foi realizada a reconstrução das imagens em 3D das raízes pelo programa NRecon v1.6.6.0 (Bruker Micro-CT, Kontich, Bélgica) e realizada a redução de artefatos usando os parâmetros *Ring Artifact Correction* = 5; *Beam Hardening Correction* = 50%; *Smoothing* = 5, permitindo a visualização da microestrutura interna de cada espécime.

Após a fase de reconstrução das seções dos espécimes, as imagens foram segmentadas no programa Ctan v.1.12 *Software* (Bruker-microCT) e depois foi feita a reconstrução dos modelos tridimensionais no programa Ctvol v.2.2.1 *Software* (Bruker-microCT) permitindo a visualização dos espécimes. Para possibilitar o pareamento das amostras quanto ao volume e à

anatomia do canal radicular, foi utilizado o *Software* Ctan onde os dados quantitativos destes parâmetros foram mensurados.

6.4. Contaminação dos espécimes

Cada canal foi explorado com uma lima manual tipo Kerr #15 (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça) até que a ponta alcançasse o forame apical e fosse visualizada com o auxílio de um microscópio operatório. Esta medida foi considerada como comprimento de patência (CP).

Foi então realizado um "banho" de EDTA a 17% em todos os espécimes, visando à remoção da *smear layer*, para facilitar a penetração do caldo de cultura nos túbulos dentinários. Com o auxílio de uma seringa e agulha NaviTip 30G (Ultradent, South Jordan, UT), todos os canais radiculares foram irrigados com 2 mL de EDTA a 17%. Em seguida, foram agitados em ultrassom imersos em EDTA a 17% e depois em água destilada, ambos por 3 minutos.

Para realizar a contaminação, os canais radiculares foram preenchidos com caldo tripticase soja (Difco, Detroit, MI, EUA) através de seringa e agulha NaviTip 30G até que o caldo extravasasse pelo forame apical. Em seguida, as raízes foram colocadas em um frasco contendo 200 mL de caldo Tioglicolato e agitado por ultrassom durante 1 minuto, para liberar o ar retido e permitir a penetração do meio de cultura em irregularidades do canal radicular. Em seguida, os espécimes foram esterilizados em autoclave e imersos no meio de cultura. Após a esterilização, 5 mL de uma cultura bacteriana mista obtida de uma amostra de placa dental subgingival de um voluntário, crescida durante 24 horas a 37°C em caldo Tioglicolato de coluna alta, foi adicionada ao meio contendo os espécimes. Procedeu-se a incubação em aerobiose, durante 30 dias a 37°C sob agitação suave, e o meio de cultura foi renovado a cada semana.

6.5. Preparo químico-mecânico dos canais radiculares e procedimentos de coleta e processamento das amostras microbiológicas

Antes do preparo químico-mecânico, os espécimes contaminados foram removidos do meio de cultura, distribuídos de acordo com cada grupo. Posteriormente, a superfície externa da raiz foi limpa e desinfetada com peróxido de hidrogênio a 3%, seguido de NaOCl a 2,5%, e inativação desta última por tiossulfato de sódio a 10%. O terço apical de cada raiz foi revestido com Topdam (FGM, Joinville, SC), a fim de evitar o extravasamento de bactérias e criar um sistema fechado para simular o efeito de *vapor lock*.

Os espécimes foram fixados verticalmente em um torno de bancada. A superfície externa cervical do espécime que ficou exposta foi então desinfetada com NaOCl a 2,5%, seguido de inativação desta substância com tiossulfato de sódio a 10%. Em seguida, foi realizada uma coleta, com um cone de papel absorvente #80 (Dentsply, Petrópolis, RJ), esfregado na parede da cavidade de acesso próximo ao bordo de seu ângulo cavo-superficial, para o controle da esterilidade (C1).

Amostras microbiológicas foram obtidas dos canais radiculares, através de cones de papel absorvente, antes (S1), após do preparo químico-mecânico (S2) e após o procedimento de desinfecção suplementar (S3). Para a coleta S1, cada canal radicular foi irrigado com 1 mL de solução salina estéril a 0,85% para remover as células bacterianas não aderidas, enquanto que para a coleta S2 e S3, imediatamente após o preparo químico-mecânico e após a ativação do irrigante/preparo com limas Hedström, o canal radicular foi irrigado com 1 mL de tiossulfato de sódio a 10%, para inativar o NaOCl. Em todos os casos, 3 a 5 cones de papel estéreis foram levados ao comprimento de trabalho (CT) adotado, ou seja, 1 milímetro aquém do CP. Cada cone de papel permaneceu no canal por 1 minuto. Os cones foram transferidos para tubos contendo 1 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 7,6), identificados e congelados a - 20°C.

Cada canal em “C” foi considerado como se fossem três canais radiculares. Cada instrumento para ambos os grupos foi usado para preparar 1 espécime (3 canais). O volume de irrigação com NaOCl a 2,5% por canal ao final do preparo químico-mecânico foi 9 mL, enquanto que o volume do irrigante usado nos procedimentos suplementares foi de 2 mL para ambos os grupos. Assim, o volume total do irrigante usado por canal para cada espécime foi 11 mL. Como cada canal em “C” foi considerado como três canais independentes, o volume total do irrigante usado por espécime após o preparo químico-mecânico foi 27 mL e após os procedimentos complementares 6 mL. O volume total do irrigante usado para cada espécime foi 33 mL. A irrigação foi realizada com solução de NaOCl a 2,5%, aquecida em banho-maria a 37 ºC, usando uma agulha NaviTip 30-G de dispersão frontal posicionada a 3 mm aquém do CT e acoplada a uma bomba peristáltica (VATEA; ReDent-Nova, Ra'anana, Israel) para padronizar o fluxo da irrigação. O tempo total do preparo químico-mecânico foi registrado para cada espécime de cada grupo.

Todos os procedimentos foram realizados sob rigorosas condições assépticas dentro de um gabinete asséptico com aquecedor de ambiente modelo 800-Heater (Plas-Labs, Lansing, MI, EUA) para manter uma temperatura constante de 37 ºC durante todo o experimento.

Os espécimes foram divididos em dois grupos de 24 dentes cada, de acordo com a técnica empregada, conforme segue:

Grupo XP-endo Shaper: técnica com instrumento único XP-endo Shaper (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fond, Suíça) (XPS). O instrumento XPS (30/0,01) foi acionado por um motor eléctrico (VDW Silver, VDW, Munique, Alemanha), operado em movimento de rotação contínua no sentido horário e, de acordo com as recomendações do fabricante, os valores de torque e velocidade usados foram 1 Ncm e 1000 rpm, respetivamente. Foi realizada a irrigação inicial com 1 mL de NaOCl a 2,5% por 15 s com um fluxo de irrigação de 4 mL/min e a agulha de irrigação foi posicionada 3 mm aquém do CT. O instrumento XPS foi introduzido no canal

radicular e o avanço em direção apical foi realizado com 3 a 5 movimentos de entrada e saída, aplicando uma ligeira pressão apical até o CT ser atingido. Em seguida, o instrumento foi removido do canal e limpo com gaze estéril e o canal foi irrigado com 1 mL de NaOCl a 2,5% por 15 s com um fluxo de irrigação de 4 mL/min. A patência foi verificada entre cada ciclo de instrumentação através de um instrumento tipo Kerr #15. O XPS foi reintroduzido no canal radicular e usado por 10 segundos com 5 movimentos de entrada e saída com uma amplitude de 3 a 4 mm até o CT. Esta sequência foi repetida duas vezes, totalizando três ciclos de 10 segundos no CT. Após a conclusão da instrumentação, os canais foram irrigados com 5 mL de EDTA a 17% por 1 min e 6 mL de NaOCl a 2,5% com um fluxo de irrigação de 4 mL/min por 1:30 min/s, seguido de 1 mL de tiossulfato de sódio a 10% por 1 min, para realização da coleta S2, como descrito anteriormente. Após esse procedimento, a câmara pulpar foi selada com algodão estéril e Top Dam, e o espécime foi imediatamente escaneado no μCT (escaneamento #2) (Figura 2).

Grupo BioRaCe: técnica seriada com instrumento BioRaCe. Os instrumentos foram acionados por um motor eléctrico (VDW Silver), operado em movimento de rotação contínua no sentido horário. Foram utilizados na sequência e com os valores de torque e velocidade recomendada pelo fabricante. Foi realizada a irrigação inicial com 1 mL de NaOCl a 2,5%. Cada instrumento (BR0 25/0,08, BR1 15/0,05, BR2 25/0,04, BR3 25/0,06 e BR4 35/0,04) foi introduzido até o CT. A patência do canal foi verificada através de um instrumento manual tipo Kerr #15. A irrigação foi realizada a cada troca de instrumento, utilizando 1 mL de NaOCl a 2,5%, por 15 s com um fluxo de irrigação de 4 mL/min através de agulha posicionada 3 mm aquém do CT. Após a conclusão da instrumentação, o canal foi irrigado com 5 mL de EDTA a 17% por 1 min e 6 mL de NaOCl a 2,5% com um fluxo de irrigação de 4 mL/min por 1:30 min/s, seguido de 1 mL de tiossulfato de sódio a 10% por 1 min, para realização da coleta S2. Após

esse procedimento, a câmara pulpar foi selada com algodão estéril e Top Dam, e o espécime foi imediatamente escaneado no μCT (escaneamento #2). (Figura 2)

6.6. Procedimentos antibacterianos suplementares

Após o escaneamento #2, foi realizado em cada grupo um procedimento suplementar de desinfeção. No grupo XP-endo Shaper foi realizada uma ativação da irrigação com o XP-endo Finisher, enquanto que no grupo BioRace foi realizada uma limagem circunferencial adicional com instrumentos Hedström.

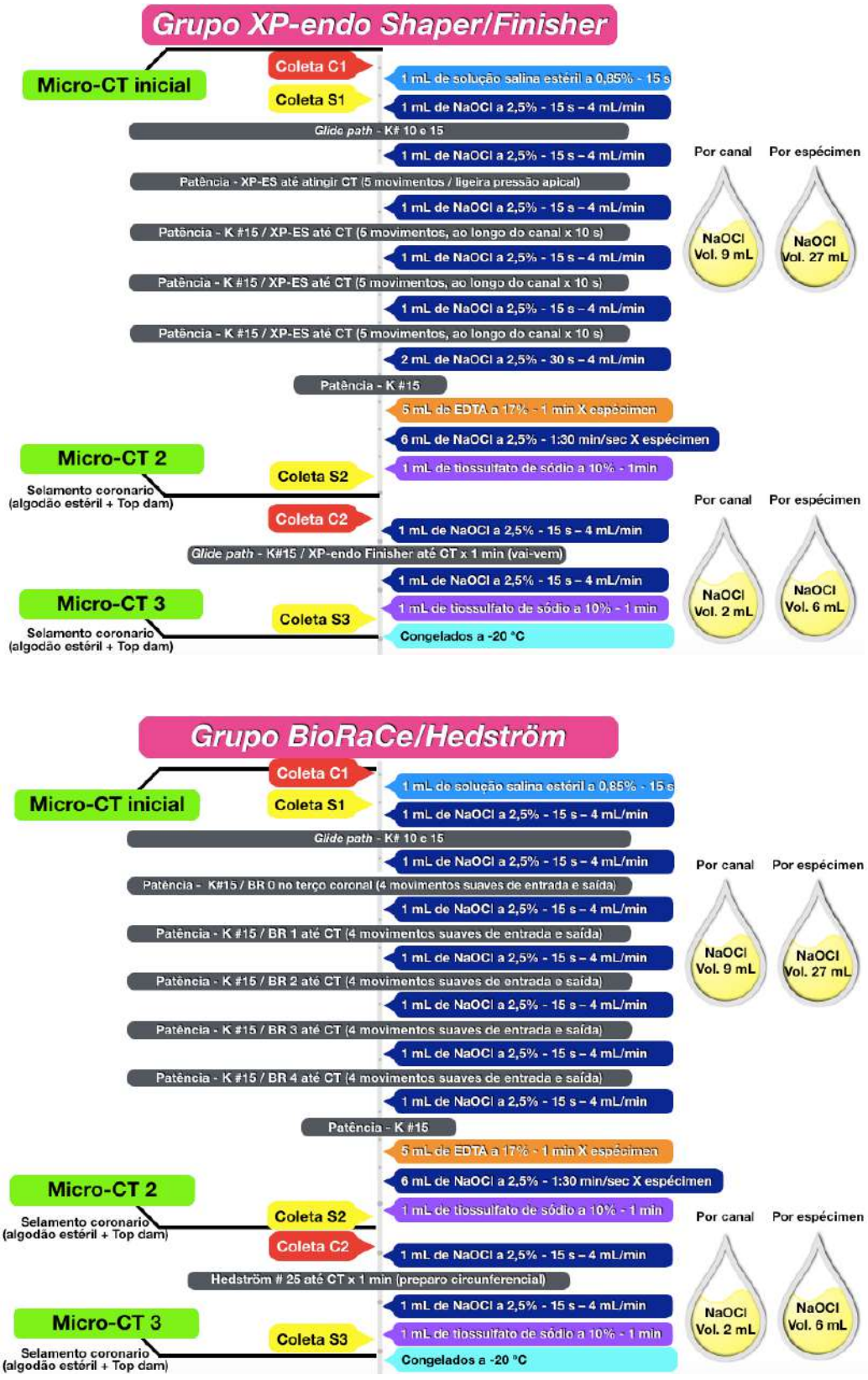
Na sequencia, o selamento coronário (algodão estéril/Top Dam) foi removido, cada espécime foi reposicionado verticalmente no torno e a superfície externa cervical da coroa que ficou exposta foi então desinfetada como descrito anteriormente. Após esse procedimento, foi realizada uma nova coleta para o controle da desinfecção (C2).

No grupo *XP-endo Shaper/XP-endo Finisher (XP-E)*, o canal radicular foi irrigado com 1 mL de NaOCl a 2,5% por 15 s com um fluxo de irrigação de 4 mL/min através de agulha posicionada 3 mm aquém do CT. Em seguida, a XP-endo Finisher foi usada para ativar o irrigante. O instrumento XP-endo Finisher foi utilizado durante 1 min por canal, com avanço em direção apical em movimentos de 7 mm de amplitude, aproximadamente, e com uma cinemática de rotação contínua, de acordo com as recomendações do fabricante. O canal foi novamente irrigado com 1 mL de NaOCl a 2,5%. O NaOCl foi então inativado com 1 mL de tiossulfato de sódio a 10% por 1 minuto e então a amostra S3 foi coletada. Após esse procedimento, a câmara pulpar foi selada com algodão estéril e Top Dam, e o espécime foi imediatamente escaneado no μCT (escaneamento #3) e congelado a - 20°C (Figura 2).

No grupo *BioRace/Hedström (BR-Hed)*, o canal radicular foi irrigado com 1 mL de NaOCl a 2,5% e, em seguida, limas Hedström #25 foram usadas até o CT por 1 min com movimentos de entrada e saída e limagem circunferencial contra todas as paredes do canal radicular para

preparar os recessos do formato em C. O canal foi novamente irrigado com 1 mL de NaOCl a 2,5%. Em seguida, o NaOCl foi inativado com 1 mL de tiossulfato de sódio a 10%, que foi deixado por 1 minuto, e então a amostra S3 foi coletada. Após esse procedimento, a câmara pulpar foi selada com algodão estéril e Top Dam e o espécime imediatamente escaneado no μCT (escaneamento #3) e congelado a - 20°C (Figura 2).

Figura 2 – Fluxogramas geral dos procedimentos para cada grupo experimental.



6.7. Avaliação da instrumentação através do *μ*CT

As imagens obtidas de cada espécime (escaneamento #2 e escaneamento #3) foram reconstruídas usando o programa NRecon v1.6.6.0, com os mesmos parâmetros utilizados para reconstruir as imagens do escaneamento inicial. Em seguida, foram obtidas as medidas morfométrica tridimensionais de área (mm^2), volume (mm^3) e Índice de Modelo de Estrutura (do inglês *Structure Model Index* - SMI) no programa CTAn v.1.14.4. Posteriormente, as imagens obtidas foram segmentadas no programa CTAn v.1.14.4 e depois foi feita a reconstrução dos modelos 3D no programa CTVol v.2.3.1 para permitir a visualização da estrutura interna dos canais radiculares. O programa 3D Slicer 4.4.0 (http://www.slicer.org) foi usado para o co-registro dos modelos 3D a partir de imagens pré-operatórias (escaneamento inicial) e pós-operatórias (escaneamentos #2 e #3) com uma combinação personalizada de um módulo de registro rígido baseado em similaridades de intensidade de imagem com precisão de 1 voxel. O programa ImageJ 1.50 d (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD) foi usado para avaliar a quantidade de superfície do canal radicular não-preparada calculando o número de *voxels* estáticos, que foi expresso como uma porcentagem do número total de *voxels* na superfície do canal. O programa CTVol v.2.3.1 foi usado para definir um padrão codificado por cores para os modelos do canal radicular [verde para pré-operatório, vermelho (escaneamento #2) e azul (escaneamento #3) para as superfícies do canal preparado (pós-operatório). Isso permitiu a comparação dos modelos de canais radiculares sobrepostos a partir de exames pré e pós-operatórios.

6.8. Avaliação da ação antimicrobiana do preparo químico-mecânico por PCR quantitativo em tempo real

As amostras dos canais foram descongeladas em temperatura ambiente e o DNA foi extraído utilizando o *kit* QIAamp DNA Mini (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo o

protocolo indicado pelo fabricante para tecidos. Para a detecção e quantificação da carga bacteriana total antes e após o preparo químico-mecânico e após os procedimentos suplementares de desinfecção, o PCR em tempo real foi realizado para o gene 16S rRNA, com a mistura Power SYBR Green PCR Master (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em um termociclador ABI 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems), em um volume total de reação de 20 μL.

Para a detecção e quantificação bacteriana, o protocolo de reação utilizou o par de *primers* universais para o gene rRNA 16S (5'-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3' e 5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (ANTUNES *et al.*, 2015) em uma concentração de 0,5 μM para um volume de DNA extraído de 2 μL que foram adicionados à mistura padrão de PCR em placas de reação MicroAmp de 96 poços. As placas foram seladas, centrifugadas e em seguida submetidas à amplificação. As condições de ciclagem para o qPCR incluíram 95ºC durante 10 min e 40 repetições das seguintes etapas: 95ºC durante 1 min, 52ºC durante 1 min e 72ºC durante 1 min. Os produtos do PCR foram mensurados a 78ºC. Em cada ciclo, o acúmulo dos produtos do PCR foi detectado monitorando o aumento da fluorescência da reação. Todas as mensurações foram realizadas em triplicata para as amostras e padrões. Em todos os experimentos, triplicatas dos controles negativos não contendo o template do DNA, que foram sujeitos aos mesmos procedimentos para excluir ou detectar possíveis contaminações.

Os níveis de bactérias totais foram inferidos para cada amostra com base na curva padrão construída usando DNA extraído de concentrações conhecidas de *Streptococcus mutans* cepa ATCC 25175. O DNA isolado de culturas puras desta cepa foi quantificado usando o BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Conhecendo o tamanho do genoma desta espécie e o peso molecular médio de 1 par de bases (660 Da), o valor de DNA medido foi convertido a níveis de cópias genômicas alvo por microlitro usando a fórmula $m = n$ (1 mole/6 x 10^{23} [bp]) (660 [g]/mole) = n (1,096 x 10^{-21} [g/pb]), onde m é a massa genômica de uma

única célula e *n* o tamanho do genoma. Os níveis de cópias do genoma foram considerados numericamente equivalentes aos níveis de células bacterianas. Extratos de DNA foram diluídos 10 vezes de 10^7 a 10^2 células em tampão Tris-EDTA e utilizados para a construção da curva padrão.

Os níveis de bactéria totais não podem ser calculados com precisão devido às diferenças no número de cópias do gene do 16S rRNA entre as diversas espécies de bactérias orais. Portanto, o DNA de *S. mutans*, que contém 5 cópias do gene do 16S rRNA, foi utilizado, sendo 5 considerado como o número médio aproximado de cópias do gene do 16S rRNA da maioria das bactérias orais conhecidas.

6.9. Análise Estatística

6.9.1. Análise *μ*CT

Foi necessário estabelecer a relação intergrupo e intragrupo para comparar o volume, área de superfície, *Structure Model Index* (SMI) e área da superfície não instrumentada, através do μCT após o preparo químico-mecânico e procedimentos suplementares em cada espécime. A distribuição dos dados foi verificada quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Para a análise da área de superfície não preparada, o teste T não pareado foi usado para comparação de grupos, e um teste T pareado foi usado para comparação intragrupo. O teste de Mann-Whitney foi usado para a comparação intergrupo de volume, área de superfície e Índice do Modelo de Estrutura (SMI) e também para a análise de aumento percentual entre os grupos. O teste de Friedman foi usado para a comparação intragrupo entre os escaneamentos #1, #2 e #3, e o teste de Wilcoxon foi usado para comparar as porcentagens aumentadas do escaneamento #2 versus o escaneamento #3 dentro do mesmo grupo. Todos os valores foram processados no Prism 8.3 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) e expressos como

média ± desvio padrão e também como mediana, valores mínimo e máximo. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$.

6.9.2. Análise Microbiológica

Foi analisada a contagem de bactérias entre os 2 grupos estudados, envolvendo três tempos: S1, S2 e S3. Vários modelos estatísticos, que podem ser usados para modelar contagens de dados de bactérias (variável discreta), foram desenvolvidos. Esses modelos incluem os modelos de Poisson, binomial negativo (NB), inflacionado de zero (Poisson e NB) e de contagem truncada. No entanto, a regressão de Poisson é tradicionalmente concebida como o modelo básico no qual todos os outros modelos de contagem são baseados. Em muitas aplicações, o modelo de Poisson não é apropriado porque assume que a variância distributiva e a média são iguais, uma relação chamada de equidispersão. Avaliamos a suposição de equidispersão com os dados do nosso estudo e descobrimos que ela foi violada. Isso poderia ser explicado pela presença de muitas contagens zero em S2 e S3 e, o mais importante, alta correlação nos dados, que foram estruturados em painéis com cada indivíduo tendo contagens em S1, S2 e S3. Portanto, relaxamos a suposição distributiva do modelo de Poisson, empregando o modelo NB. Em particular, ajustamos o modelo NB tradicional (NB2) com efeitos aleatórios em nível individual para contabilizar o agrupamento dos dados em nível individual. Este modelo de regressão estimou o efeito de cada grupo sobre o desfecho (contagem de bactérias em S2 e S3). A comparação entre os grupos com relação à contagem bacteriana em S2 e S3 foi realizada ajustando pela contagem de bactérias em S1. O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar os dados de presença / ausência bacteriana em S2 e S3. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico StataSE 15 (Stata Corp., Station College, TX, EUA) e o nível de significância estatística estabelecido foi de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Resultados da μCT

Para a avaliação por μCT, 4 espécimes foram descartados. Três no grupo XP-E devido à fratura do instrumento (1 XP-endo Shaper e 2 XP-endo Finisher) e um no grupo BR-Hed devido a rasgo na parte interna do sulco, após o preparo com a BioRaCe. Todas as análises morfométricas em 3D são mostradas na Tabela 1. A análise por μCT não mostrou diferenças significativas nos parâmetros pré-operatórios entre os grupos, demonstrando que a amostra era homogênea (P> 0,05). Em relação ao volume, área de superfície e alterações no SMI após instrumentação e etapas complementares, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (P> 0,05). No entanto, na comparação intragrupo, todos os valores aumentaram significativamente após cada etapa da preparação (P <0,05), exceto nos valores do SMI entre o uso do XP-endo Shaper e o instrumento XP-endo Finisher (P> 0,05). A análise do aumento percentual dos parâmetros acima mencionados não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos (P> 0,05). No entanto, um aumento percentual significativo de volume e área de superfície foi encontrado na comparação intragrupo (P <0,05).

Em relação às áreas não instrumentadas dos canais radiculares em forma de “C”, a análise intergrupo não mostrou diferenças significativas entre as etapas pós-operatórias e suplementares (P> 0,05). Após preparo com BioRaCe e XP-endo Shaper, as porcentagens de áreas não instrumentadas do canal foram 11,29% e 11,70%, respectivamente, sendo significativamente reduzidas após o a instrumentação suplementar para 8,48% (Hedström) e 7,57% (XP-endo Finisher) (P <0,05). A avaliação qualitativa, apresentada como sobreposição de áreas não instrumentadas (verde) e preparadas (vermelha e azul), mostrou manutenção da forma geral do sistema de canais radiculares nos dois grupos (Figura. 3 A-F).

Figura 3 – Imagens tridimensionais representativas de segundos molares inferiores com canais radiculares em formato de "C": (a & d) pré-operatório (verde), (b & e) instrumentação pós-operatória com BioRaCe ou XP-endo Shaper (verde/vermelho) e (c & f) instrumentação suplementar com limas Hedström ou XP-endo Finisher. As imagens na parte superior representam o lado do sulco longitudinal do molar em forma de "C", enquanto as imagens na parte inferior representam o lado oposto do dente.

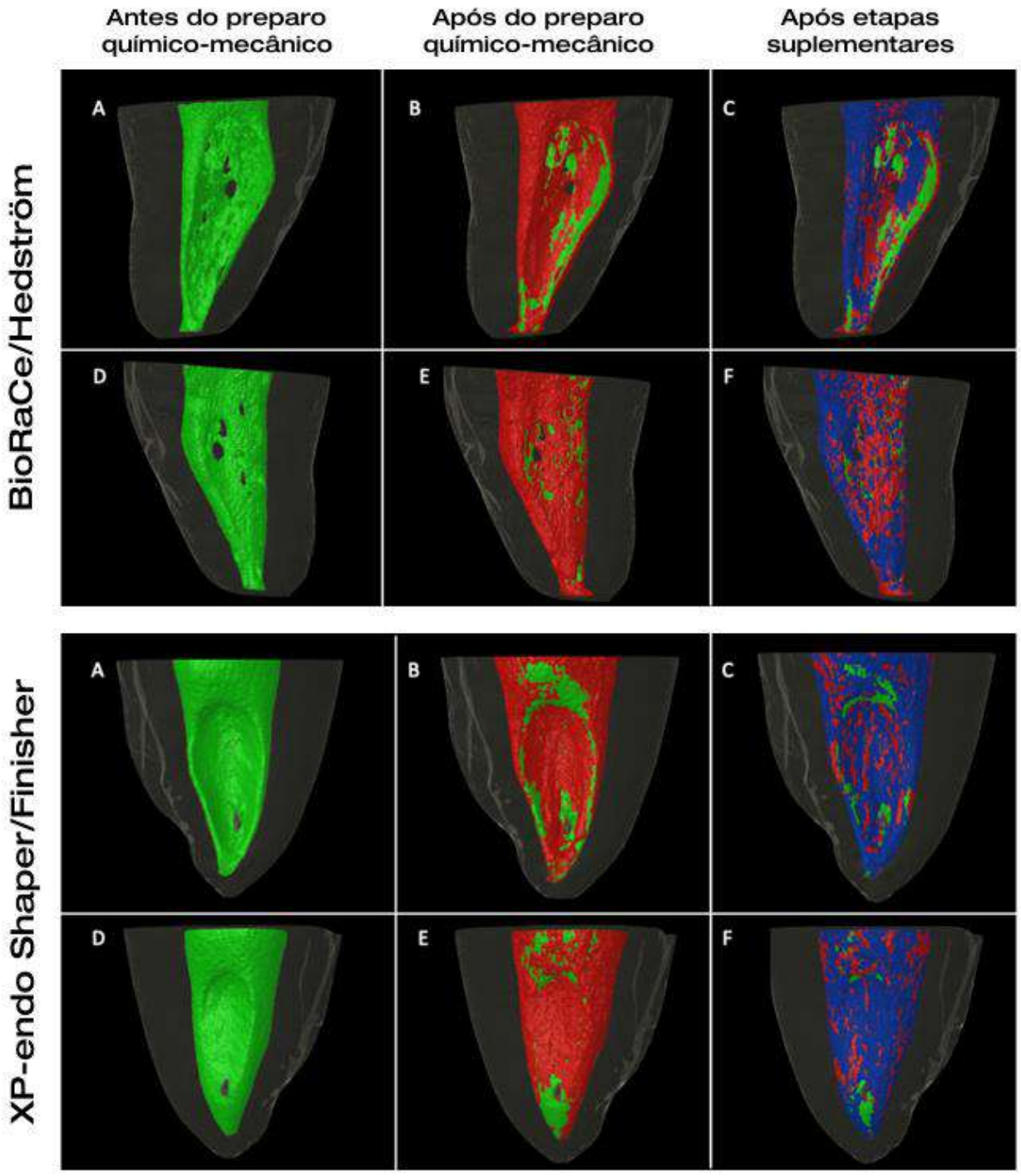


Tabela 1 – Média ± desvio padrão (SD do inglês *standard deviation*), mediana e variação (mínima-máxima) do volume, área de superfície, índice do modelo de estrutura (SMI do inglês *structure model index*), e área de superfície do canal não preparada de canais radiculares em forma de "C" (*C-shaped*) antes e depois do preparo químico-mecânico e após de etapas suplementares de desinfecção

Grupo		Volume (mm^3)		Área de superfície (mm^2)		Índice do Modelo de Estrutura (SMI)		Área não preparada (%)	
		Média ± SD	***Mediana (variação)***	**Média ± SD**	***Mediana (variação)***	**Média ± SD**	***Mediana (variação)***	**Média ± SD**	***Mediana (variação)***
BR-Hed (n=23)	**Pré-operatório**	**11,54 ± 6,40^{a}**	**10,02 (3,12 – 27,63)^{A}**	**87,43 ± 35,63^{a}**	**83,12 (23,19 – 152,40)^{A}**	**1,02 ± 0,71^{a}**	**0,76 (0,11 – 2,55)^{A}**		
	Pós-operatório	**22,58 ± 10,38^{b}**	**20,63 (10,19 – 51,57)^{B}**	**101,60 ± 34,58^{b}**	**97,18 (57,17 – 168,10)^{B}**	**1,77 ± 0,75^{b}**	**1,93 (0,32 – 2,98)^{B}**	**11,29 ± 8,17^{f}**	**11,79 (0,33 ± 26,21)^{F}**
	Suplementar	**25,43 ± 12,13^{c}**	**23,10 (12,66 – 59,27)^{C}**	**108,08 ± 37,51^{c}**	**99,62 (63,02 – 185,90)^{C}**	**2,10 ± 0,60^{c}**	**2,10 (0,68 – 3,02)^{C}**	**8,48 ± 6,41^{g}**	**8,13 (0,2 ± 20,23)^{G}**
	Pós-operatório % incremento	**49,41 ± 14,65^{d}**	**51,86 (16,12 – 72,79)^{D}**	**15,30 ± 15,46^{d}**	**8,82 (1,74 – 65,59)^{D}**	**42,83 ± 25,78^{d}**	**41,26 (1,20 – 90,52)^{D}**		
	Suplementar % incremento	**54,93 ± 13,93^{e}**	**53,82 (24,01 – 77,84)^{E}**	**20,84 ± 15,30^{e}**	**19,32 (4,35 – 66,72)^{E}**	**53,30 ± 25,36^{d}**	**56,83 (5,20 – 91,20)^{E}**		
XP-E (n=21)	**Pré-operatório**	**10,57 ± 5,47^{a}**	**8,89 (4,63 – 26,80)^{A}**	**83,26 ± 32,77^{a}**	**69,47 (45,22 – 169,5)^{A}**	**0,86 ± 0,45^{a}**	**0,90 (0,50 – 1,80)^{A}**		
	Pós-operatório	**19,33 ± 6,93^{b}**	**17,89 (10,92 – 28,74)^{B}**	**91,26 ± 33,67^{b}**	**85,70 (48,81 – 185,30)^{B}**	**1,97 ± 0,77^{b}**	**1,84 (0,75 – 3,97)^{B}**	**11,70 ± 7,15^{f}**	**10,54 (0,16 ± 26,78)^{F}**
	Suplementar	**21,14 ± 7,39^{c}**	**19,09 (13,26 – 28,96)^{C}**	**99,55 ± 39,78^{c}**	**89,74 (55,53 – 190,50)^{C}**	**2,09 ± 0,66^{b}**	**2,06 (0,96 – 3,49)^{C}**	**7,57 ± 6,08^{g}**	**5,58 (0,14 ± 21,37)^{G}**
	Pós-operatório % incremento	**46,76 ± 11,60^{d}**	**49,60 (19,37 – 61,61)^{D}**	**9,37 ± 7,72^{d}**	**6,75 (2,30 – 27,39)^{D}**	**52,23 ± 26,60^{d}**	**53,55 (10,87 – 98,74)^{D}**		
	Suplementar % incremento	**51,42 ± 10,94^{e}**	**53,62 (23,37 – 65,08)^{E}**	**15,65 ± 11,34^{e}**	**11,49 (4,97 – 45,52)^{E}**	**56,53 ± 23,46^{d}**	**58,33 (11,05 – 98,98)^{E}**		

BR-Hed (BioRaCe + Hedström); XP-E (XP-endo Shaper + XP-endo Finisher). Diferentes letras minúsculas denotam uma diferença estatística significativa intragrupo. Diferentes letras maiúsculas denotam uma diferença estatística significativa entre os grupos. Nível de significância $P < 0,05$.

7.2. Resultados Microbiológicos

A colonização bem-sucedida do canal radicular foi confirmada por PCR em tempo real usando primers universais baseados no gene 16S rRNA, pelo crescimento bacteriano em 43 das 48 amostras S1 (22 no grupo BR-Hed – 21 no grupo XP-E). As amostras de controle de esterilidade para todos os espécimes dos grupos analisados resultaram negativas para presença bacteriana. Após o preparo químico-mecânico, com os protocolos estabelecidos para cada grupo experimental 10/22 (45,5%) e 14/21 (66,7%), e da mesma forma, após as etapas suplementares 10/22 (45,5%) e 11/21 (52,4%) canais radiculares ainda apresentavam bactérias detectáveis, respectivamente, para os grupos BR-Hed e XP-E. Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto aos casos negativos para bactérias nas amostras S2 ou S3 (P> 0,05). A diminuição observada no número de casos positivos após o uso do instrumento XP-Endo Finisher também não foi estatisticamente significante (P> 0,05). (Anexos 2 e 3).

A Tabela 2 mostra as alterações nas contagens bacterianas entre os pontos do tempo em cada grupo. No grupo BR-Hed, uma redução significativa de 97% na contagem de bactérias foi observada entre S1 e S2. As contagens também diminuíram significativamente em 99% entre S1 e S3. No entanto, embora as contagens tenham diminuído 66% entre S2 e S3 no grupo BR-Hed, os resultados não foram estatisticamente significativos (P = 0,12). Da mesma forma, no grupo XP-E, as contagens bacterianas diminuíram significativamente entre S1 e S2 e entre S1 e S3 em 99% nos dois intervalos de tempo. No entanto, a redução da contagem bacteriana entre S2 e S3 de 18% não foi estatisticamente significativa (P = 0,79).

Tabela 2 – Razão da taxa de incidência [do inglês "Incidence rate ratios" (IRR)] observada a partir da deferência nas contagens dos níveis de bactérias intracanais entre os pontos de tempo em cada grupo experimental

Grupo	Redução S1 - S2		Redução S1 - S3		Redução S2 - S3	
	IRR (95% CI) % Redução	***P*-valor**	**IRR (95% CI) % Redução**	***P*-valor**	**IRR (95% CI) % Redução**	***P*-valor**
BR-Hed	0,03 (0,01, 0,13) 97%	< 0,01	0,01 (0,003; 0,04) 99%	< 0,01	0,34 (0,09; 1,32) 66%	0,12
XP-E	0,01 (0,002; 0,03) 99%	< 0,01	0,01 (0,002; 0,03) 99%	< 0,01	0,82 (0,20; 3,34) 18%	0,79

CI (intervalo de confiança); BR-Hed (BioRaCe/Hedström); XP-E (XP-endo Shaper/XP-endo Finisher); S1 [Amostra coletada antes do preparo químico-mecânico (*baseline*)]; S2 (Amostra coletada após o preparo químico-mecânico); S3 (Amostra coletada após as etapas suplementares).

Também foram comparadas as contagens médias de células bacterianas encontradas nas amostras, relatadas na Tabela 3, em cada momento. Nossos achados apresentados na Tabela 4 mostraram que as contagens eram 5 vezes maiores no grupo XP-E do que no grupo BR-Hed nas amostras S1 (5.926×10^4 – 1.146×10^4, respectivamente). Embora, a contagem média de células bacterianas ainda fosse alta no grupo XP-E do que no grupo BR-Hed em S2 e S3, os resultados não foram estatisticamente significativos.

Tabela 3 – Dados moleculares sobre a carga microbiana intracanal antes (S1), após o preparo químico-mecânico (S2) e após as etapas suplementares (S3) em segundos molares inferiores com canais radiculares em forma de "C"

Grupo	S1	S2	S3
BR-Hed	1.146×10^4	3.829×10^2	1.285×10^2
XP-E	5.926×10^4	5.029×10^2	4.145×10^2

BR-Hed (BioRaCe/Hedström); XP-E (XP-endo Shaper/XP-endo Finisher)

Tabela 4 – Diferenças na média das contagens bacterianas intracanal entre cada grupo experimental (BR-Hed e XP-E) em S1, S2 e S3

Grupo	S1		S2		S3	
	IRR (95% CI)	***P*-valor**	**IRR (95% CI)**	***P*-valor**	**IRR (95% CI)**	***P*-valor**
Ref: BR-Hed						
XP-E	5,17 (1,30; 20,65)	0,02	1,31 (0,33; 5,25)	0,70	3,23 (0,81; 12,89)	0,10

IRR (*Incidence Rate Ratio*); CI (intervalo de confiança); BR-Hed (BioRaCe/Hedström); XP-E (XP-endo Shaper/XP-endo Finisher); S1 [Amostra coletada antes do preparo químico-mecânico (*baseline*)]; S2 (Amostra coletada após o preparo químico-mecânico); S3 (Amostra coletada após as etapas suplementares).

Com relação ao tempo de retenção de NaOCl registrado no grupo BR-Hed e XP-E, a média foi muito semelhante, 28,5 minutos e 28,4 minutos por espécime, respectivamente.

8. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou e correlacionou a redução bacteriana intracanal e a capacidade de modelagem em segundos molares inferiores com sistemas de canais radiculares em forma de "C" ou *C-shaped* (Tipo I), promovido por dois protocolos de preparo químico-mecânico e etapas suplementares para otimizar a desinfecção utilizando NaOCl a 2,5% como solução irrigadora, através de uma abordagem de μCT/PCR em tempo real, evidenciando que os protocolos de preparação mostraram eficácia comparável na redução de contagens bacterianas e na conformação de canais radiculares com uma configuração em "C".

Os dados de modelagem, obtidos através da μCT, revelaram que o volume, a área de superfície e o SMI aumentaram significativamente após a etapa de preparação com os sistemas XP-endo Shaper ou BioRaCe, sem diferenças estatísticas significativas entre eles. O aumento nos valores de SMI após a preparação indica que os canais planos, irregulares e estreitos, característicos da anatomia dos canais radiculares em forma de "C" , mudaram para canais mais cônicos arredondados e mais lisos. Esses achados estão relacionados aos resultados da microbiologia molecular, que mostraram que o alargamento do canal radicular por qualquer um desses dois sistemas de instrumentação, combinado com a irrigação com NaOCl, promoveu uma redução altamente significativa na contagem bacterianas intracanal. A redução substancial da carga bacteriana após o preparo químico-mecânico está de acordo com estudos anteriores em anatomias menos complicadas do canal radicular (ALVES *et al.*, 2016; GAZZANEO *et al.*, 2019).

Estudos têm demonstrado que a obtenção de resultados negativos de cultura (WALTIMO *et al.*, 2005) ou qPCR (ZANDI *et al.*, 2019) após o preparo químico-mecânico pode projetar um bom prognóstico do tratamento endodôntico. Consequentemente, estudos clínicos microbiológicos têm sido usados como desfechos substitutos para os resultados do

tratamento (RODRIGUES *et al.*, 2017). Embora a força da evidência dos estudos *ex vivo* seja muito menor do que os ensaios clínicos, eles têm um propósito importante de acelerar os resultados para avaliação de novos instrumentos e materiais, comparando-os com os já estabelecidos, e antecipando o desempenho clínico. Os resultados, obviamente, devem ser interpretados com cautela e requerem validação adicional por ensaios clínicos. Nesse contexto, a avaliação microbiológica realizada neste estudo revelou que a preparação com XP-endo Shaper resultou em 33,3% dos casos negativos para bactérias, que aumentaram para 47,6% após a abordagem suplementar com XP-endo Finisher. A preparação com os instrumentos BioRaCe deixou 54,5% dos canais livres de bactérias, sem alterações nos casos negativos após o uso das limas Hedström. Esses achados revelaram que aproximadamente a metade dos canais em forma de "C" ainda tinham bactérias detectáveis, independentemente da abordagem de preparação usada. Esses números para casos qPCR-negativos estão dentro da faixa de 30% a 70% relatados por estudos de microbiologia molecular (PAIVA *et al.*, 2012; ZANDI *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2017).

Os resultados microbiológicos quantitativos das etapas suplementares para otimizar a desinfecção mostraram que os níveis bacterianos foram reduzidos em 66% após o uso de limas Hedström e em 18% após o uso de XP-endo Finisher. Esses valores percentuais de redução representam desinfecção adicional após a preparação com os instrumentos BioRaCe ou XP-endo Shaper. No entanto, esse aumento na eliminação bacteriana intracanal não atingiu significância estatística em ambos os grupos, o que significa que ambas as abordagens suplementares não tiveram sucesso em melhorar significativamente a desinfecção. Quanto ao uso da lima Hedström, no movimento de limagem circunferencial como etapa complementar, os presentes achados estão de acordo com um estudo anterior que não mostrou desinfecção adicional significativa em canais longos ovais (ALVES *et al.*, 2011). Quanto ao instrumento XP-endo Finisher, a literatura mostra resultados inconclusivos quanto aos seus efeitos na

remoção bacteriana. Enquanto alguns estudos estão em consonância com os presentes achados (CARVALHO *et al.*, 2020; TUFENKCI & YILMAZ, 2020) outros encontraram uma redução bacteriana adicional significativa com esta abordagem final (ALVES *et al.*, 2016; AZIM *et al.*, 2016; BAO *et al.*, 2017). Os longos recessos presentes nos canais em forma de "C" podem tornar difícil para o instrumento XP-endo Finisher penetrar e deslocar bactérias residuais, ajudando a explicar as diferenças nos resultados de diferentes estudos.

As quantidades médias de áreas não preparadas após o preparo químico-mecânico com os instrumentos BioRaCe e XP-endo Shaper foram 11,29% e 11,70%, respectivamente. Esses valores são mais baixos do que os relatados por um estudo anterior também usando canais radiculares em forma de "C" (ZHAO *et al.*, 2019), que relatou 33% para o instrumento XP-endo Shaper e 30,5% para o instrumento Reciproc Blue. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que, no presente estudo, foi utilizado mais um ciclo do instrumento XP-endo Shaper, e o diâmetro final da preparação foi maior para o outro sistema utilizado (BioRaCe). Outra possível razão para as diferenças percentuais é o fato de que o presente estudo selecionou exclusivamente canais em forma de "C" do tipo I; variável que não foi padronizada na investigação anterior (ZHAO *et al.*, 2019).

Tanto o instrumento XP-endo Finisher como a lima Hedström, utilizados como abordagens complementares, aumentaram significativamente a quantidade de superfícies preparadas do canal radicular após a preparação com os instrumentos XP-endo Shaper e BioRaCe, respectivamente (11,70% a 7,57% no grupo XP-E e 11,29% a 8,48% no Grupo BR-Hed). As limas Hedström possuem um núcleo metálico mais rígido e alta capacidade de corte e podem ser direcionadas em movimentos circunferenciais de limagem para as paredes dentinárias ou istmos. O instrumento XP-endo Finisher (ISO 25/.00), por sua vez, é um instrumento rotatório reto de fase martensítica, quando resfriado, fabricado com uma liga NiTi MaxWire, que sofre uma mudança para a fase austenítica à temperatura corpórea para

assumir uma "forma de colher" única. Embora este instrumento não esteja desenhado para cortar dentina, de acordo com o fabricante, foi observado aumento significativo de volume e área de superfície nos presentes resultados. Existe a possibilidade de que o aumento no volume e na área de superfície após a utilização do XP-endo Finisher não tenha sido um resultado de sua ação de corte, mas um artefato da análise por μCT como segue. Após a instrumentação com o instrumento XP-endo Shaper, fragmentos de tecido duro podem ter se acumulado em algumas áreas do canal radicular e o software os interpretou como parte da parede do canal. Como o instrumento XP-endo Finisher demonstrou ser altamente eficaz na remoção de resíduos de tecido duro (ZHAO *et al.*, 2019), isso pode ter sido considerado como um aumento no volume do canal e na área da superfície, sem qualquer ação de corte do instrumento. Isso também pode ajudar a explicar o fato de que nenhuma alteração significativa no SMI foi verificada após o uso do XP-endo Finisher, mostrando que este instrumento não alterou a forma 3D final do canal radicular. O aumento significativo nas superfícies de parede preparadas após ambas as abordagens suplementares não foi traduzido em uma melhor desinfecção para essas abordagens suplementares.

Os pontos fortes deste estudo foram a primeira avaliação de abordagens intracanais para desinfetar canais radiculares em forma de “C” e o uso de duas metodologias analíticas de ponta para avaliar a desinfecção e modelagem nos mesmos espécimes. Um método quantitativo de microbiologia molecular foi utilizado por ser muito mais sensível que o método de cultura e, portanto, espera-se que seja mais preciso na avaliação dos efeitos antibacterianos de protocolos de tratamento (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005). A microtomografia computadorizada tem sido amplamente aplicada na avaliação 3D da anatomia do canal radicular antes e após do preparo de forma não destrutiva (PETERS *et al.*, 2001). A utilização da μCT também permitiu uma seleção ideal de espécimes com anatomias complexas e uma abordagem confiável de pareamento para minimizar os vieses da anatomia

(VERSIANI *et al.*, 2016). Outras variáveis importantes geralmente não padronizadas na maioria dos estudos anteriores foram controladas aqui, incluindo a temperatura ambiente e irrigante, bem como o volume, tempo de retenção e taxa de fluxo de NaOCl no sistema de canais radiculares. Além disso, na tentativa de simular melhor o quadro clínico, uma cultura bacteriana mista obtida de amostra de placa dentária subgingival foi utilizada para contaminação do sistema de canais radiculares.

No entanto, este estudo também apresenta limitações. Sua natureza *ex vivo* indica que qualquer extrapolação para o quadro clínico deve ser feita com cautela. Além disso, a coleta de amostras com cones de papel absorvente revela apenas as condições bacteriológicas do lúmen do canal radicular principal e suas paredes dentinárias e, possivelmente, sua vizinhança imediata (ALVES *et al.*, 2009). Uma abordagem de criopulverização teria sido importante para revelar bactérias residuais localizadas em áreas não amostradas pela abordagem com cones de papel (ALVES *et al.*, 2009). No entanto, como a abordagem de criopulverização resulta na destruição irreversível da amostra, ela não pode ser usada para avaliações em 2 ou 3 períodos de tempo diferentes.

9. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo indicaram que os sistemas BioRaCe e XP-endo Shaper possuem capacidade de desinfecção e modelagem semelhantes em molares inferiores com canais em forma de “C”. Além disso, as etapas suplementares com a lima Hedström e o instrumento XP-endo Finisher foram semelhantes em promover uma diminuição significativa na quantidade de superfícies do canal não preparadas. No entanto, esses efeitos não foram suficientes para melhorar significativamente a eliminação bacteriana. O desenvolvimento de métodos e estratégias mais eficazes e previsíveis na desinfecção de canais em forma de “C” deve ser incentivado.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. (2011). Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod* 37: 496-501.

Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Perez AR, Rôças IN, Versiani MA, Sousa-Neto MD, Provenzano JC, Siqueira JF, Jr. (2016). Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro-Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. *J Endod* 42: 1667-1672.

Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF, Jr. (2012). Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J* 45: 871-877.

Alves FR, Siqueira JF, Jr., Carmo FL, Santos AL, Peixoto RS, Rôças IN, Rosado AS (2009). Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 35: 486-492.

Alves FRF, Paiva PL, Marceliano-Alves MF, Cabreira LJ, Lima KC, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Provenzano JC (2018). Bacteria and Hard Tissue Debris Extrusion and Intracanal Bacterial Reduction Promoted by XP-endo Shaper and Reciproc Instruments. *J Endod* 44: 1173-1178.

Amoroso-Silva P, Alcalde MP, Hungaro Duarte MA, De-Deus G, Ordinola-Zapata R, Freire LG, Cavenago BC, De Moraes IG (2017). Effect of finishing instrumentation using NiTi hand files on volume, surface area and uninstrumented surfaces in C-shaped root canal systems. *Int Endod J* 50: 604-611.

Antunes HS, Rôças IN, Alves FR, Siqueira JF, Jr. (2015). Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. *J Endod* 41: 1037-1042.

Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT (2016). Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. *J Endod* 42: 928-934.

Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M (2017). In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. *J Endod* 43: 321-325.

Barnett F (1986). Mandibular molar with C-shaped canal. *Endod Dent Traumatol* 2: 79-81.

Bedier MM, Hashem AAR, Hassan YM (2018). Improved dentin disinfection by combining different-geometry rotary nickel-titanium files in preparing root canals. *Restor Dent Endod* 43: 46.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing Enterococcus faecalis within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 39: 10-17.

Bloomfield SF, Miles GA (1979). The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurateband sodium hipochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 46: 65-73.

Bolger WL, Schindler WG (1988). A mandibular first molar with a C-shaped root configuration. *J Endod* 14: 515-519.

Byström A, Sundqvist G (1983). Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 55: 307-312.

Byström A, Sundqvist G (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 18: 35-40.

Carvalho APL, Nardello LCL, Fernandes FS, Bruno FP, Paz LR, Iglecias EF, Honorio HM, Mayer MPA, Gavini G, Pinheiro ET (2020). Effects of Contemporary Irrigant Activation Schemes and Subsequent Placement of an Interim Dressing on Bacterial Presence and Activity in Root Canals Associated with Asymptomatic Apical Periodontitis. *J Clin Med* 9: 854.

Carvalho MC, Zuolo ML, Arruda-Vasconcelos R, Marinho ACS, Louzada LM, Francisco PA, Pecorari VGA, Gomes B (2019). Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. *Braz Oral Res* 33: 21.

Cheung LH, Cheung GS (2008). Evaluation of a rotary instrumentation method for C-shaped canals with micro-computed tomography. *J Endod* 34: 1233-1238.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR (2006). The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 32: 434-437.

Cohen S, Burns RC (2002). Pathways of the pulp. 8th. St. Louis: 196 - 229.

Cooke HG, 3rd, Cox FL (1979). C-shaped canal configurations in mandibular molars. *J Am Dent Assoc* 99: 836-839.

Cvek M, Nord C, Hollender L (1976). Antimicrobial effect of root canal debridement in teeth with immature root. *Odontol Revy* 27: 1–10.

Dankner E, Friedman S, Stabholz A (1990). Bilateral C shape configuration in maxillary first molars. *J Endod* 16: 601-603.

de Melo Ribeiro MV, Silva-Sousa YT, Versiani MA, Lamira A, Steier L, Pecora JD, de Sousa-Neto MD (2013). Comparison of the cleaning efficacy of self-adjusting file and rotary systems in the apical third of oval-shaped canals. *J Endod* 39: 398-401.

Debelian G, Trope M (2008). BioRace: efficient, safe and biological based sequence files. *Roots* 1: 20-26.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 13: 113-117.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felippe O, Jr. (1995). Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 6: 85-90.

Fan B, Cheung GS, Fan M, Gutmann JL, Bian Z (2004a). C-shaped canal system in mandibular second molars: Part I--Anatomical features. *J Endod* 30: 899-903.

Fan B, Cheung GS, Fan M, Gutmann JL, Fan W (2004b). C-shaped canal system in mandibular second molars: Part II--Radiographic features. *J Endod* 30: 904-908.

Fan B, Pan Y, Gao Y, Fang F, Wu Q, Gutmann JL (2010). Three-dimensional morphologic analysis of isthmuses in the mesial roots of mandibular molars. *J Endod* 36: 1866-1869.

Gao Y, Fan B, Cheung GS, Gutmann JL, Fan M (2006). C-shaped canal system in mandibular second molars part IV: 3-D morphological analysis and transverse measurement. *J Endod* 32: 1062-1065.

Gazzaneo I, Vieira GCS, Perez AR, Alves FRF, Goncalves LS, Mdala I, Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2019). Root Canal Disinfection by Single- and Multiple-instrument Systems: Effects of Sodium Hypochlorite Volume, Concentration, and Retention Time. *J Endod* 45: 736-741.

Grossman L, Meimam B (1941). Solution of pulp tissue by chemical agents. *J Am Dent Assoc* 28: 223–225.

Gu L, Wei X, Ling J, Huang X (2009). A microcomputed tomographic study of canal isthmuses in the mesial root of mandibular first molars in a Chinese population. *J Endod* 35: 353-356.

Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR (2009). Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod* 35: 791-804.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J (2005). Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 10: 77-102.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y (2010). Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 54: 291-312.

Hubscher W, Barbakow F, Peters OA (2003). Root-canal preparation with FlexMaster: canal shapes analysed by micro-computed tomography. *Int Endod J* 36: 740-747.

Jerome CE (1994). C-shaped root canal systems: diagnosis, treatment, and restoration. *Gen Dent* 42: 424-427; quiz 433-424.

Jin GC, Lee SJ, Roh BD (2006). Anatomical study of C-shaped canals in mandibular second molars by analysis of computed tomography. *J Endod* 32: 10-13.

Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF (2005). Enterococcus spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 31: 851-856.

Lacerda M, Marceliano-Alves MF, Perez AR, Provenzano JC, Neves MAS, Pires FR, Goncalves LS, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. (2017). Cleaning and Shaping Oval Canals with 3 Instrumentation Systems: A Correlative Micro-computed Tomographic and Histologic Study. *J Endod* 43: 1878-1884.

Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, van Poperin N, Hujoel PP (1992). Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol* 30: 418-426.

Lu TY, Yang SF, Pai SF (2006). Complicated root canal morphology of mandibular first premolar in a Chinese population using the cross section method. *J Endod* 32: 932-936.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S (2013). Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J* 46: 1083-1087.

Manning SA (1990). Root canal anatomy of mandibular second molars. Part II. C-shaped canals. *Int Endod J* 23: 40-45.

Marinho AC, Martinho FC, Goncalves LM, Rabang HR, Gomes BP (2015). Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? *Int Endod J* 48: 542-548.

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, Camoes IC (2014). Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod* 40: 625-629.

Melton DC, Krell KV, Fuller MW (1991). Anatomical and histological features of C-shaped canals in mandibular second molars. *J Endod* 17: 384-388.

Metzger Z, Zary R, Cohen R, Teperovich E, Paque F (2010). The quality of root canal preparation and root canal obturation in canals treated with rotary versus self-adjusting files: a three-dimensional micro-computed tomographic study. *J Endod* 36: 1569-1573.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998). Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 31: 1-7.

Möller AJ (1966). Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 74: Suppl:1-380.

Neves MA, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. (2016). Clinical Antibacterial Effectiveness of Root Canal Preparation with Reciprocating Single-instrument or Continuously Rotating Multi-instrument Systems. *J Endod* 42: 25-29.

Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB (2007). In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103: 702-706.

Pacheco-Yanes J, Provenzano JC, Marceliano-Alves MF, Gazzaneo I, Perez AR, Goncalves LS, Siqueira JF, Jr. (2020). Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study. *Clin Oral Investig* 24: 907-914.

Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, Soares RM, Rosado AS (2012). Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod* 38: 1202-1206.

Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS (2013). Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J* 46: 225-233.

Peters OA, Boessler C, Paque F (2010). Root canal preparation with a novel nickel-titanium instrument evaluated with micro-computed tomography: canal surface preparation over time. *J Endod* 36: 1068-1072.

Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F (2001). Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod* 27: 1-6.

Peters OA, Laib A, Ruegsegger P, Barbakow F (2000). Three-dimensional analysis of root canal geometry by high-resolution computed tomography. *J Dent Res* 79: 1405-1409.

Peters OA, Schonenberger K, Laib A (2001). Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 34: 221-230.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB (2004). Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms Actinomyces israelii, A. naeslundii, Candida albicans and Enterococcus faecalis. *Int Endod J* 37: 438-446.

Rhodes JS, Ford TR, Lynch JA, Liepins PJ, Curtis RV (2000). A comparison of two nickel-titanium instrumentation techniques in teeth using microcomputed tomography. *Int Endod J* 33: 279-285.

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. (2013). Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod* 39: 712-718.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr. (2008). Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod* 34: 1124-1129.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr. (2010). Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod* 36: 1-15.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr. (2010). Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 36: 1277-1288.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Bate AL, Pitt Ford TR (2009). Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod* 35: 493-502.

Rôças IN, Lima KC, Siqueira JF, Jr. (2013). Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation--a clinical study. *Int Endod J* 46: 681-687.

Rôças IN, Neves MA, Provenzano JC, Siqueira JF, Jr. (2014). Susceptibility of as-yet-uncultivated and difficult-to-culture bacteria to chemomechanical procedures. *J Endod* 40: 33-37.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr. (2010). Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod* 36: 45-52.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr. (2011). In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod* 37: 304-310.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Debelian GJ (2011). Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod* 37: 1206-1212.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR (2004). Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30: 315-320.

Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Orstavik D, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. (2017). Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod* 43: 1058-1063.

Sabala CL, Benenati FW, Neas BR (1994). Bilateral root or root canal aberrations in a dental school patient population. *J Endod* 20: 38-42.

Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Benno Y (2007). Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol* 22: 19-23.

Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Benno Y (2008). Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 23: 275-281.

Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y (2001). Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol* 45: 39-44.

Santos AL, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM (2011). Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One* 6: e28088.

Siqueira JF, Jr (2011). Treatment of endodontic infections. 1a ed. London: Quintessence Publishing, 416.

Siqueira JF, Jr., Alves FR, Versiani MA, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Sousa-Neto MD (2013). Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. *J Endod* 39: 1044-1050.

Siqueira JF, Jr., Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ (1997). Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod* 23: 499-502.

Siqueira JF, Jr., Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M (1998). Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 24: 414-416.

Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rôças IN (2007). Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod* 33: 667-672.

Siqueira JF, Jr., Paiva SS, Rôças IN (2007). Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod* 33: 541-547.

Siqueira JF, Jr., Perez AR, Marceliano-Alves MF, Provenzano JC, Silva SG, Pires FR, Vieira GC, Rôças IN, Alves FR (2017). What happens to unprepared root canal walls: a correlative analysis using micro-computed tomography and histology/scanning electron microscopy. *Int Endod J* 51: 501-508.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2003a). Bacteroides forsythus in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *J Endod* 29: 390-393.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2003b). PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent* 31: 333-339.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2004b). Nested PCR detection of Centipeda periodontii in primary endodontic infections. *J Endod* 30: 135-137.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2004a). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: 85-94.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2005a). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 31: 488-498.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2005b). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 31: 411-423.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2008). Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 34: 1291-1301 e1293.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2009). Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 88: 969-981.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN (2011). Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: a quest for predictability. *Aust Endod J* 37: 92-98.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Favieri A, Lima KC (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 26: 331-334.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Favieri A, Santos KR (2000). Detection of Treponema denticola in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 15: 335-337.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Lopes HP (2015). Microbiologia Endodôntica. In: Lopes HP and Siqueira JF, Jr. (eds). Endodontia Biologia e Tècnica. Rio de Janeiro: Elsevier, 63-89.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M (2002). Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 28: 181-184.

Siqueira JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Perez AR, Ricucci D (2018). Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res* 32: 65.

Solomonov M, Paque F, Fan B, Eilat Y, Berman LH (2012). The challenge of C-shaped canal systems: a comparative study of the self-adjusting file and ProTaper. *J Endod* 38: 209-214.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: 86-93.

Sundqvist G, Figdor D. (2003). Life as an endodontic pathogen - Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics* 6: 3 - 28.

Tufenkci P, Yilmaz K (2020). The Effects of Different Endodontic Access Cavity Design and Using XP-endo Finisher on the Reduction of Enterococcus faecalis in the Root Canal System. *J Endod* 46: 419-424.

Versiani MA, Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Provenzano JC, Rôças IN, Sousa-Neto MD, Siqueira JF, Jr. (2016). Micro-CT evaluation of the efficacy of hard-tissue removal from the root canal and isthmus area by positive and negative pressure irrigation systems. *Int Endod J* 49: 1079-1087.

Versiani MA, Pecora JD, de Sousa-Neto MD (2011). Flat-oval root canal preparation with self-adjusting file instrument: a micro-computed tomography study. *J Endod* 37: 1002-1007.

Versiani MA, Pecora JD, de Sousa-Neto MD (2012). Root and root canal morphology of four-rooted maxillary second molars: a micro-computed tomography study. *J Endod* 38: 977-982.

Versiani MA, Pecora JD, Sousa-Neto MD (2013). Microcomputed tomography analysis of the root canal morphology of single-rooted mandibular canines. *Int Endod J* 46: 800-807.

Vertucci FJ (1984). Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58: 589-599.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G (2006). In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 39: 484-492.

von Zuben M, Martins JNR, Berti L, Cassim I, Flynn D, Gonzalez JA, Gu Y, Kottoor J, Monroe A, Rosas Aguilar R *et al.*, (2017). Worldwide Prevalence of Mandibular Second Molar C-Shaped Morphologies Evaluated by Cone-Beam Computed Tomography. *J Endod* 43: 1442-1447.

Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D (2005). Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 31: 863-866.

Wu MK, R'Oris A, Barkis D, Wesselink PR (2000). Prevalence and extent of long oval canals in the apical third. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89: 739-743.

Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, Cao Y, Haapasalo M (2016). Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. *J Endod* 42: 1246-1250.

Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M (1995). Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod* 21: 513-515.

Yilmaz Z, Tuncel B, Serper A, Calt S (2006). C-shaped root canal in a maxillary first molar: a case report. *Int Endod J* 39: 162-166.

Yin X, Cheung GS, Zhang C, Masuda YM, Kimura Y, Matsumoto K (2010). Micro-computed tomographic comparison of nickel-titanium rotary versus traditional instruments in C-shaped root canal system. *J Endod* 36: 708-712.

Zandi H, Petronijevic N, Mdala I, Kristoffersen AK, Enersen M, Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Ørstavik D (2019). Outcome of Endodontic Retreatment Using 2 Root Canal Irrigants and Influence of Infection on Healing as Determined by a Molecular Method: A Randomized Clinical Trial. *J Endod* 45: 1089-1098 e1085.

Zandi H, Rodrigues RC, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. (2016). Antibacterial Effectiveness of 2 Root Canal Irrigants in Root-filled Teeth with Infection: A Randomized Clinical Trial. *J Endod* 42: 1307-1313.

Zehnder M (2006). Root canal irrigants. *J Endod* 32: 389-398.

Zhao Y, Fan W, Xu T, Tay FR, Gutmann JL, Fan B (2019). Evaluation of several instrumentation techniques and irrigation methods on the percentage of untouched canal wall and accumulated dentine debris in C-shaped canals. *Int Endod J* 52: 1354-1365.

Zheng Q, Zhang L, Zhou X, Wang Q, Wang Y, Tang L, Song F, Huang D (2011). C-shaped root canal system in mandibular second molars in a Chinese population evaluated by cone-beam computed tomography. *Int Endod J* 44: 857-862.

11. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY - UNIGRANRIO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desinfecção e modelagem de canais radiculares utilizando-se diferentes protocolos de instrumentação e irrigação

Pesquisador: ISBELIA DESIREE GAZZANEO RAUSEO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 33925820.2.0000.5283

Instituição Proponente: "Universidade do Grande Rio ""Professor José de Souza Herdy"" -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.307.517

Apresentação do Projeto:

O presente projeto se propõe a investigar um dos grandes obstáculos durante o tratamento endodôntico, que são as complexidades e variações anatômicas do sistema de canais radiculares (istmos, canais laterais, deltas apicais, ramificações, canais em forma de “C”, achatados, ovais e curvos), já que os mesmos favorecem a permanência de tecido pulpar necrosado, detritos e biofilme, comprometendo assim o resultado do tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho tem como objetivo avaliar, comparar e correlacionar a modelagem e a redução microbiana em canais radiculares em forma de “C” de segundos molares inferiores, promovida pelo preparo químico-mecânico/agitação suplementar do sistema XP-endo Shaper/XP-endo Finisher em comparação com uma técnica de preparo convencional (BioRace/Hedström) e utilizando o NaOCl a 2,5% como solução irrigadora.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos. Apenas benefícios.

Tendo em vista o papel fundamental dos microrganismos nas infecções persistentes associadas ao fracasso da terapia endodôntica, o conhecimento sobre a desinfecção do sistema de canais com variações anatômicas pode ser de grande importância clínica, determinando se após do preparo químico-mecânico há necessidade ou não da agitação suplementar de irrigação.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa apresenta grande relevância para a prática clínica em Endodontia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados conforme solicitado.

Recomendações:

Sugiro aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica. Pendências solucionadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado, após aprovação do parecer conforme emitido pela relatora, sugeri a pesquisadora que informe, com riqueza de detalhes, os riscos envolvidos no projeto, assim como as medidas de minimização ou neutralização desses riscos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1569311.pdf	03/09/2020 22:53:23		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	03/09/2020 22:48:51	ISBELIA DESIREE GAZZANEO RAUSEO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Banco_de_dentes_UNIG.pdf	25/08/2020 23:54:33	ISBELIA DESIREE GAZZANEO RAUSEO	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	16/07/2020 23:16:45	ISBELIA DESIREE GAZZANEO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_confidencialidade.pdf	14/06/2020 23:37:19	ISBELIA DESIREE GAZZANEO RAUSEO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia.pdf	14/06/2020 23:27:01	ISBELIA DESIREE GAZZANEO RAUSEO	Aceito
Orçamento	Orcamento_de_projeto_de_pesquisa.pdf	14/06/2020 23:24:52	ISBELIA DESIREE GAZZANEO	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	14/06/2020 23:18:37	ISBELIA DESIREE GAZZANEO	Aceito

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY - UNIGRANRIO

Continuação do Parecer: 4.307.517

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

DUQUE DE CAXIAS, 29 de Setembro de 2020

Assinado por:
SERGIAN VIANNA CARDOZO
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

Anexo 2. Contagem dos níveis de bactérias em S1, S2 e S3 para o Grupo BioRaCe/Hedström.

BR-Hed N	Baseline S1	BioRaCe S2	Hedström S3
1	2.43E+04	3.57E+02	1.82E+02
2	1.77E+03	0	0
3	1.34E+02	0	0
4	6.37E+03	6.68E+02	1.03E+02
5	2.99E+03	0	2.85E+02
6	3.89E+04	0	0
7	1.54E+04	1.13E+02	0
8	5.41E+04	2.39E+03	0
9	1.95E+03	0	1.04E+03
10	2.82E+03	7.05E+02	0
11	1.79E+03	0	0
12	4.19E+03	0	0
13	9.27E+03	1.36E+02	1.47E+02
14	3.82E+03	0	0
15	3.12E+03	1.01E+02	1.04E+02
16	2.51E+03	1.23E+02	1.10E+02
17	4.70E+04	3.09E+03	0
18	6.96E+03	0	1.38E+02
20	7.15E+02	0	6.27E+02
21	1.10E+04	0	0
22	6.79E+03	7.34E+02	8.49E+01
23	6.30E+03	0	0
Means	1.15E+04	3.83E+02	1.28E+02
Median	5.24E+03	0	0
Min	1.34E+02	0	0
Max	5.41E+04	3.09E+03	1.04E+03
Positive	22	10	10
Positive %	100.0	45.5	45.5

Anexo 3. Contagem dos níveis de bactérias em S1, S2 e S3 para o Grupo XP-endo Shaper/Finisher.

XP-E N	Baseline S1	XP-e Shaper S2	XP-e Finisher S3
1	1.11E+02	0	0
2	5.54E+03	3.84E+02	7.26E+02
3	1.25E+04	0	0
4	8.11E+04	1.10E+03	4.85E+02
5	4.06E+04	1.86E+03	6.19E+02
6	5.28E+04	3.96E+02	2.75E+02
7	4.32E+04	2.24E+03	4.54E+03
9	4.36E+04	3.26E+02	3.04E+02
10	1.05E+04	0	1.11E+02
11	3.05E+04	2.03E+02	2.73E+02
12	4.63E+03	1.78E+02	1.87E+02
13	1.01E+05	2.23E+03	0
14	3.81E+04	1.39E+02	1.08E+03
15	2.62E+05	5.69E+02	1.06E+02
16	4.67E+05	4.25E+02	0
17	9.85E+02	0	0
18	5.03E+02	0	0
19	5.93E+02	3.28E+02	0
20	4.75E+04	1.79E+02	0
23	1.02E+03	0	0
24	3.88E+02	0	0
Means	5.93E+04	5.03E+02	4.15E+02
Median	3.05E+04	2.03E+02	1.06E+02
Min	1.11E+02	0	0
Max	4.67E+05	2.24E+03	4.54E+03
Positive	21	14	11
Positive %	100.0	66.7	52.4

Anexo 4. Submissão do manuscrito

Journal of Endodontics

--Disinfecting and shaping C-shaped root canals: a correlative micro-computed tomographic and molecular microbiology study

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Basic Research - Technology
Keywords:	Bacterial reduction; C-shaped root canal; endodontic treatment; micro-computed tomography; XP-Endo Shaper; XP-Endo Finisher
Corresponding Author:	Flávio F. R. Alves, Ph.D. Estácio de Sá University Petropolis, BRAZIL
First Author:	Isbelia Gazzaneo, MSc
Order of Authors:	Isbelia Gazzaneo, MSc
	Pablo Amoroso-Silva, PhD
	Juan Pacheco-Yanes, MSc
	Flávio F. R. Alves, Ph.D.
	Marilia Marceliano-Alves, PhD
	Patricia Olivares, MSc
	Aida Meto, MSc
	Ibrahimu Mdala, PhD
	José F. Siqueira, PhD
	Isabela N. Rôças, PhD
Manuscript Region of Origin:	Latin & South America
Abstract:	Introduction This ex vivo study compared the disinfection and shaping abilities of two preparation protocols in C-shaped canals. Methods Mandibular second molars with type I C-shaped canals were pair-matched based on micro-computed tomographic (micro-CT) analysis, and distributed into 2 groups. The canals were contaminated with a mixed bacterial culture and prepared by two protocols, both with 2.5% NaOCl irrigation: XP-E (XP-Endo Shaper supplemented with XP-Endo Finisher) and BR-Hed (BioRaCe supplemented with Hedström file). Micro-CT scans and intracanal bacteriologic samples were taken before (scan #1 and S1) and after preparation (scan #2 and S2), and after the supplementary step (scan #3 and S3). Canal shaping was evaluated by micro-CT and disinfection was assessed by quantitative polymerase chain reaction. Results Micro-CT data from XP-E (n=21) and BR-Hed (n=23) revealed no significant differences between groups regarding canal volume, surface area, structure model index (SMI), and prepared walls after preparation and after the supplementary step (P >.05). All these parameters significantly increased after each preparation step (P <.05), except for SMI changes after XP-Endo Finisher (P >.05). Bacteriologic data from XP-E (n=21) and BR-Hed (n=22) groups showed that 14 (66.7%) and 10 (45.5%) S2 samples still had detectable bacteria, respectively. Corresponding figures for supplementary steps with XP-Endo Finisher and Hedström file were 11 (52.4%) and 10 (45.5%), respectively. Bacterial counts in S1 significantly decreased in S2 and S3 in both groups. Intragroup comparison between S2 and S3 showed a 66% reduction in counts after using Hedström file and 18% after using XP-Endo Finisher (P >.05 for both groups). Quantitative bacterial reduction was not different between groups (P >.05). Conclusions XP-Endo Shaper and BioRaCe systems have similar disinfecting and shaping abilities in C-shaped canals. Supplementary steps with Hedström file and XP-Endo Finisher were similarly effective in improving shaping, but this was not sufficient to enhance disinfection.

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Anexo 5. Artigos publicados

Artigo 1.

Costa, F., Pacheco-Yanes, J., Siqueira, J. F., Jr, Oliveira, A., Gazzaneo, I., Amorim, C. A., Santos, P., & Alves, F. (2019). Association between missed canals and apical periodontitis. *International endodontic journal*, 52(4), 400–406. https://doi.org/10.1111/iej.13022

Artigo 2.

Oliveira, A., Candeiro, G., Pacheco da Costa, F., Gazzaneo, I. D., Alves, F., & Marques, F. V. (2019). Distance and Bone Density between the Root Apex and the Mandibular Canal: A Cone-beam Study of 9202 Roots from a Brazilian Population. *Journal of endodontics*, 45(5), 538–542.e2. https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.01.004

Artigo 3.

Pacheco-Yanes, J., Gazzaneo, I., Pérez, A. R., Armada, L., & Neves, M. (2019). Transportation assessment in artificial curved canals after instrumentation with Reciproc, Reciproc Blue, and XP-endo Shaper Systems. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 10(3), e12417. https://doi.org/10.1111/jicd.12417

Artigo 4.

Pacheco-Yanes, J., Provenzano, J. C., Marceliano-Alves, M. F., Gazzaneo, I., Pérez, A. R., Gonçalves, L. S., & Siqueira, J. F., Jr (2020). Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study. *Clinical oral investigations*, 24(2), 907–914. https://doi.org/10.1007/s00784-019-02970-5

Artigo 1.

Costa, F., Pacheco-Yanes, J., Siqueira, J. F., Jr, Oliveira, A., Gazzaneo, I., Amorim, C. A., Santos, P., & Alves, F. (2019). Association between missed canals and apical periodontitis. *International endodontic journal*, 52(4), 400–406. https://doi.org/10.1111/iej.13022

INTERNATIONAL ENDODONTIC JOURNAL

doi:10.1111/iej.13022

Association between missed canals and apical periodontitis

F. F. N. P. Costa[1], J. Pacheco-Yanes[1], J. F. Siqueira Jr[1], A. C. S. Oliveira[1], I. Gazzaneo[1], C. A. Amorim[1], P. H. B. Santos[2] & F. R. F. Alves[1]

[1]Faculty of Dentistry, Department of Endodontics, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, Brazil; and [2]Private Oral Radiology Clinic, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Costa FFNP, Pacheco-Yanes J, Siqueira Jr JF, Oliveira ACS, Gazzaneo I, Amorim CA, Santos PHB, Alves FRF. Association between missed canals and apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, **52**, 400–406, 2019.

Aim To evaluate the frequency of post-treatment apical periodontitis associated with root filled teeth with at least one untreated root canal.

Methodology Eight hundred and seven cone beam computed tomography images containing at least one root filled tooth were selected from a collection of 1543 images from Brazilian individuals. Scans were taken using ICAT Classic devices (Imaging Sciences, Hatfield, PA, USA) in a private oral radiology clinic from January to April 2015. All root filled teeth were analysed for the presence of missed canals and apical periodontitis. The chi-square and odds ratio tests were used to verify if there were an association and risk relationship between the occurrence of untreated canals and apical periodontitis.

Results A total of 2294 teeth with evidence of root fillings were identified. Two hundred and eighty-one teeth had at least one untreated missed canal (12%). The frequency of apical periodontitis in teeth with at least one untreated canal was significantly greater in comparison to teeth with all canals treated (274/281, 98% versus 1736/2013, 86%) ($P < 0.01$). The odds for apical periodontitis to be present was 6.25 times greater for teeth with an untreated canal. The mesiobuccal roots of maxillary first molars had the greatest frequency of untreated canals (114/154, 74%), with the second mesiobuccal canal being the most frequently missed ($n = 106/114$, 93%).

Conclusion Root filled teeth with at least one missed canal had a high prevalence of post-treatment apical periodontitis.

Keywords: apical periodontitis, cone beam computed tomography, missed root canal.

Received 3 April 2018; accepted 30 September 2018

Introduction

Apical periodontitis is a disease induced and maintained by bacterial infection of the root canal system (Ricucci & Siqueira 2010). Therefore, the successful outcome of root canal treatment in teeth with noninfected vital pulps depends on preventing root canal infection, while in teeth with infected necrotic pulps it relies on eradication or at least reduction in bacterial counts to levels compatible with periradicular tissue healing (Ricucci *et al.* 2009a). Post-treatment apical periodontitis is the form of disease associated with root filled teeth and is usually associated with a persistent or secondary root canal infection (Ricucci *et al.* 2009b, 2013, Arnold *et al.* 2013).

Numerous studies have investigated the prevalence of apical periodontitis in root filled teeth and its potential risk factors. One of the most important risk factors for post-treatment disease is the substandard quality of the treatment (Tronstad *et al.* 2000,

Correspondence: Flávio Alves, Faculty of Dentistry, Estácio de Sá University, Av. Alfredo Baltazar da Silveira, 580/cobertura, Recreio, Rio de Janeiro, RJ, 22790-710, Brazil (e-mail: flavioferreiraalves@gmail.com).

© 2018 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd

Hommez *et al.* 2002, Siqueira *et al.* 2005, Georgopoulou *et al.* 2008, Tavares *et al.* 2009, Moreno *et al.* 2013). However, some potentially relevant risk factors, such as missed canals, were evaluated in most previous studies. If infected, canals that were missed and as such remained untreated may harbour bacteria in sufficient numbers to maintain or cause disease. If initially noninfected, untreated missed canals may function as a potentially vulnerable site for reinfection.

The vast majority of previous studies evaluating the prevalence of post-treatment apical periodontitis and its risk factors were based on radiographic examinations (Tronstad *et al.* 2000, Hommez *et al.* 2002, Siqueira *et al.* 2005, Georgopoulou *et al.* 2008, Tavares *et al.* 2009, Moreno *et al.* 2013). Because they provide only two-dimensional information, radiographs may not reveal missed canals in all cases. Such a deficiency may be overcome using cone beam computed tomography (CBCT), which provides three-dimensional information and a higher sensitivity to evaluate hard tissue changes (Huumonen *et al.* 2006, Estrela *et al.* 2008, Liang *et al.* 2012, Chen *et al.* 2015). The incidence of missed canals in a North American study using CBCT was 23% and the risk of a tooth with a missed canal being associated with apical periodontitis was 4.4 times higher (Karabucak *et al.* 2016). There are apparently no studies evaluating the frequency of missed canals and the risk of post-treatment apical periodontitis in other populations.

The present study investigated the frequency of post-treatment apical periodontitis in teeth with at least one missed canal and verify the impact of this as a risk factor for post-treatment disease in a Brazilian population. The null hypothesis was that there is no difference in the frequency of apical periodontitis between teeth with untreated canals in comparison with teeth with all canals treated.

Materials and methods

The study protocol was approved by Ethics Committee at Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Eight hundred and seven CBCT scans (400 maxillary and 407 mandibular) from 764 individuals (279 males and 485 females; mean age, 58 years ranging from 19 to 95 years) were evaluated. The scans were selected from a set of 1543 CBCT exams from Brazilian individuals. Only scans containing at least one root filled tooth were included. The selection was performed using the software Dental Slice, version 2.8 (Bioparts Prototipagem Biomédica, Brasília, DF, Brazil). All tooth types were included. Exclusion criteria were: teeth with no evidence of previous root canal treatment as determined by the presence of intracanal radiopaque filling material, poor image quality, presence of CBCT artefacts and presence of dental implants. Root filled teeth were also excluded if they were associated with metal restorations and/or metal pins, marginal bone loss (>4 mm), previous endodontic surgery, C-shaped canals, root fracture, perforation or external root resorption altering the root anatomy significantly.

CBCT scans were obtained from a private oral radiology clinic in Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and were taken from January to April 2015 using four ICAT Classic devices (Imaging Sciences, Hatfield, PA, USA). Images were acquired with a field of view (FOV) limited to 6 cm, voxel size of 0.2 mm and 120 kV. XORAN (XoranConnect, Ann Arbor, MI, USA) was used as the export software for the DICOM files. Exams were requested for reasons not related to this study.

All teeth with evidence of previous root canal treatment on the CBCT scans were analysed independently by two specialists in endodontics for the occurrence of at least one untreated canal and apical periodontitis using Dental Slice software (Bioparts Prototipagem Biomédica). Contrast and brightness of the images were modified to ensure the best viewing condition and the evaluations were performed on two LCD monitors with a resolution of 1366 × 768 pixels (Apple, Cupertino, California, CA, USA), in a dark environment. The examiners were previously calibrated with a set of 100 scans (interobserver Cohen's Kappa = 0.83 and 1.00 for untreated canal and apical periodontitis, respectively). Untreated canals were considered as those without any evidence of filling material from the coronal orifice of the canal to the apex. Presence of apical periodontitis was considered when the continuity of the lamina dura was disrupted and associated with a radiolucent area around the root apex that was at least twice as thick as the normal periodontal ligament space (Karabucak *et al.* 2016).

Presence of untreated canals and apical periodontitis was evaluated first on axial section images and subsequently confirmed on transversal and panoramic section images. Axial, transverse and panoramic indicator lines were used to obtain a more centralized image in relation to the canal and the apical periodontitis lesion when present.

© 2018 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd

Data were tabulated and the frequency of untreated canals associated or not with apical periodontitis was calculated. In cases of disagreement between the two evaluators, the images were re-analysed and subjected to joint discussion for decision-making.

Statistical analysis

The Cohen's Kappa coefficient was used to compare the overall observer agreement for the presence of missed canals and apical periodontitis. The chi-square test was used to verify if there was an association between the occurrence of untreated canals and apical periodontitis. Odds ratio calculation was performed to evaluate the odds that apical periodontitis occurs in teeth with untreated canal compared to teeth with all canals treated.

Results

In this study, 2294 root filled teeth identified in the 307 CBCT exams met the inclusion criteria. Apical periodontitis was observed in 2010 of these teeth (88%). The greatest prevalence of apical periodontitis was in maxillary molars (333/350, 95%) and the lowest in mandibular canines (43/61, 70%) (Table 1).

Overall, 281 treated teeth had at least one untreated canal (12%). The frequency of untreated canals was higher in maxillary molars (160/281, 57%), followed by mandibular molars (72/281, 26%), maxillary premolars (28/281, 10%) and mandibular premolars (16/281, 6%). Incisors and canines had a low frequency of untreated canals, with less than three occurrences per tooth type (Table 1).

Apical periodontitis was observed in 98% (274/281) of the teeth with untreated canal/s, which was

Table 1 Apical periodontitis and untreated canals per tooth

Tooth[a]	N	With lesion	Without lesion	Untreated canal	Untreated canal with lesion	Untreated canal without lesion
1	7	6	1	2	2	0
2	61	57	4	14	14	0
3	97	91	6	50	48	2
4	114	101	13	7	7	0
5	106	101	5	10	10	0
6	89	82	7	1	1	0
7	99	87	12	0	0	0
8	101	90	11	0	0	0
9	108	100	8	0	0	0
10	75	65	10	0	0	0
11	90	78	12	1	1	0
12	106	103	3	8	8	0
13	118	107	11	3	3	0
14	125	121	4	71	71	0
15	54	52	2	21	21	0
16	6	6	0	2	2	0
17	9	8	1	1	1	0
18	98	84	14	14	12	2
19	102	93	9	18	18	0
20	105	81	24	2	2	0
21	79	54	25	5	5	0
22	34	23	11	0	0	0
23	14	11	3	1	1	0
24	15	8	7	0	0	0
25	21	14	7	0	0	0
26	12	11	1	1	0	1
27	27	20	7	1	1	0
28	80	61	19	7	7	0
29	118	93	25	2	2	0
30	125	117	8	24	23	1
31	89	79	10	12	12	0
32	10	6	4	3	2	1
Total	2294	2010	284	281	274	7

[a]Tooth numbering according to the Universal Numbering System.

© 2018 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd

a significantly greater frequency in comparison with teeth with all canals treated (1736/2013, 86%) ($P < 0.01$). Teeth with at least one untreated canal were 6.25 times more likely to be associated with apical periodontitis (confidence interval ranging from 2.92–13.37). Interobserver agreement calculated after the analysis was very good (Cohen's Kappa = 0.92 and 1.00 for untreated canal and apical periodontitis, respectively).

The mesiobuccal roots of the first maxillary molars had the greatest frequency of untreated canals (114/154, 74%) and the second mesiobuccal (MB2 or mesiopalatal) canal was the one most frequently missed ($n = 106/114$, 93%). In multirooted teeth, all lesions were associated with the root containing the untreated canal.

Discussion

The present cross-sectional study evaluated the frequency of post-treatment apical periodontitis in teeth with more than one canal where at least one of them was untreated. Data from 2294 root filled teeth from Brazilian individuals were analysed. This is a larger sample size when compared to a previous cross-sectional study (n = 1137)(Karabucak *et al.* 2016).

Data from this study using a Brazilian population and a previous one in a North American population (Karabucak *et al.* 2016) are compared in Table 2. In the previous study, 23% of molars/premolars had at least one untreated canal, while in the present one the corresponding figure was 17% for the same tooth types. Karabucak *et al.* (2016) reported that maxillary molars were the teeth with the greatest frequency of untreated canals (40%), and the MB2 canal was the most frequently missed canal in those teeth (65%). The same occurred in the present study, but with different frequency values: 57% of the teeth with an untreated canal were maxillary molars, and the MB2 canal was missed in 80% of cases (128 MB2 in 160 maxillary molars). Another CBCT study that evaluated only root filled maxillary molars reported that 30/39 (77%) of the mesiobuccal roots had two canals; an untreated canal was verified in 27/30 (90%) and apical periodontitis occurred in 22/27 (81%) (Huumonen *et al.* 2006). These findings reinforce the need for clinicians to appreciate that maxillary molars normally have four canals and efforts should be made towards locating the MB2 canal during treatment/retreatment. In this regard, use of the operating microscope has been reported to considerably increase detection of the MB2 canal (Baldassari-Cruz *et al.* 2002, Buhrley *et al.* 2002, Khalighinejad *et al.* 2017). In one of these studies (Buhrley *et al.* 2002), the MB2 was located in 57% of the cases when the clinician used a microscope, but only in 18% cases when no magnification was used.

Karabucak *et al.* (2016) reported that the distolingual canal in mandibular first molars was associated with 62% of the untreated canals, while in the present study this second distal canal was missed in only 21% of the cases. The findings of the present study revealed that the mesiolingual canal was the most frequently untreated canal in first (29%) and second mandibular molars (62%). The frequency of untreated canals in molars (especially the mesiobuccal and

Table 2 Data on untreated canals per tooth comparing the results from a previous study with the present one

Finding	Karabucak *et al.* (2016)[a]	Present study
Total CBCT exams	494	807
Teeth included in the study	Molars and premolars	All
Root canal-treated teeth	1137	2.294
Root canal-treated teeth with apical periodontitis	676 (60%)	2010 (88%)
Teeth with untreated canal	262 (23%)	281 (12%)
Molars/premolars with untreated canal	262 (23%)	276 (17%)
Teeth with untreated canal and apical periodontitis	217 (83%)	274 (98%)
Molars/premolars with untreated canal and apical periodontitis	217 (83%)	270 (98%)
Tooth type with the highest frequency of untreated canal	Maxillary molars 148/369 (40%)	Maxillary molars 160/281 (57%)
Tooth type with lowest frequency of untreated canals	Maxillary premolars 25/262 (9.5%)	Maxillary incisors 0/281 (0%)
Most frequently missed canal	MB2	MB2
Probability of a tooth with an untreated canal to be associated with apical periodontitis (Odds Ratio)	4.38	6.25

[a]Incisors and canines were not evaluated in the study by Karabucak *et al.* (2016).

© 2018 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd

distolingual canals) reinforces the difficulties during the root canal treatment of these teeth posed by their complex anatomy, difficult access and visualization of their pulp chambers, requiring more skilled and experienced operators to deal with these conditions. It is important to note that, unlike the present study, Karabucak *et al.* (2016) analysed only CBCT scans sent to the Endodontic Department of the institution where the study was performed, which, according to the authors, may have resulted in a greater prevalence of apical periodontitis lesions in root filled teeth (60%) than expected for other populations. In contrast, the present study analysed CBCTs selected randomly from consecutive exams taken at a radiology clinic for several indications and not exclusively requested by endodontists. Even so, the overall prevalence of apical periodontitis in treated teeth was higher (88%).

This study revealed a very high prevalence of apical periodontitis in treated teeth with at least one missed canal (98%). The odds for apical periodontitis was 6.25 times greater for teeth with an untreated canal. This figure is higher than observed in the study by Karabucak *et al.* (2016) (83%, odds = 4.4 times). Reasons for this difference are unknown, but most importantly both studies suggest a substantial negative impact of untreated canals in the outcome of root canal treatment. These results corroborate those from another study that evaluated the clinical causes of failure of root canal treatment through examination of the apex and the resected root surface with an operating microscope during periradicular surgery (Song *et al.* 2011). The occurrence of an untreated canal was the second major cause of failure for all types of teeth and the primary one in molars (Song *et al.* 2011). Missed canals can harbour a primary bacterial infection or may serve as a site for secondary infection of the canal system. Once infected and depending on the bacterial load and virulence and their access to the periradicular tissues, infection in the missed canal can cause or maintain apical periodontitis.

In the present study, missed canals were identified using CBCT scans, which provide three-dimensional images and allow the analysis of multiple slices per tooth (Matherne *et al.* 2008). CBCT is less susceptible to errors in identifying root canals than conventional and digital periapical radiographs (Hoen & Pink 2002, Domark *et al.* 2013). Besides, CBCT has been shown to be more accurate than conventional radiographs in detecting apical periodontitis, especially those involving incipient to small bone tissue destruction (Velvart *et al.* 2001, Estrela *et al.* 2008, de Paula-Silva *et al.* 2009, Patel *et al.* 2012b). Therefore, the possibility exists that had the present analysis only included periapical radiographs, the prevalence of both missed canals and apical periodontitis would have been lower than the one reported herein. As for the accuracy of the CBCT devices used (iCAT 120 kVp, with 0.2 mm voxel resolution), a previous study (Pinsky *et al.* 2006) reported good results in the detection of the simulated osseous defects of varying diameters and depths on the buccal cortex of a human mandible.

Cone beam computed tomography is not recommended for routine diagnostic use during root canal treatment/retreatment because the radiation dose for a CBCT exam is greater than that for an intraoral radiograph. Consequently, clinicians should focus on other approaches that may help identify and locate canals, including preparation of an access cavity with adequate visibility, inspection of the pulp chamber floor under magnification with proper illumination and using ultrasonic instruments to dislodge calcifications and debris over canal orifices (Yoshioka *et al.* 2005).

The results of the present study reinforce the use of CBCT as an auxiliary method for detecting missed canals and guiding the decision-making process for best management. This exam is especially useful for teeth with complex anatomy, such as molars, in which CBCT revealed the greater percentage of untreated canals in the present study (57% in maxillary and 26% in mandibular molars). Other studies have reported the superiority of CBCT over conventional periapical radiographs in revealing a greater failure rate in molar teeth (Patel *et al.* 2012a, Al-Nuaimi *et al.* 2018). Detection of untreated canals has the potential to positively influence the outcome of retreatment or periradicular surgery of these teeth (Patel *et al.* 2012a). Additionally, studies analysing the frequency of untreated canals in cases where an operating microscope was used, as well as correlative evaluations of CBCT with histological or microbiological findings should be encouraged.

The main limitation of this study relates to its cross-sectional nature. Because CBCT scans were evaluated at a given point in time, no information was available about the time elapsed since the initial root canal treatment. Thus, it is important to acknowledge that some lesions may have been healing (Kruse *et al.* 2017). Moreover, information regarding the root canal treatment itself was unavailable, including

 © 2018 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd

techniques, instruments, chemicals, materials, isolation, accidents. The qualification and experience of the clinicians who performed the treatments were unknown and may also be an important factor influencing the outcome (Burry *et al.* 2016). Radiographic examination is usually insufficient for a definitive diagnosis and cannot determine the microbiological conditions of the canals. The cross-sectional nature of this study can only infer an association between two phenomena (periapical lesion and missed canals) rather than a cause-and-effect relationship. Treatment of the missed canals accompanied by complete periradicular healing would be required to establish a real causal relationship.

On the other hand, the advantage of cross-sectional studies is related to the large sample size that is generally easier and less expensive to arrange. Possible errors of interpretation and diagnosis are equally distributed in cross-sectional studies using large sample sizes, making their results valid (Altman 1991). Additionally, some authors consider that cross-sectional studies are less susceptible to bias when compared to longitudinal studies (Torabinejad *et al.* 1988).

Conclusion

The frequency of post-treatment apical periodontitis in teeth with at least one untreated canal was 98%. Clinicians should be aware of the risks of missing canals during root canal treatment and use proper diagnostic methods to anticipate the presence and locate difficult-to-find or extra root canals.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazilian Governmental Institutions.

Conflict of Interest

The authors have stated explicitly that there are no conflict of interests in connection with this article.

References

Al-Nuaimi N, Patel S, Davies A, Bakhsh A, Foschi F, Mannocci F (2018) Pooled analysis of 1-year recall data from three root canal treatment outcome studies undertaken using cone beam computed tomography. *International Endodontic Journal* **51**(Suppl 3), e216–26.

Altman DG (1991) *Practical statistics for medical research*. London, UK: Chapman & Hall.

Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr (2013) Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. *Journal of Endodontics* **39**, 1179–84.

Baldassari-Cruz LA, Lilly JP, Rivera EM (2002) The influence of dental operating microscope in locating the mesiolingual canal orifice. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **93**, 190–4.

Buhrley LJ, Barrows MJ, BeGole EA, Wenckus CS (2002) Effect of magnification on locating the MB2 canal in maxillary molars. *Journal of Endodontics* **28**, 324–7.

Burry JC, Stover S, Eichmiller F, Bhagavatula P (2016) Outcomes of primary endodontic therapy provided by endodontic specialists compared with other providers. *Journal of Endodontics* **42**, 702–5.

Chen I, Karabucak B, Wang C *et al.* (2015) Healing after root-end microsurgery by using mineral trioxide aggregate and a new calcium silicate-based bioceramic material as root-end filling materials in dogs. *Journal of Endodontics* **41**, 389–99.

Domark JD, Hatton JF, Benison RP, Hildebolt CF (2013) An ex vivo comparison of digital radiography and cone-beam and micro computed tomography in the detection of the number of canals in the mesiobuccal roots of maxillary molars. *Journal of Endodontics* **39**, 901–5.

Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR (2008) Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *Journal of Endodontics* **34**, 273–9.

Georgopoulou MK, Spanaki-Voreadi AP, Pantazis N, Kontakiotis EG, Morfis AS (2008) Periapical status and quality of root canal fillings and coronal restorations in a Greek population. *Quintessence International* **39**, e85–92.

Hoen MM, Pink FE (2002) Contemporary endodontic retreatments: an analysis based on clinical treatment findings. *Journal of Endodontics* **28**, 834–6.

Hommez GM, Coppens CR, De Moor RJ (2002) Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings. *International Endodontic Journal* **35**, 680–9.

Huumonen S, Kvist T, Grondahl K, Molander A (2006) Diagnostic value of computed tomography in re-treatment of root fillings in maxillary molars. *International Endodontic Journal* **39**, 827–33.

Karabucak B, Bunes A, Chehoud C, Kohli MR, Setzer F (2016) Prevalence of apical periodontitis in endodontically treated premolars and molars with untreated canal: a cone-beam computed tomography study. *Journal of Endodontics* **42**, 538–41.

Khalighinejad N, Aminoshariae A, Kulild JC, Williams KA, Wang J, Mickel A (2017) The effect of the dental operating microscope on the outcome of nonsurgical root canal

© 2018 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd

treatment: a retrospective case-control study. *Journal of Endodontics* **43**, 728–32.

Kruse C, Spin-Neto R, Reibel J, Wenzel A, Kirkevang LL (2017) Diagnostic validity of periapical radiography and CBCT for assessing periapical lesions that persist after endodontic surgery. *Dento-Maxillo-Facial Radiology* **46**, 20170210.

Liang YH, Yuan M, Li G, Shemesh H, Wesselink PR, Wu MK (2012) The ability of cone-beam computed tomography to detect simulated buccal and lingual recesses in root canals. *International Endodontic Journal* **45**, 724–9.

Matherne RP, Angelopoulos C, Kulild JC, Tira D (2008) Use of cone-beam computed tomography to identify root canal systems in vitro. *Journal of Endodontics* **34**, 87–9.

Moreno JO, Alves FR, Gonçalves LS, Martinez AM, Rôças IN, Siqueira JF Jr (2013) Periradicular status and quality of root canal fillings and coronal restorations in an urban Colombian population. *Journal of Endodontics* **39**, 600–4.

Patel S, Wilson R, Dawood A, Foschi F, Mannocci F (2012a) The detection of periapical pathosis using digital periapical radiography and cone beam computed tomography - part 2: a 1-year post-treatment follow-up. *International Endodontic Journal* **45**, 711–23.

Patel S, Wilson R, Dawood A, Mannocci F (2012b) The detection of periapical pathosis using periapical radiography and cone beam computed tomography - part 1: pre-operative status. *International Endodontic Journal* **45**, 702–10.

de Paula-Silva FW, Wu MK, Leonardo MR, da Silva LA, Wesselink PR (2009) Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography scans in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *Journal of Endodontics* **35**, 1009–12.

Pinsky HM, Dyda S, Pinsky RW, Misch KA, Sarment DP (2006) Accuracy of three-dimensional measurements using cone-beam CT. *Dento-Maxillo-Facial Radiology* **35**, 410–6.

Ricucci D, Siqueira JF Jr (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics* **36**, 1277–88.

Ricucci D, Lin LM, Spangberg LS (2009a) Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **108**, 609–21.

Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR (2009b) Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *Journal of Endodontics* **35**, 493–502.

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr (2013) Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *Journal of Endodontics* **39**, 712–8.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Campos LC (2005) Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **100**, 369–74.

Song M, Kim HC, Lee W, Kim E (2011) Analysis of the cause of failure in nonsurgical endodontic treatment by microscopic inspection during endodontic microsurgery. *Journal of Endodontics* **37**, 1516–9.

Tavares PB, Bonte E, Boukpessi T, Siqueira JF Jr, Lasfargues JJ (2009) Prevalence of apical periodontitis in root canal-treated teeth from an urban French population: influence of the quality of root canal fillings and coronal restorations. *Journal of Endodontics* **35**, 810–3.

Torabinejad M, Kettering JD, McGraw JC, Cummings RR, Dwyer TG, Tobias TS (1988) Factors associated with endodontic interappointment emergencies of teeth with necrotic pulps. *Journal of Endodontics* **14**, 261–6.

Tronstad L, Asbjornsen K, Doving L, Pedersen I, Eriksen HM (2000) Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth. *Endodontics and Dental Traumatology* **16**, 218–21.

Velvart P, Hecker H, Tillinger G (2001) Detection of the apical lesion and the mandibular canal in conventional radiography and computed tomography. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **92**, 682–8.

Yoshioka T, Kikuchi I, Fukumoto Y, Kobayashi C, Suda H (2005) Detection of the second mesiobuccal canal in mesiobuccal roots of maxillary molar teeth ex vivo. *International Endodontic Journal* **38**, 124–8.

© 2018 International Endodontic Journal. Published by John Wiley & Sons Ltd

Artigo 2.

Oliveira, A., Candeiro, G., Pacheco da Costa, F., Gazzaneo, I. D., Alves, F., & Marques, F. V. (2019). Distance and Bone Density between the Root Apex and the Mandibular Canal: A Cone-beam Study of 9202 Roots from a Brazilian Population. *Journal of endodontics*, 45(5), 538–542.e2. https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.01.004

Clinical Research

Distance and Bone Density between the Root Apex and the Mandibular Canal: A Cone-beam Study of 9202 Roots from a Brazilian Population

Check for updates

Ana C.S. Oliveira, DDS, MSc, George T.M. Candeiro, DDS, MSc, PhD,† Fernanda F.N. Pacheco da Costa, DDS, MSc,* Isbelia D. Gazzaneo, DDS, MSc,* Flávio R.F. Alves, DDS, MSc, PhD,* and Fábio V. Marques, DDS, MSc, PhD**

Abstract

Introduction: Accidental damage to the inferior alveolar nerve is of concern during endodontic treatment of the posterior mandible teeth, and a careful evaluation of the relationship between the apices and the mandibular canal (MC) is mandatory to prevent iatrogenic complications. This study aimed to assess the distance between the root apices of posterior teeth and the MC and the bone density in such areas. **Methods:** One thousand retrospective cone-beam computed tomographic scans were randomly selected from a private oral radiologic clinic database. The images were acquired with a limited field of view and analyzed by 2 evaluators who measured the shortest distance between the root apices and the upper cortical bone of the MC using Dental Slice software (Bioparts Biomedical Prototyping, Brasilia, DF, Brazil). In addition, bone density was estimated using the tool "profile line of Hounsfield" and expressed in Hounsfield units. **Results:** The distal root of the right second molars was the closest to the MC (mean = 3.41 mm), and the right first premolar root was the farthest from the MC (mean = 5.87 mm), respectively. The root apices were closer to the MC in women than in men ($P < .05$). In 1.79% of the cases, the roots were in contact or invading the MC, whereas 8.35% of the root apices were close to the MC (<1.00 mm), and 89.85% were distant from the MC (>1.00 mm). In 85.55% of the cases, the bone was dense. **Conclusions:** The results suggest that the risk of damage to the inferior alveolar nerve is higher for second molars, especially in female patients. The higher density of the adjacent bone may act as a protective factor against nerve damage arising from endodontic procedures. *(J Endod 2019;45:538–542)*

Key Words

Bone density, cone-beam computed tomography, iatrogenic nerve damage, mandibular nerve

Significance

The distal root of right second molars was the closest to the MC (mean = 3.41 mm), and the right first premolar root was the most distant to the MC (mean = 5.87 mm), respectively. In 85.55% of the cases, the bone located between the root apex and the MC was dense, which may act as a protective factor against damages to the alveolar inferior nerve.

The proximity of the root apex of the inferior molars and premolars to the mandibular canal (MC) is clinically relevant, considering that different dental interventions have the potential to cause injury to the inferior alveolar nerve (IAN). These procedures include extraction of third molars, endodontic treatments, periradicular surgery, and dental implants (1, 2).

There have been numerous reports of injuries to the IAN as a result of nonsurgical or surgical endodontic procedures (3, 4), and the consequences may include paresthesia, hyperesthesia, anesthesia, edema, pain, and lip numbness (5). These changes may either be temporary or even permanent in the most severe cases (6–8).

The risk of injuring the IAN during endodontic treatment depends on several factors such as tooth angulation, apical foramen position, bone density, the proximity of the root apex to the MC, and the apical work limit of the root canal treatment (5, 9). Multiple studies have already assessed the relationship between root apices and the MC with considerable variation between them, and, notably, age, sex, and ethnicity may influence this relationship (1, 2, 9–12). To the best of our knowledge, there have been no previous studies in Brazilian populations. Also, no previous study has examined the bone density of the area between the root apex and the MC.

Although direct evidence seems to be unavailable, indirect evidence suggests that low bone density can create an unobstructed pathway for the diffusion of sealing materials, irrigants, and intracanal medications toward the IAN (5, 8, 13, 14). In contrast, a high-density bone might act as a protective factor against possible damage to the nerve. It is important to emphasize that bone density is related to age, ethnicity, genetics, and the presence of chronic systemic diseases including osteoporosis and Paget disease (10).

From the *Postgraduate Program in Dentistry, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, Brazil; and †Postgraduate Program in Dental Sciences, Christus University, Fortaleza, Brazil.

Address requests for reprints to Dr Flávio R.F. Alves, Faculty of Dentistry, Estácio de Sá University, Av Alfredo Baltazar da Silveira, 580/Cobertura, Recreio, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail address: flavioferreiraalves@gmail.com

0099-2399/$ - see front matter

Copyright © 2019 American Association of Endodontists.

https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.01.004

In this context, the present study aimed to evaluate *in vivo* the proximity of posterior teeth root apices to the MC and the density of the bone located between these structures in a Brazilian subpopulation using cone-beam computed tomographic (CBCT) imaging and a large sample size.

Materials and Methods

Acquisition and Selection of the Scans

After the research project received approval from the institutional research ethics committee, 1000 CBCT scans of Brazilian individuals were randomly retrieved from the database of an oral radiology clinic (Data X, Rio de Janeiro, Brazil). Inclusion criteria were unilateral or bilateral CBCT imaging of the mandible showing at least 1 posterior tooth. All scans were acquired using I-CAT Vision (Imaging Sciences International Inc, Hatfield, PA), and the images were obtained with a 0.2-mm voxel size, 120 kV, and a 6-cm field of view. The Digital Imaging and Communications in Medicine files were imported, and personal data such as the age and sex of the patients were recorded. The scans were requested by practitioners, other than those involved in this study for unrelated indications.

The shortest distance from the apex to the upper cortical bone of the MC was measured for each posterior tooth that was fully erupted and presenting with completely formed roots. Teeth with open apices or extreme root resorptions, images showing artifacts that hampered the measurement of the distance, and teeth in which it was not possible to visualize the adjacent MC were excluded from the study.

Analysis of Linear Measures and Demographic Data

The tomographic images were independently analyzed by 2 endodontists with the assistance of Dental Slice Virtual Browsing 2014, Windows Version (Bioparts Biomedical Prototyping, Brasília, DF, Brazil). The examiners were previously calibrated to use the Dental Slice software in a set of 100 CBCT scans. In this test, the interobserver agreement was substantial ($\kappa = 0.782$) (15). Two HP (Palo Alto, CA) personal computer monitors, both with high-definition widescreen LED display and a resolution of 1366 × 768 pixels, in a dim lighting environment were used for the analyses.

All teeth were analyzed using the parasagittal cuts to visualize the shortest linear distance between the root apex and the upper cortical bone of the MC (Fig. 1*A*). The average measurements obtained by the 2 raters were calculated. Distances smaller than 1.00 mm and ≥1.00 mm were considered very close to the MC and distant, respectively (1). Values equal to 0 mm and negative values were considered as the root apex being in intimate contact with the MC and the root apex invading the space of the MC, respectively. The possible influences of sex and age were then investigated. Concerning age, the results were grouped in accordance to previously established age groups (in years) (2): <25, 26–35, 36–45, 46–55, 56–65, and >65.

Analysis of Bone Mineral Density

The radiodensity of the bone located between the root apex and the MC was measured for all teeth included in the study, except for those in intimate contact or invading the MC and for those in which the distance was so short that measurement was impracticable. This analysis was performed using the tool "profile line of Hounsfield" of the Dental Slice software, which generates a graph and an average expressed in Hounsfield units (Fig. 1). The average values were then analyzed according to Lekhom and Zarb's classification (16), which divides the bone into 4 types according to its quality: D1, in which almost the entire bone is composed of compact bone; D2, which has a thick layer of compact

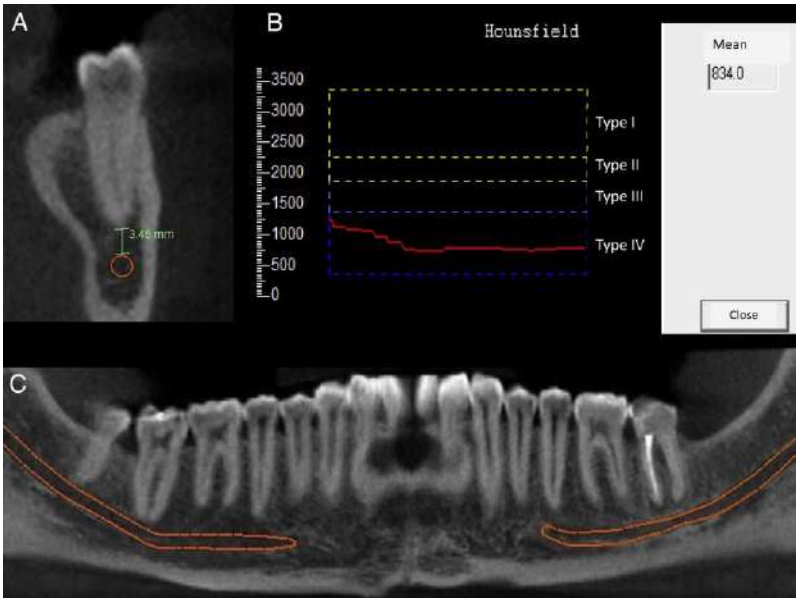


Figure 1. (*A*) An image showing the parasagittal section in which the linear measurement of the closest distance between the root apex of a right mandibular second premolar and the mandibular canal was performed. (*B*) An image showing the use of the profile line of Hounsfield tool on the Dental Slice software. The average of bone density is obtained from the graph and expressed in Hounsfield units. (*C*) A panoramic view.

bone and a core of dense trabecular bone; D3, which has a thin layer of cortical bone that surrounds a core of dense trabecular bone; and D4, which has a thin layer of cortical bone around a core of lower-density trabecular bone.

Statistical Analysis

Data were analyzed using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). The distances between the root apices and the MC and their relationship with sex and age were evaluated using the Student *t* test for independent samples and analysis of variance. The results were considered significant when $P < .05$. Moreover, the absolute and relative frequencies of each type of bone according to its density were calculated.

Results

One thousand CBCT scans were examined, 628 (62.8%) were of female patients and 372 (37.2%) of male patients. The age of the individuals ranged from 18–88 years. A total of 6244 teeth (9202 roots) were analyzed, including 1689 (27.05%) first premolars, 1597 (25.58%) second premolars, 1032 (16.53%) first molars, 1395 (22.34%) second molars, and 531 (8.5%) third molars. Sixty-eight (1.17%) teeth were excluded from the analysis because the MC could not be visualized. The root apices were closer to the MC in female patients than in male patients ($P < .05$).

The distal roots of the right second molars were the closest to the MC (mean distance = 3.41 mm), whereas the right first premolar roots were the farthest (mean distance = 5.87 mm). The second molars were the nearest to the MC in relation to the other lower posterior teeth, regardless of age and sex (Tables 1 and 2).

One hundred sixty-five (1.79%) roots were in close contact or invading the MC, and this anatomic feature was most frequently observed in the distal roots of the second molars of female patients (Supplemental Table S1 is available online at www.jendodon.com). Seven hundred sixty-nine (8.35%) roots were very close to the MC (<1 mm), possibly presenting a higher risk of accidents. Conversely, 8268 (89.77%) roots were much farther from the MC (>1 mm) (Supplemental Table S2 is available online at www.jendodon.com).

Age did not significantly influence the proximity between the root apex and the MC ($P > .05$). However, the absolute values showed that patients from 36–45 years old had more root apices in close contact or invading the MC compared with the other age groups. The measurement of the bone density of the area between the apices and the MC showed that, in most cases, the area presented a dense cortical bone (D1 type, 85.55%) (Supplemental Table S3 is available online at www.jendodon.com).

TABLE 1. The Distances between the Root Apices and the Mandibular Canal in Premolars (mm)

Tooth	*n*	%	Minimum*	Maximum	Mean	SD
Left 1st						
Total	855	13.69	0.55	17.87	5.76	2.35
Male	332	5.32	0.55	17.87	6.49	2.45
Female	523	8.38	0.82	13.61	5.30	2.16
Left 2nd						
Total	796	12.74	−1.17	14.00	3.97	2.34
Male	302	4.84	−0.05	10.52	4.52	2.46
Female	494	7.91	−1.17	14.00	3.64	2.20
Right 1st						
Total	834	13.35	0.25	13.43	5.87	2.44
Male	313	5.01	0.25	13.43	6.56	2.51
Female	521	8.34	0.32	12.64	5.46	2.30
Right 2nd						
Total	801	12.82	−0.22	12.71	4.15	2.47
Male	302	4.84	0.16	11.10	4.53	2.32
Female	499	7.99	−0.22	12.71	3.93	2.53

SD, standard deviation.

*Negative values mean invading the mandibular canal.

Discussion

The present study used CBCT imaging to assess the proximity of the root apex of the posterior teeth to the MC and the radiodensity of the bone located between these structures in a Brazilian population. CBCT imaging has greater accuracy compared with intraoral radiography for bone distance measurements, allowing precise measurement of the distance from the apices of the posterior teeth to the MC (1, 2, 17). However, although CBCT imaging is useful for the quantitative analysis of bone density (18), some authors warn that this method is not entirely reliable for the quantitative assessment of bone mass because the voxel values obtained from CBCT images are not absolute (19–21).

Regarding this matter, a previous study assessed the changes in bone density during orthodontic treatment using CBCT imaging and concluded that it is useful for the evaluation of bone density changes around the teeth (22). Additionally, another study measured the shades of gray on CBCT scans and the Hounsfield units obtained from spiral computed tomographic scans and found that the grayscale values of edentulous sites correlated with bone quality assessed at the time of surgery (23). They concluded that the grayscale values obtained from CBCT scans can be used to infer the bone density and may assist in the evaluation of bone quality in potential implant sites. In our study, because the region of interest was mostly around the periapical region and the software used has a tool that correlates the grayscale values with Hounsfield units, CBCT imaging appeared reliable to measure bone density in these areas.

A very close relationship between the root apices and the MC was identified in more than 8% of the dental roots in the population studied, validating the results of previous studies conducted with other populations (1, 2, 12, 24–26). Even more worrisome was the finding of direct contact between the apices of multiple roots with the MC ($n = 165$), which has also been reported by 2 other studies (2, 26). In the present study, teeth more frequently found to be in direct contact with the MC and, consequently, presenting increased risk of accidents were the second lower molars. These results are in accordance with those of other studies (1, 2).

The analysis by roots showed that the distal root of second molars and the mesial root in sequence were not only the closest root but also the root with the highest frequency of intimate contact with the MC. Another result that calls for attention is the number of the second premolar roots very close to the MC (distance <1 mm; Supplemental Table S2 is available online at www.jendodon.com), losing in frequency only for roots of second molars. These results aid in understanding the high incidence of endodontic-related paresthesia associated with these teeth as presented in a previous study (27).

As did the present study, previous studies had already shown that female patients have root apices closer to the MC compared with male patients (1, 2, 11, 26, 28). This difference between men and women may be caused by the fact that men usually have a larger body size and, consequently, greater distance between the root apices and the MC (29).

A limitation of the previous studies is that they disregarded bone density when assessing the distance between the root apices of the inferior and posterior teeth and the MC. Bone density is one of the parameters that attest to the quality of the adjacent bone, which may act as a protective factor of possible damage to the IAN. In this study, the

TABLE 2. The Distances between the Root Apices and the Mandibular Canal in Molars (mm)

	Mesial root						Distal root					
Tooth	*n*	%	Minimum*	Maximum	Mean	SD	*n*	%	Minimum*	Maximum	Mean	SD
Left 1st												
Total	498	7.97	−1.14	15.43	5.17	2.61	498	7.97	−0.03	15.29	5.13	2.66
Male	190	3.04	0.17	14.37	5.96	2.65	190	3.04	0.27	15.29	5.92	2.74
Female	308	4.93	−1.14	15.43	4.67	2.45	308	4.93	−0.03	14.14	4.65	2.49
Left 2nd												
Total	680	10.89	−2.89	13.63	3.70	2.54	680	10.89	−2.89	13.66	3.53	2.58
Male	243	3.89	0	12.70	4.33	2.77	243	3.89	−0.14	12.7	4.20	2.86
Female	437	7.00	−2.89	13.63	3.34	2.33	437	6.99	−2.89	13.66	3.16	2.33
Left 3rd												
Total	266	4.26	−1.12	12.13	3.77	2.71	266	4.26	−1.35	11.25	3.45	2.74
Male	117	1.87	−0.66	10.37	4.23	2.85	117	1.87	−1.16	10.07	3.94	2.83
Female	149	2.39	−1.12	12.14	3.41	2.55	149	2.38	−1.35	11.25	3.07	2.61
Right 1st												
Total	534	8.55	−0.12	14.87	5.19	2.75	534	8.55	0.01	15.81	5.15	2.75
Male	209	3.35	0.43	14.87	5.83	2.79	209	3.34	0.04	15.81	5.65	2.82
Female	325	5.20	−0.12	13.68	4.78	2.65	325	5.20	0.01	14.26	4.82	2.66
Right 2nd												
Total	715	11.45	−1.48	14.04	3.57	2.58	715	11.45	−2.06	14.04	3.41	2.71
Male	263	4.21	−0.3	14.04	4.25	2.70	263	4.21	−2.06	14.04	4.03	3.00
Female	452	7.24	−1.49	13.84	3.18	2.43	452	7.23	−1.49	12.92	3.05	2.45
Right 3rd												
Total	265	4.24	−0.94	15.49	3.71	2.84	265	4.24	−0.94	15.75	3.61	2.99
Male	107	1.71	−0.94	15.50	4.49	3.05	107	1.71	−0.94	15.75	4.40	3.24
Female	158	2.53	−0.40	11.55	3.19	2.57	158	2.53	−0.40	13.70	3.07	2.70

SD, standard deviation.

*Negative values mean invading the mandibular canal.

radiodensity of the bone located between the dental apices and the MC was evaluated for each root directly onto the CBCT scan. It was observed that the radiodensity was within the higher values (D1) in more than 80% of cases. Conversely, among the 8996 roots evaluated for the bone density, only 16 roots were associated with a low bone radiodensity (D3), and none presented a bone with the lowest degree of radiodensity (D4). In these cases, patients are probably more prone to accidents and complications of an endodontic origin. A low density of the trabecular bone is characterized by the presence of numerous lacunae that could favor the penetration of extruded products through the apical foramen toward the nerve (5).

The clinical implication of the present findings can already be found in the literature because a plethora of cases have already been reported regarding accidents and complications to the IAN during endodontic treatment of the lower second molars, as described in a systematic review (5). Endodontic procedures should be performed with caution in all teeth next to the MC. Special attention should be given to the maintenance of the working length of apical preparation, both in instrumentation and intracanal medication placement as well as obturation, to avoid the nerve damage (5). The distance of the dental apices to the MC and the bone density between these structures may serve as predictors of injury to the IAN and its branches.

It was concluded that the possibility of damage to the IAN is higher in cases of treatment performed on the second molars, especially in female patients, and that the quality of the adjacent bone acts as a protective factor because the density was comparable with that of type D1 bone. Finally, prospective and retrospective studies are needed to provide data regarding the incidence of accidents involving endodontic treatment and the MC as well as the most frequently involved teeth.

Acknowledgments

Supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazilian governmental Institutions. The authors thank the Data X Clinic for all support.

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Supplementary Material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at www.jendodon.com (https://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2019.01.004).

References

1. Kovisto T, Ahmad M, Bowles WR. Proximity of the mandibular canal to the tooth apex. J Endod 2011;37:311–5.
2. Burklein S, Grund C, Schafer E. Relationship between root apices and the mandibular canal: a cone-beam computed tomographic analysis in a German population. J Endod 2015;41:1696–700.
3. Scarano A, Di Carlo F, Quaranta A, et al. Injury of the inferior alveolar nerve after overfilling of the root canal with endodontic cement: a case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;104:e56–9.
4. Gambarini G, Plotino G, Grande NM, et al. Differential diagnosis of endodontic-related inferior alveolar nerve paraesthesia with cone beam computed tomography: a case report. Int Endod J 2011;44:176–81.
5. Alves FR, Coutinho MS, Goncalves LS. Endodontic-related facial paresthesia: systematic review. J Can Dent Assoc 2014;80:e13.
6. Dempf R, Hausamen JE. Lesions of the inferior alveolar nerve arising from endodontic treatment. Aust Endod J 2000;26:67–71.
7. Ahonen M, Tjaderhane L. Endodontic-related paresthesia: a case report and literature review. J Endod 2011;37:1460–4.
8. Lopez-Lopez J, Estrugo-Devesa A, Jane-Salas E, et al. Inferior alveolar nerve injury resulting from overextension of an endodontic sealer: non-surgical management using the GABA analogue pregabalin. Int Endod J 2012;45:98–104.
9. Givol N, Rosen E, Bjorndal L, et al. Medico-legal aspects of altered sensation following endodontic treatment: a retrospective case series. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;112:126–31.
10. Chong BS, Quinn A, Pawar RR, et al. The anatomical relationship between the roots of mandibular second molars and the inferior alveolar nerve. Int Endod J 2015;48:549–55.

11. Kawashima Y, Sakai O, Shosho D, et al. Proximity of the mandibular canal to teeth and cortical bone. J Endod 2016;42:221–4.
12. Lvovsky A, Bachrach S, Kim HC, et al. Relationship between root apices and the mandibular canal: a cone-beam computed tomographic comparison of 3 populations. J Endod 2018;44:555–8.
13. Basa O, Dilek OC. Assessment of the risk of perforation of the mandibular canal by implant drill using density and thickness parameters. Gerodontology 2011;28:213–20.
14. Coskunses FM, Sinanoglu A, Helvacioglu-Yigit D, et al. The extrusion of root canal cement containing paraformaldehyde into the inferior alveolar nerve canal resulting in infection and numbness. Int Endod J 2016;49:610–7.
15. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. London: Chapman & Hall/CRC; 1991.
16. Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Bränemark PI, Zarb GA, Albrektsson T, eds. *Tissue-integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessnce Publ Co; 1985.
17. Grimard BA, Hoidal MJ, Mills MP, et al. Comparison of clinical, periapical radiograph, and cone-beam volume tomography measurement techniques for assessing bone level changes following regenerative periodontal therapy. J Periodontol 2009;80:48–55.
18. Lai RF, Zou H, Kong WD, et al. Applied anatomic site study of palatal anchorage implants using cone beam computed tomography. Int J Oral Sci 2010;2:98–104.
19. Naitoh M, Hirukawa A, Katsumata A, et al. Prospective study to estimate mandibular cancellous bone density using large-volume cone-beam computed tomography. Clin Oral Implants Res 2010;21:1309–13.
20. Nomura Y, Watanabe H, Honda E, et al. Reliability of voxel values from cone-beam computed tomography for dental use in evaluating bone mineral density. Clin Oral Implants Res 2010;21:558–62.
21. Hohlweg-Majert B, Pautke C, Deppe H, et al. Qualitative and quantitative evaluation of bony structures based on DICOM dataset. J Oral Maxillofac Surg 2011;69:2763–70.
22. Hsu JT, Chang HW, Huang HL, et al. Bone density changes around teeth during orthodontic treatment. Clin Oral Investig 2011;15:511–9.
23. Valiyaparambil JV, Yamany I, Ortiz D, et al. Bone quality evaluation: comparison of cone beam computed tomography and subjective surgical assessment. Int J Oral Maxillofac Implants 2012;27:1271–7.
24. Littner MM, Kaffe I, Tamse A, et al. Relationship between the apices of the lower molars and mandibular canal–a radiographic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986;62:595–602.
25. Denio D, Torabinejad M, Bakland LK. Anatomical relationship of the mandibular canal to its surrounding structures in mature mandibles. J Endod 1992;18:161–5.
26. Simonton JD, Azevedo B, Schindler WG, et al. Age- and gender-related differences in the position of the inferior alveolar nerve by using cone beam computed tomography. J Endod 2009;35:944–9.
27. von Ohle C, ElAyouti A. Neurosensory impairment of the mental nerve as a sequel of periapical periodontitis: case report and review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;110:e84–9.
28. Wang X, Chen K, Wang S, et al. Relationship between the mental foramen, mandibular canal, and the surgical access line of the mandibular posterior teeth: a cone-beam computed tomographic analysis. J Endod 2017;43:1262–6.
29. Schmittbuhl M, Le Minor JM, Schaaf A, et al. The human mandible in lateral view: elliptical fourier descriptors of the outline and their morphological analysis. Ann Anat 2002;184:199–207.

Artigo 3.

Pacheco-Yanes, J., Gazzaneo, I., Pérez, A. R., Armada, L., & Neves, M. (2019). Transportation assessment in artificial curved canals after instrumentation with Reciproc, Reciproc Blue, and XP-endo Shaper Systems. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 10(3), e12417. https://doi.org/10.1111/jicd.12417

Received: 18 September 2018 | Revised: 14 January 2019 | Accepted: 22 February 2019

DOI: 10.1111/jicd.12417

ORIGINAL ARTICLE

Endodontics

WILEY

Transportation assessment in artificial curved canals after instrumentation with Reciproc, Reciproc Blue, and XP-endo Shaper Systems

Juan Pacheco-Yanes | Isbelia Gazzaneo | Alejandro R. Pérez | Luciana Armada | Mônica A. S. Neves

Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence
Dr Juan Pacheco-Yanes, Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, Brazil.
Email: doctorpacheco@gmail.com

Funding information
The present study was supported by grants from the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro, FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ).

Abstract

Aim: In the present study, we compared the transportation of three different instrumentation systems in different levels of standardized artificial curved canals.

Methods: Sixty epoxy resin blocks containing simulated canals were divided into three groups (n = 20) according to the instrument used for canal preparation: Reciproc (REC), Reciproc Blue (REC Blue), and XP-endo Shaper (XPS). Pre- and post-instrumentation digital images of each specimen were superimposed by Photoshop software to evaluate the different amount of transportation. The Kruskal-Wallis and Wilcoxon were the non-parametric tests applied for the intergroup and intragroup analyses, respectively. The significance level was set at 5%.

Results: The XPS showed significantly less canal transportation than REC Blue at five levels ($P < 0.05$) and significantly less canal transportation at seven evaluated levels when compared with the REC ($P < 0.05$). REC Blue showed significant less canal transportation than REC at four of the eight evaluated levels ($P < 0.05$). All evaluated instruments showed a significantly higher amount of resin removal toward the inner wall compared to the outer wall of the curvature ($P < 0.001$).

Conclusion: Although the XPS showed significantly less canal transportation than REC and REC Blue, all systems produced transportation from the original canal anatomy.

KEYWORDS
nickel-titanium, Reciproc, Reciproc Blue, root canal, XP-endo Shaper

1 | INTRODUCTION

The main goals of root canal instrumentation are to clean and shape the root canal system, creating a continuously tapered preparation from the coronal access to the apical foramen.[1] This kind of preparation allows better irrigant penetration, thus improving debridement, canal disinfection,[2,3] and later adequate filling of the root canal space.[1] The capacity of an instrument or a technique to maintain the prepared canal centered in root cross-sections is seen as favorable, while any transportation from the original canal path, is seen as unfavorable.[4] In order not to compromise the success of endodontic treatment, the root canal should be uniformly enlarged in all directions, maintaining the original shape of the canal, including the apical foramen and curvature.[5] However, these goals are not always easy to achieve, causing asymmetric dentin removal with a consequent canal or apical transportation, which could compromise the treatment outcome.[6]

 © 2019 John Wiley & Sons Australia, Ltd

In order to achieve optimum clean and shape of the root canal system, various nickel-titanium (NiTi) alloy instruments have been introduced into the endodontic market.[7] NiTi instruments maintain the original canal shape, which helps with superelasticity and memory properties, when compared to stainless steel instruments.[8-11] However, studies show that transportations from the original path of the root canal, even using NiTi instruments, are still prevalent.[12-14] Canal transportation is due to different factors, including the instrument's geometric characteristics, additional thermal treatments during the fabrication process, and its operating mode.[9,12-15]

Reciproc (REC; VDW, Munich, Germany) and Reciproc Blue (REC Blue; VDW, Germany) are two examples of new instruments emerging as a single preparation file operated in a counterclockwise reciprocal rotation movement. These instruments are available in three sizes: R25 (25/0.08), R40 (40/0.06), and R50 (50/0.05). REC files have been manufactured by a heat-treatment operation from a special NiTi alloy called Martensite Wire (M-Wire).[16,17] For its part, REC Blue files use a new method of processing NiTi wire that results in a distinctive blue color due to a visible titanium oxide layer.[18] This heat fabrication treatment changes its molecular structure so that the material is even more flexible and resistant to cyclic fatigue.[18,19]

However, the XP-endo Shaper (XPS; FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Switzerland), is also a single-file preparation system, but operates in a clockwise continuous rotation movement. It combines the MaxWire alloy technology to give more flexibility and cyclic fatigue resistance to the instrument and a booster tip that enables the instrument to start shaping a canal with an initial diameter smaller than the instrument itself. According to the manufacturer's instructions, at 37°C temperature, the XPS instrument is claimed to expand and contract to adapt to the root canal morphology. Not only does it start conforming at a corresponding International Organization for Standardization (ISO) N° 15 diameter and reach an ISO N° 30 diameter but also increases tapering from 0.01 to at least 0.04.

Literature results related to transportation using the REC instrument in simulated curvature canals is conflicting. Several authors have reported this instrument as showing significant more transportation than others.[20,21] Conversely, another group of authors showed that REC produces less canal transportation,[22,23] while other studies have showed no significant differences.[23-25] To the best of our knowledge, there are no studies to date reporting the performance of the REC Blue and XPS instruments related to transportation assessment after canal preparation. Therefore, the aims of the present study were to evaluate and compare such instruments to the REC files with regard to canal transportation after preparation at the last eight apical millimeters, as well as the resin removal on the inner and outer walls at both the apical terminus and along the entire simulated curved canals.

2 | MATERIAL AND METHODS

For the present study, 60 transparent epoxy resin blocks (Endo Training Blocks; Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland) with ISO sized N° 15, 0.02-tapered, 40°-angle single curvature, and 19-mm length simulated canals were used. Specimens were randomly divided into three groups (n = 20). The simulated canals were all prepared in one session by the same endodontist using instruments up to the working length (WL), which was established at canal terminus (level 0). For this purpose, all instruments were operated on a torque-controlled endodontic motor (Silver Reciproc; VDW, Munich, Germany). Each instrument was used to enlarge three canals and then discarded. The preparation time used with each instrument was not a considered variable in the present study.

With the purpose of standardizing the working conditions, the instrumentation process was carried out inside a cabinet containing an ambient heater (800-Heater; PlasLabs, Lansing, MI, USA) at a controlled temperature of 37°C. All the canals were irrigated with preheated (37°C) distilled water, with a total volume of 20 mL per canal. During instrumentation, irrigation was performed using a 5-mL disposable plastic syringe with a 30-gauge needle (NaviTip; Ultradent Products, South Jordan, UT, USA), positioned 3 mm short of the WL.

2.1 | Block preparation for initial analysis

In order to capture the initial canal images, all simulated canals were filled with black ink (Corfix, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil), by using a 1-mL insulin syringe. For image capture, each block was attached to a customized stable support device adapted to a tripod so that the blocks could be positioned maintaining a fixed distance at a 90° angle to a digital camera's (EOS Rebel T3; Canon, Taichung, Taiwan) objective macro-lens (SIGMA 105 mm 1:2.8 DG MACRO HSM; Sigma Corp., Bandai, Fukushima, Japan) in the same stable position for all taken photographs. A digital image of each specimen was captured before instrumentation (Figure 1A). After initial photographs were taken, each canal was irrigated with 2 mL of distilled water to remove the dye, and patency was verified with a 10 and 15 K-type file (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland).

2.2 | Instrumentation groups

2.2.1 | Reciproc & Reciproc Blue groups

Sequences of preparation for the REC and REC Blue groups were the same, with the only difference being the instrument itself (Figure 2A). Torque and speed values used for both systems were pre-established by the manufacturer of the mentioned reciprocating motor in the RECIPROC ALL mode.

After patency, instrument R25 was introduced in the canal, applying light apical pressure, making three in-and-out pecking motions with 3 mm of maximum amplitude or until resistance was reached. After this sequence of movements, the instrument was removed from the canal and cleaned, the canal irrigated with 2 mL of distilled water, and apical patency confirmed with a 15 K-type file. This sequence was repeated three more times until the preparation was terminated.

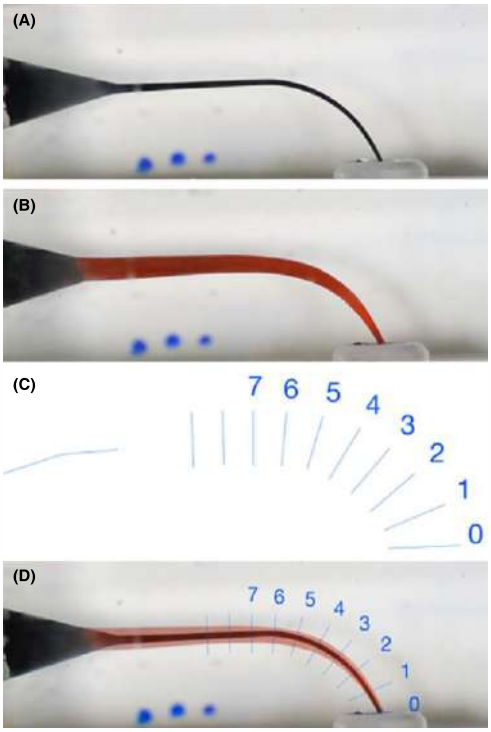


FIGURE 1 Representative images of simulated canals. (A) before preparation, (B) after preparation, (C) scaled mask, (D) superimposition

2.2.2 | XP-endo Shaper group

The XPS instrument was used as described in a previous study.[26] It was introduced into the canal with three-to-five up-and-down strokes, applying light apical pressure until the WL was reached. Next, the instrument was removed from the canal and cleaned. The canal was irrigated with 2 mL of distilled water and its patency verified with a 15 K-type file. The XPS was reintroduced in the canal and used for 10 seconds with five in-and-out movements with a 3-4-mm amplitude up to the WL. This sequence was repeated twice more, totaling three cycles of 10 seconds at WL (Figure 2B). Torque and speed values used for the XPS were 1 Ncm and 800 rpm, respectively.

2.3 | Block preparation for final analysis

After instrumentation, the canals were dried through suction with capillary tips (Ultradent Products) diameter 0.35 and 25-mm length, and subsequently filled with red ink. Each block was attached to the support device to capture the "after preparation" images (Figure 1B).

Adobe Photoshop software (CS6, version 13.0; Adobe Systems, San Jose, CA, USA) was calibrated by the use of a ruler to create a transparent "scaled mask" of measures (Figure 1C). The "scaled mask" before and after preparation images were superimposed together using the Scripts-Load Files into Stack tool to automatically align source images. The figure on top of the stack was placed in the multiply view mode, and opacity was adjusted to permit proper visualization of the three images for measurements (Figure 1D). Measurements of the effects of the different instruments on the canal walls were performed according to modifications from previous studies.[12,21,27-29] The last apical 8 mm of the inner and outer walls of each canal were estimated by two calibrated endodontists, working independently and blinded to the groups by using the ruler tool of the Photoshop software. The quantity of transportation present in the canal was determined in 1-mm intervals from level 0, and calculated by the difference between the wear of the inner and outer portions of the canal walls at eight different levels. The first measuring point was at level 0, and the last measuring point was level 7. This resulted in eight measuring levels for both the inner and outer walls of the canal, a total of 16 measuring levels per acrylic block. The canal was considered as having no transportation in the inner-outer plane if the difference between them at a given point was equal to 0. Data related to the amount of wear on the canal walls were analyzed statistically to assess the meaning of the obtained results.

2.4 | Statistical analysis

The Shapiro-Wilks and Kolmogorov-Smirnov normality tests were applied to data resulting in a non-normality distribution. The Kruskal-Wallis non-parametric test was applied for both the intergroup analysis of centering ability at each of the eight evaluated levels prepared by the three instruments and the intergroup comparison of resin removed from both the inner and outer walls at the apical terminus and along the entire canal wall. For the intragroup analysis comparing the amount of resin removed along with the entire inner and outer walls for each instrument, the Wilcoxon non-parametric test for two dependent variables was applied. Data were analyzed using the SPSS version 20.0 (IBM, São Paulo, Brazil), establishing a statistical significance level of 5%.

3 | RESULTS

No instrument fracture or canal irregularity, such as ledge, was observed during the shaping of the simulated canals in any group. Data from the intergroup centering ability analysis are depicted in Table 1. The XPS showed significantly less transportation than REC Blue at levels 0, 1, 5, 6, and 7, and showed significantly less transportation at levels 0, 1, 3, 4, 5, 6, and 7 when compared to REC. REC Blue showed significantly less transportation than REC at levels 3, 4, 5, and 6. There was no significant difference in the amount of transportation between the groups at level 2 (Figure 3).

FIGURE 2 Experimental procedure flowcharts. (A) Reciproc and Reciproc Blue, (B) XP-endo Shaper. WL, working length

TABLE 1 Centering ability. Means (mm) at different levels from the apical terminus after preparation with Reciproc Blue, Reciproc, and XP-endo Shaper

	Reciproc Blue			Reciproc			XP-endo Shaper		
Level	Mean ± SD	Minimum	Maximum	Mean ± SD	Minimum	Maximum	Mean ± SD	Minimum	Maximum
0	$0.12^{A} \pm 0.05$	0	0.21	$0.15^{A} \pm 0.06$	0.04	0.30	$0.04^{B} \pm 0.05$	0	0.15
1	$0.05^{A} \pm 0.03$	0	0.12	$0.05^{A} \pm 0.02$	0	0.08	$0.03^{B} \pm 0.02$	0	0.08
2	$0.03^{A} \pm 0.02$	0	0.08	$0.04^{A} \pm 0.04$	0	0.16	$0.02^{A} \pm 0.01$	0	0.05
3	$0.04^{A} \pm 0.03$	0.01	0.12	$0.08^{B} \pm 0.05$	0.01	0.20	$0.03^{B} \pm 0.03$	0	0.12
4	$0.11^{A} \pm 0.05$	0.02	0.20	$0.17^{B} \pm 0.07$	0.09	0.38	$0.08^{B} \pm 0.04$	0	0.16
5	$0.21^{A} \pm 0.07$	0.11	0.34	$0.31^{B} \pm 0.06$	0.22	0.45	$0.13^{C} \pm 0.05$	0.04	0.21
6	$0.25^{A} \pm 0.06$	0.15	0.38	$0.33^{B} \pm 0.06$	0.24	0.49	$0.14^{C} \pm 0.05$	0.06	0.20
7	$0.13^{A} \pm 0.08$	0.01	0.32	$0.18^{A} \pm 0.06$	0.07	0.34	$0.05^{B} \pm 0.04$	0.01	0.14

SD, standard deviation. Different upper case letters denote a statistic significant difference in deviation between instruments at different levels. Kruskal-Wallis test, significance level $P < 0.05$.

The mean and standard deviation of the amount of resin removed from the inner and outer walls for the entire canal wall are presented in Table 2. There was a significant difference ($P < 0.001$) between groups for resin removal from the inner wall of the curvature. The REC instrument produced the highest amount of resin removal along the entire inner wall, whereas XPS showed minor removal. For the resin removed from the entire outer wall of the curvature, XPS showed a significantly less amount of resin removal when compared

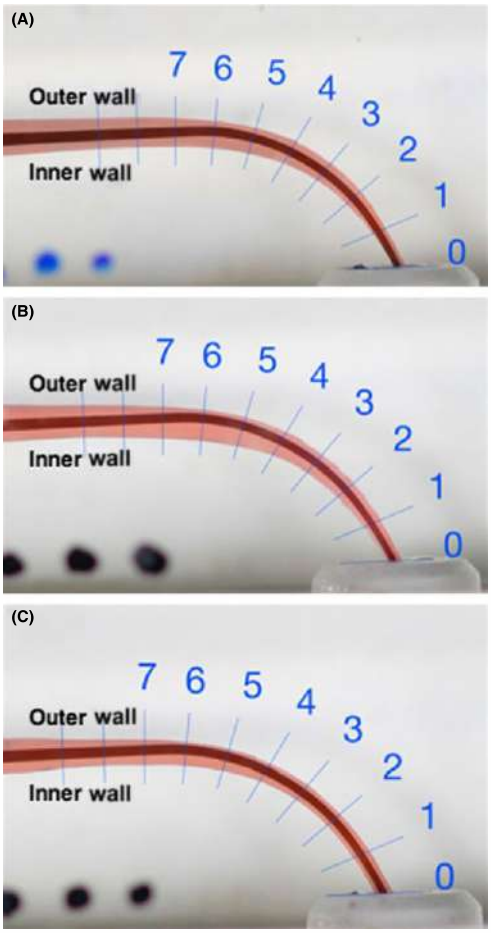


FIGURE 3 Representative image of simulated canals instrumented by using (A) Reciproc Blue, (B) Reciproc, and (C) XP-endo Shaper

to REC Blue and REC ($P < 0.001$). There was no significant difference in the amount of resin removal between REC Blue and REC along the entire outer walls.

Concerning the intergroup analysis at the apical terminus (level 0), data related to the amount of resin removed from the inner and outer walls are also depicted in Table 2. There was a significant difference between REC Blue in relation to the REC and XPS instruments ($P = 0.005$), where REC Blue removed a significantly smaller amount of resin from the inner wall than REC and XPS. There was no significant difference between the amount of resin removed from the inner wall between REC and the XPS. With regard to the amount of resin removal of the outer wall at the apical terminus, there was a significant difference between REC in relation to REC Blue and the XPS ($P < 0.001$), where REC was found to have removed a significantly higher amount of resin from the outer wall than REC Blue and the XPS. There was no significant difference between the amount of resin removal from the outer wall between the REC Blue and XPS instruments (Figure 3).

Intragroup comparison of resin removal along the entire inner and outer walls of the curvature after preparation with REC Blue, REC, and the XPS is depicted in Table 3. All evaluated instruments showed a significantly higher amount of resin removal toward the entire inner wall of the curvature in relation to the entire outer wall ($P < 0.001$) (Table 3; Figure 3).

4 | DISCUSSION

The maintenance of the original root canal shape during instrumentation in curved canals is a difficult task, even when using NiTi instruments.[30] According to some manufacturers, the heat treatment process of NiTi alloys can improve the performance of rotary endodontic instruments during root canal preparation. In the present study, we compared the canal transportation of rotary endodontic instruments manufactured using different NiTi alloys.

According to the literature, simulated canals in resin blocks might represent a limitation in the study once the hardness and abrasion behavior of acrylic resin and root dentin are different.[31] In the current study, resin blocks were selected in order to take advantage of the great benefit represented by the standardization of the anatomy to be used for all tested instruments. Although micro-computed tomography imaging is the most accurate way to evaluate the transportation of NiTi files,[32] the superposition is a widely accepted method used to assess the shaping effects of instrumentation in simulated root canals.[8,12,14,30]

A more centralized preparation and better overall transportation performance of the XPS instrument was evident when compared to REC Blue and REC, which showed significant less transportation at five of the eight and seven of the eight evaluated levels respectively (Table 1). The XPS is an innovative broad-spectrum shaping instrument that is made of MaxWire alloy. The instrument has a size/taper of 30/0.01, which according to the manufacturer, makes it more flexible and resistant to cyclic fatigue and can reach a final canal preparation of a minimum of 30/0.04. REC and REC Blue files are available in a size/taper of 25/0.08. The shaping ability of NiTi instruments with different tapers has been compared in several studies,[33-35] showing that these dissimilarities between tapers could explain the differences in terms of transportation in simulated canals.

In the present study, a better overall transportation performance of the REC Blue compared to REC was evident, as it showed significant less transportation at four of the eight evaluated levels (Table 1). In the new-generation REC Blue system, the manufacturer replaced the M-Wire alloy by a proprietary-specific oxide surface layer thermomechanical manufacturing process.[18,19] Blue thermal treatment reduces the NiTi shape memory alloy and induces the appearance of the martensitic transformation in two phases,[31] which in turn increases fatigue resistance, flexibility,

	Groups	Level 0 (apical terminus)	Entire canal wall
Inner area ± SD	Reciproc Blue	$0.0^{A} \pm 0.01$	$0.22^{A} \pm 0.13$
	Reciproc	$0.02^{B} \pm 0.02$	$0.26^{B} \pm 0.15$
	XP-endo Shaper	$0.03^{B} \pm 0.04$	$0.15^{C} \pm 0.07$
Outer area ± SD	Reciproc Blue	$0.12^{A} \pm 0.05$	$0.15^{A} \pm 0.04$
	Reciproc	$0.18^{B} \pm 0.06$	$0.15^{A} \pm 0.04$
	XP-endo Shaper	$0.07^{A} \pm 0.07$	$0.10^{B} \pm 0.04$

TABLE 2 Intergroup comparison of resin removed from the inner or outer areas at the apical terminus and along the entire canal wall after preparation with Reciproc Blue, Reciproc, and XP-endo Shaper

Different upper case letters denote a statistically significant difference per area (inner or outer) in the amount of resin removed between groups at level 0 (apical terminus) and along the entire inner or outer walls.
Kruskal-Wallis test, significance level $P < 0.05$. Mean ± SD (mm).

TABLE 3 Intragroup comparison of resin removed from the inner and outer areas along the entire canal wall after preparation with Reciproc Blue, Reciproc, and XP-endo Shaper

	Inner area ± SD	Outer area ± SD
Reciproc Blue	$0.22^{a} \pm 0.13$	$0.15^{b} \pm 0.04$
Reciproc	$0.26^{a} \pm 0.15$	$0.15^{b} \pm 0.04$
XP-endo Shaper	$0.15^{a} \pm 0.07$	$0.10^{b} \pm 0.04$

Lower case letters denote a statistically significant difference between areas (inner and outer) per instrument (intragroup).
Wilcoxon test, significance level $P < 0.001$. Mean ± SD (mm).

cutting efficiency, and canal-centering capability compared to the conventional M-Wire alloy,[16-19] which could explain the differences found between both systems.

In the present study, all systems exhibited the same behavior at 2 mm of the apical termination. REC and REC Blue have the same constant diameter and taper in the first 3 mm, thus at 2 mm their behavior was the same. Taking into account the fact that the XPS has a size of 30/0.04 and presents the ability to adapt itself to the anatomy of the canal, keeping it centralized, this can explain the same performance at this length as the other systems evaluated.

During the shaping process of the curved canals, the original canal must be preserved, especially at the apex and along the entire inner wall of the canal curvature;[36] excessive canal transportation can result in thinned root canal walls, which in turn can lead to perforations or vertical fractures.[9] In the present study, REC Blue showed significant less resin removal in both the inner and outer walls at the apical terminus and along the entire inner canal wall than REC (Table 2). As both systems have the same file design, taper, and diameter, it suggests that the different thermal treatments might have influenced the outcome due to an important improvement in flexibility and mechanical properties of REC Blue compared with REC conventional M-Wire instruments.[18,19]

It is interesting to note that, although REC Blue showed significant less resin removal in the inner wall at the apical terminus when compared with the XPS (Table 2), the latter showed a greater capacity for centralization in the canal at this level (Table 1). One possible explanation would be that the XPS is made of a different NiTi alloy (MaxWire),[37] which could allow it to be more flexible, promoting less canal transportation. The XPS 30/0.01 size/taper can reach 30/0.04, whereas REC and REC Blue have a variable taper along its length with a considerable larger core mass and rigidity. The present findings are in agreement with previous studies that showed a higher amount of canal transportation with the reciprocal system.[34,35,38]

All instruments evaluated in the present study showed a significantly higher amount of resin removed toward the entire inner wall of the curvature in relation to the entire outer wall (Table 3), which is in accordance with another study, which found that root canal preparation could result in canal transportation caused by increased dentin removal at the inner aspect of a curved canal.[30]

Under the conditions of the present study, it can be concluded that the XPS demonstrated higher centralization capacity of the canal preparation than conventional REC and REC Blue at the different levels tested. The manufacturing process of the REC Blue instruments has a positive influence in the promotion of less canal transportation compared to the REC instruments. All instruments tested presented a significantly higher amount of resin removal toward the inner wall compared to the outer wall of the curvature. Further studies on extracted human teeth are recommended with 3-D technologies to corroborate the results of the present study.

ORCID

Juan Pacheco-Yanes https://orcid.org/0000-0003-1381-3337
Mônica A. S. Neves https://orcid.org/0000-0003-1238-3291

REFERENCES

1. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am*. 1974;18:269-296.
2. Albrecht LJ, Baumgartner JC, Marshall JG. Evaluation of apical debris removal using various sizes and tapers of ProFile GT files. *J Endod*. 2004;30:425-428.
3. Boutsioukis C, Gogos C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Van der Sluis LW. The effect of root canal taper on the irrigant flow: evaluation using an unsteady Computational Fluid Dynamics model. *Int Endod J*. 2010;43:909-916.

4. Peters OA, Koka RS. Preparation of coronal and radicular spaces. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, eds. *Ingle's Endodontics 6*. Hamilton, Ontario: BC Decker; 2008:877-991.
5. Gonzalez-Rodrıguez MP, Ferrer-Luque CM. A comparison of Profile, Hero 642, and K3 instrumentation systems in teeth using digital imaging analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2004;97:112-115.
6. Weine FS, Kelly RF, Lio PJ. The effect of preparation procedures on original canal shape and on apical foramen shape. *J Endod*. 1975;1:255-262.
7. Thompson SA. An overview of nickel-titanium alloys used in dentistry. *Int Endod J*. 2000;33:297-310.
8. Pertot WJ, Camps J, Damiani MG. Transportation of curved canals prepared with canal master U, canal master U niti, and stainless steel K-type files. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1995;79:504-509.
9. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod*. 2004;30:559-567.
10. Bishop K, Dummer PM. A comparison of stainless steel Flexofiles and nickel-titanium NiTiFlex files during the shaping of simulated canals. *Int Endod J*. 1997;30:25-34.
11. You SY, Kim HC, Bae KS, Baek SH, Kum KY, Lee W. Shaping ability of reciprocating motion in curved root canals: a comparative study with micro-computed tomography. *J Endod*. 2011;37:1296-1300.
12. Ajuz NC, Armada L, Goncalves LS, Debelian G, Siqueira JF Jr. Glide path preparation in S-shaped canals with rotary pathfinding nickel-titanium instruments. *J Endod*. 2013;39:534-537.
13. Short JA, Morgan LA, Baumgartner JC. A comparison of canal centering ability of four instrumentation techniques. *J Endod*. 1997;23:503-507.
14. Silva EJ, Tameirao MD, Belladonna FG, Neves AA, Souza EM, De-Deus G. Quantitative transportation assessment in simulated curved canals prepared with an adaptive movement system. *J Endod*. 2015;41:1125-1129.
15. Hartmann MS, Barletta FB, Camargo Fontanella VR, Vanni JR. Canal transportation after root canal instrumentation: a comparative study with computed tomography. *J Endod*. 2007;33:962-965.
16. Shen Y, Zhou HM, Zheng YF, Campbell L, Peng B, Haapasalo M. Metallurgical characterization of controlled memory wire nickel-titanium rotary instruments. *J Endod*. 2011;37:1566-1571.
17. Zinelis S, Darabara M, Takase T, Ogane K, Papadimitriou GD. The effect of thermal treatment on the resistance of nickel-titanium rotary files in cyclic fatigue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103:843-847.
18. De-Deus G, Silva EJ, Vieira VT, et al. Blue thermomechanical treatment optimizes fatigue resistance and flexibility of the reciproc files. *J Endod*. 2017;43:462-466.
19. Plotino G, Grande NM, Cotti E, Testarelli L, Gambarini G. Blue treatment enhances cyclic fatigue resistance of vortex nickel-titanium rotary files. *J Endod*. 2014;40:1451-1453.
20. Nabavizadeh M, Abbaszadegan A, Khojastepour L, Amirhosseini M, Kiani E. A comparison of apical transportation in severely curved canals induced by reciproc and BioRaCe systems. *Iran Endod J*. 2014;9:117-122.
21. dos Santos Marotta P, Kill KB, Marques TVF, Gonçalves LS, Provenzano JC, Armada L. Deviation in simulated curved canals prepared with Reciproc and ProTaper systems. *J Int Oral Health*. 2016;8:850.
22. Silva EJ, Vieira VC, Tameirao MD, et al. Quantitative transportation assessment in curved canals prepared with an off-centered rectangular design system. *Braz Oral Res*. 2016;30:e43.
23. Yoo Y-S, Cho Y-B. A comparison of the shaping ability of reciprocating NiTi instruments in simulated curved canals. *Restor Dent Endod*. 2012;37:220-227.
24. Maia Filho EM, Rizzi Cde C, Coelho MB, et al. Shaping ability of reciproc, unicone, and protaper universal in simulated root canals. *Sci World J*. 2015;2015:690854.
25. Altunbas D, Kutuk B, Kustarci A. Shaping ability of reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems in simulated curved canals. *Eur J Dent*. 2015;9:346.
26. Lacerda M, Marceliano-Alves MF, Perez AR, et al. Cleaning and shaping oval canals with 3 instrumentation systems: a correlative micro-computed tomographic and histologic study. *J Endod*. 2017;43:1878-1884.
27. Rodrigues RC, Soares RG, Gonçalves LS, Armada L, Siqueira JF Jr. Comparison of canal preparation using K3XF, Mtwo and BioRaCe rotary instruments in simulated curved canals. *Quintessence Int*. 2015;9:129-135.
28. Franco V, Fabiani C, Taschieri S, Malentacca A, Bortolin M, Del Fabbro M. Investigation on the shaping ability of nickel-titanium files when used with a reciprocating motion. *J Endod*. 2011;37:1398-1401.
29. Schafer E, Florek H. Efficiency of rotary nickel-titanium K3 instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile. Part 1. Shaping ability in simulated curved canals. *Int Endod J*. 2003;36:199-207.
30. Burklein S, Shafer E. Critical evaluation of root canal transportation by instrumentation. *Endod Topics*. 2013;29:110-124.
31. Shen Y, Zhou H, Coil JM, et al. Profile Vortex and Vortex Blue nickel-titanium rotary instruments after clinical use. *J Endod*. 2015;41:937-942.
32. Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YC, Mazzi-Chaves JF, et al. Root canal preparation using micro-computed tomography analysis: a literature review. *Braz Oral Res*. 2018;32:e66.
33. Yang GB, Zhou XD, Zhang H, Wu HK. Shaping ability of progressive versus constant taper instruments in simulated root canals. *Int Endod J*. 2006;39:791-799.
34. Saleh AM, Vakili Gilani P, Tavanafar S, Schafer E. Shaping ability of 4 different single-file systems in simulated S-shaped canals. *J Endod*. 2015;41:548-552.
35. Burklein S, Poschmann T, Schafer E. Shaping ability of different nickel-titanium systems in simulated S-shaped canals with and without glide path. *J Endod*. 2014;40:1231-1234.
36. Abou-Rass M, Frank AL, Glick DH. The anticurvature filing method to prepare the curved root canal. *J Am Dent Assoc*. 1980;101:792-794.
37. Elnaghy AM, Elsaka SE. Torsional resistance of XP-endo Shaper at body temperature compared with several nickel-titanium rotary instruments. *Int Endod J*. 2018;51:572-576.
38. Gergi R, Arbab-Chirani R, Osta N, Naaman A. Micro-computed tomographic evaluation of canal transportation instrumented by different kinematics rotary nickel-titanium instruments. *J Endod*. 2014;40:1223-1227.

How to cite this article: Pacheco-Yanes J, Gazzaneo I, Pérez AR, Armada L, Neves MAS. Transportation assessment in artificial curved canals after instrumentation with Reciproc, Reciproc Blue, and XP-endo Shaper Systems. *J Invest Clin Dent*. 2019;10:e12417. https://doi.org/10.1111/jicd.12417

Artigo 4.

Pacheco-Yanes, J., Provenzano, J. C., Marceliano-Alves, M. F., Gazzaneo, I., Pérez, A. R., Gonçalves, L. S., & Siqueira, J. F., Jr (2020). Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study. *Clinical oral investigations*, 24(2), 907–914. https://doi.org/10.1007/s00784-019-02970-5

Clinical Oral Investigations
https://doi.org/10.1007/s00784-019-02970-5

ORIGINAL ARTICLE

Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study

Juan Pacheco-Yanes[1] &José C. Provenzano[1] &Marília F. Marceliano-Alves[1] &Isbelia Gazzaneo[1] &Alejandro R Pérez[1] & Lúcio S. Gonçalves[1] &José F. Siqueira Jr[1]

Received: 15 January 2019 / Accepted: 23 May 2019
Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract
Objectives To evaluate and compare irrigant distribution throughout the root canal system of mesial roots of mandibular molars after application of distinct adjunctive irrigant activation procedures.
Materials and methods Fifteen extracted mandibular molars presenting Fan's type II, III, or IV isthmus configurations were selected. The canals were initially enlarged and cleaned. The same specimens were subjected to conventional positive pressure irrigation (PPI) followed by adjunctive irrigation approaches: passive ultrasonic irrigation (PUI), mechanical activation with the XP-endo Finisher instrument, and a control group in which the irrigant remained in the canal with no activation. Retention time for the irrigant was the same for all groups. Sodium hypochlorite mixed with a contrast medium (Omnipaque 300) was used as the irrigant. Before and immediately after the adjunctive irrigation, micro-computed tomographic (micro-CT) scans were taken to evaluate the volume of the entire root canal system that was filled by the irrigant. An exclusive analysis was also done for the isthmus area.
Results Analysis of the entire root canal system showed that the XP-endo Finisher instrument promoted better distribution of the irrigant than PUI and the control group ($p < 0.01$). PUI was not significantly different from the control group ($p > 0.05$). A separate analysis of the isthmus area showed no significant difference between the adjunctive irrigation methods and the control ($p > 0.05$).
Conclusions The XP-endo Finisher instrument promoted better distribution of irrigant throughout the root canal system, especially in the apical canal segment, when compared to PUI. However, the tested approaches did not differ as to the ability to drive irrigants into the isthmus area.
Clinical relevance This study highlighted that the XP-endo Finisher instrument presented a better performance to distribute irrigant throughout the root canal system, especially in the apical canal segment compared to positive pressure irrigation and PUI.

Keywords Adjunctive disinfection steps · Agitation methods · Mandibular molar isthmus · Root canal disinfection · Sodium hypochlorite

Introduction

The endodontic treatment of teeth with apical periodontitis should ideally eliminate all living bacteria and neutralize any bacterial components present in the root canal system; however, anatomical complexities, including the presence of isthmuses, can make it difficult for the clinician to achieve these goals [1]. Bacterial persistence in diverse areas of the canal system is the major cause of emergent or persistent post-treatment disease [2]. Studies have shown that more than 40% of the canals remain positive for detectable bacteria following chemomechanical preparation and sodium hypochlorite (NaOCl) irrigation, indicating that there is a need for supplementary approaches to improve disinfection [3–5].

An isthmus is a narrow, ribbon-like communication between two root canals [6], and can occur in 17 to 100% of the mandibular molars [7, 8]. Studies have shown that proper cleaning and disinfection of the isthmus area may be difficult to achieve [9–13]. Because of

* Juan Pacheco-Yanes
doctorpacheco@gmail.com

[1] Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Estácio de Sá University, Av. Alfredo Baltazar da Silveira, 580/cobertura, Recreio, Rio de Janeiro, RJ 22790-010, Brazil

Published online: 26 June 2019

physical constraints, it is virtually impossible for instruments to reach the isthmus and other areas of the canal system distant from the main canal lumen. Therefore, cleaning and disinfection of these areas should mostly rely on the chemical effects of irrigants and medications. NaOCl has both antibacterial and tissue-dissolving activities [14, 15], but for this substance to be effective in areas distant from the main canal, it has to diffuse or be forced to these areas. Adjunctive procedures, such as ultrasonics and mechanical agitation, have been proposed to supplement the cleaning and disinfecting effects of the chemomechanical procedures by improving the distribution of NaOCl to difficult-to-reach areas [16, 17].

Passive ultrasonic irrigation (PUI) can be performed with a flat wire or a small size instrument freely oscillating at 25–30 kHz ultrasonic frequencies in the root canal. This approach is recommended to agitate the irrigating solution, inducing cavitation and acoustic streaming [18, 19]. Studies have shown conflicting results with regard to the cleaning and disinfecting effects of PUI [9, 11, 20–22]. The recently introduced XP-endo Finisher (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) instrument is a size 25 nontapered rotary instrument made of nickel-titanium (NiTi) MaxWire alloy. At room temperature, the instrument has a straight shape (martensite phase), whereas at the body temperature, it develops a phase change (austenite phase) and assumes a "spoon-like" shape. When rotating in the canal, this shape makes the instrument to expand and contract, increasing the chances for touching more canal walls and agitating the irrigant solution. This may enhance the distribution of the irrigant throughout the canal system [23]. XP-Endo Finisher has demonstrated favorable results in removing smear layer, debris, organic tissue, biofilm, and bacteria from the main root canal [11, 24–26]. As for its effects on the isthmus area, one study showed better debris removal [22], while another study reported unpredictable results in the disinfecting ability [11].

At the time of writing, there was only one study reporting on the 3D mapping distribution of irrigant following positive pressure irrigation (PPI) within the root canal system using micro-CT [27]. However, no study has quantified and compared the different levels of irrigant penetration into the root canal intricacies after activation with different adjunctive approaches. Therefore, the present study evaluated and compared by means of a devised micro-CT approach, the distribution of an irrigant (2.5% NaOCl combined with Omnipaque 300 (Ioexol, GE Healthcare, Ireland Cork, Ireland) as radiographic contrast medium) throughout the root canal system of mesial roots of mandibular molars, including the isthmus area, when subjected to adjunctive irrigant activation steps with either PUI or XP-endo Finisher instrument.

Materials and methods

Pilot study

For visualization in micro-CT scans, NaOCl was mixed with a radiopaque substance. A pilot study was conducted to determine the ideal proportion of 2.5% NaOCl and a commonly used contrast solution (Omnipaque 300). Four mesial roots of mandibular molars were prepared in the same way as described below (specimen preparation). Each root was filled with different proportions of the mixture. The specimens were scanned in a SkyScan 1174v2 scanner (Bruker-microCT, Kontich, Belgium) at 50 kV, 800 mA, an isotropic pixel size of 19.9 μm, and 180° rotation around the vertical axis with a rotation step of 0.9, using a 1-mm-thick aluminum filter and an averaging frame of 2. Images were reconstructed with the NRecon software (v.1.6.10.4; Bruker-microCT) using a beam hardening correction of 15%, ring artifact correction of 5, and smoothing of 5. The CTAn v.1.14.4 software (Bruker-microCT) was used to create 3D models in order to allow the visualization of the inner structure of the specimens. The volume (mm^3) and surface area (mm^2) of the full canal length were calculated in the ImageJ 1.50d software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The 3D Slicer 4.4.0 software (http://www.slicer.org) was used for coregistration of the 3D models from both pre and post-irrigation images with a custom combination of rigid registration module based on image intensity similarities with accuracy larger than 1 voxel. CTVol software (v.2.2.1; Bruker-microCT) was used for qualitative 3D visualization of the irrigating solution within the root canal system. Micro-CT analysis revealed that the best mixture was composed of 40% NaOCl and 60% Omnipaque.

The pilot test also served to evaluate the possibility of reusing the specimens in the different groups after washing procedures for total removal of NaOCl/Omnipaque 300. The following four-stage washing procedure showed the most predictable and best results in rendering the specimens free from detectable irrigant: (1) PPI with 10 mL distilled water per canal; (2) high-speed suction for 1 min using a vacuum pump with the aspiration hose adjusted to the tooth crown and the root apices immersed in water; (3) same as step 2, but this time with the hose adjusted to the apices and the crown immersed in water; and (4) aspiration with a 0.35-mm large, 25-mm long capillary tip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) placed deep within each canal associated with simultaneous copious irrigation with distilled water in the pulp chamber. Specimens were subjected to a post-wash micro-CT scan, in order to verify the total elimination of contrast irrigant.

Micro-CT-based specimen selection

The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee. Fifteen mandibular molars extracted for reasons

not related to this study were selected out of a collection of 80 mandibular molars previously scanned in micro-CT. Selected teeth had two independent mesial canals joined by an isthmus. The isthmus morphology in the selected specimens could be classified as type II, III, or IV, according to Fan et al [28]. Type II is described as a narrow incomplete connection between two canals: type III as an incomplete connection located above or below a completely communicating isthmus and type IV as a narrow cannular communication between two canals. Type I isthmus, which did not occur in this study, represents a complete narrow communication between two canals from top to bottom [28].

Specimen preparation

The root canals were explored with size 10 hand K-files (FKG Dentaire SA, LaChaux-de-Fonds, Switzerland) until the instrument tip reached the apical foramen, as visualized by an operative microscope (DF Vasconcelos, M900, São Paulo, SP, Brazil). This measure was recorded as the patency length, and the canals were initially enlarged up to this point by using size 15 hand K-files (FKG Dentaire, LaChaux-de-Fonds, Switzerland). The canals were then prepared to the working length (WL), which was established 1 mm short of the patency length, by using BioRaCe instruments (FKG Dentaire) from BR0 to BR4, operated in the VDW Silver motor (VDW, Munich, Germany) at 500 rpm and 1.0 Ncm torque. Irrigation was performed with distilled water using NaviTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) 30G needle, placed 3 mm short of the WL. Teeth were then re-scanned in micro-CT, using the same parameters described previously. Datasets were used as a baseline for future comparison with images taken immediately after the different adjunctive methods.

For the present study, the same 15 teeth were used in all test groups. They were used in three different sequences, alternating the order of treatment with the different adjunctive methods (Fig. 1). This alternating approach was done to avoid biases related to the anatomy or by the times each tooth was previously treated. To exemplify, in each test group, five different teeth were treated in the 1st sequence of irrigation, other five in the 2nd sequence, and the last five in the 3rd sequence. To guarantee that no residue of irrigant was left into the root canal system between two treatments, the four-stage washing procedure established in the pilot test was performed and a micro-CT verification scan of each specimen was taken. The specimens were kept under wet conditions at all times.

The root surfaces of each specimen were covered, and the apical foramen was sealed with Topdam (FGM, Joinville, SC, Brazil) to create a closed-ended system. Topdam cover was removed after each treatment and before the 4-stage washing procedure and re-applied before the next treatment.

Adjunctive irrigant activation procedures

PUI or XP-endo Finisher were used as adjunctive methods of agitation. All procedures were carried out inside a cabinet (Permution, Curitiba, PR, Brazil) under controlled temperature (37 °C) maintained by a heater (800-Heater, Plas-Labs, Lansing, MI). In addition, NaOCl was warmed to 37 °C before use.

Before application of the adjunctive irrigation method, each canal was subjected to initial irrigation (PPI) with 1 mL mixed irrigant solution using a 30G NaviTip needle coupled to a flow-controlled irrigation apparatus (Vatea, ReDent-Nova, Ra'anana, Israel). The needle was placed 3 mm short of the WL. The irrigant flow rate was 4 mL/min and short (1–2 mm) in–and-out motions were applied to the needle during irrigation. Next, the canals were subjected to the test groups:

Passive Ultrasonic Irrigation (PUI) group: after initial PPI, EndoUltra 15/0.02 NiTi ultrasonic insert (Vista Dental Products, Racine, WI, USA) was used to agitate the irrigant solution. The insert tip was positioned and maintained 1 mm short of the WL and activated for 1 min within the canal.

XP-endo Finisher group: after initial PPI, the XP-endo Finisher instrument was used in continuous rotation, operated in the VDW Silver motor (800 rpm, 1 Ncm), for 1 min per canal. In-and-out movements of approximately 7-mm amplitude were applied to the instrument.

Control: after initial PPI irrigation, the solution was left in the canals for the same time as in the canals treated with either PUI or XP-endo Finisher.

Micro-CT analysis

After all irrigation methods, the roots were immediately scanned in micro-CT using the same parameters as above. After reconstruction of all sections with the NRecon software (Bruker-microCT), images were converted to NRRD file format using the ImageJ 1.50d (National Institutes of Health), then the coregistration was performed by 3D Slicer v1.5.1.2 software. The quantification of voids was assessed by subtraction from the filled models after mathematical operations using the Image J software (National Institutes of Health). Finally, 3D models were generated with the CTAn v.1.14.4 software (Bruker-microCT) and visualized in the CTVol v.2.3.1 software (Bruker-Micro CT).

Statistical analysis

Micro-CT data was used to evaluate the irrigant distribution throughout the entire root canal system (including the main

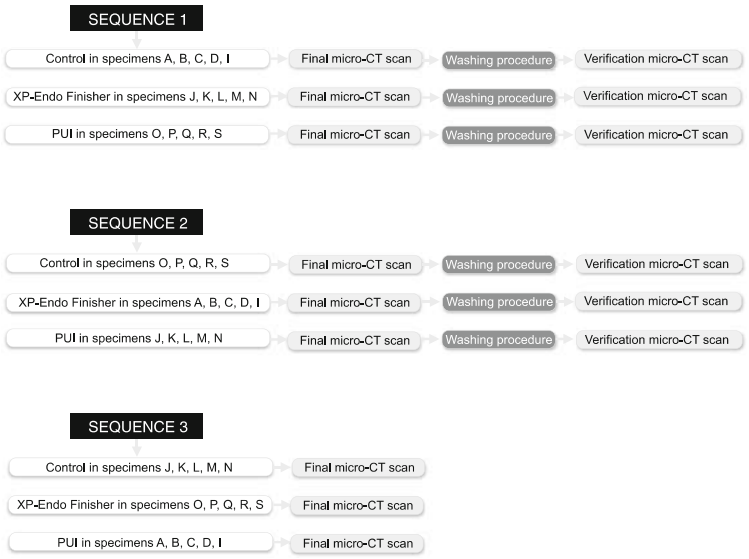


Fig. 1 Flowchart distribution of groups of specimens with different irrigation methods by sequences

canal, isthmus, and other irregularities) or only within the isthmus area after using the different adjunctive irrigation methods. For this, the volume of the root canal system occupied by the irrigant was evaluated. In addition, distribution of the irrigant was also analyzed according to the following: (1) the type of isthmus configuration (Fan's type II, III, or IV), (2) the initial volume of isthmus (< or > than 1.5 mm^3), and (3) the presence of isthmus in the apical 3 mm of the root.

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS), version 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA). The normality distribution of the variables for all analyses was verified through the Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests, as well as graphical analyses. Analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements and the Bonferroni's post hoc were the statistical tests of choice to compare the performance of the irrigation methods in the entire canal system or isthmus area. Data from the irrigant volume in the different types of isthmus were evaluated by the one-way ANOVA and the Tukey's post hoc tests. The Student's *t* test was used to evaluate if the anatomical volume of the isthmus (< or > 1.5 mm^3) or its presence in the apical 3 mm of the root influenced the irrigant penetration therein. The level of significance for all tests was established at 5% ($p < 0.05$).

Results

Data comparing the final volume of voids in the canal system after irrigation with the 3 methods tested are shown in Table 1. When the entire root canal system set was analyzed, the XP-endo Finisher instrument showed a significantly better distribution of irrigant than PUI and the control ($p < 0.05$ for both comparisons). PUI was not significantly different from the control group ($p > 0.05$). Exclusive evaluation of the isthmus area (including all types of isthmus) revealed no significant difference between the tested irrigation approaches ($p > 0.05$) (Fig. 2) (Tables 1 and 2).

None of the isthmus variables (Fan's type configuration, volume, and apical position) influenced irrigant penetration ($p > 0.05$), except for a better filling of isthmus located in the apical 3 mm of the root when PUI was used ($p = 0.03$).

Discussion

Because cleaning and disinfection of the root canal system depend on the chemical effects of irrigants, it is of crucial importance that the irrigant solution reaches not only the main canal but also other anatomical variations, including recesses, isthmuses, and ramifications. Adjunctive agitation approaches have been proposed to propel the irrigant to these difficult-to-reach areas. Here we used micro-CT for the first time to evaluate the distribution of NaOCl throughout the root canal system, including the isthmus area, after using PUI or the XP-endo Finisher instrument.

Findings revealed a significant difference in the overall irrigant distribution throughout the root canal system when the XP-endo Finisher instrument was used (73.8% of the canal

Table 1 Final volume of voids (unfilled areas) in the entire canal system or the isthmus area after adjunctive irrigant activation approaches (mean ± standard deviation)

Irrigation methods	Mean volume of voids in the entire root canal system (%)	Mean volume of voids in the isthmus only (%)
Passive ultrasonic irrigation	43.9 a ± 15.1	36.2 a ± 15.4
XP-endo Finisher	26.2 b ± 13.6	34.7 a ± 21.6
Control	46.2 a ± 14.4	45.5 a ± 22.6

Different letters (a, b) denote a significant statistical difference in the final volume of voids. ANOVA test for repeated data with adjustment for multiple comparisons: Bonferroni. Level of significance $p < 0.05$

filled) as compared to PUI (56.1%) and control (53.8%). Previous studies have shown that this finishing instrument also improved canal disinfection [11, 25, 26] and cleaning [24, 29] when used after preparation. These previous satisfactory results may be explained by the present findings, with the XP-endo Finisher instrument increasing the filling and distribution of the irrigant throughout the canal system. The physical characteristics of the instrument, mainly the ability to change its shape under the body temperature and to expand the range of action up to 6 mm from its axis, can help explain the good performance of XP-endo Finisher. As the instrument expands and contracts in the canal, the irrigant solution is significantly agitated and air bubbles are displaced and escape, allowing the irrigant to fill the canal better, including in the apical segment.

Nevertheless, when penetration of the irrigant into the isthmus area was evaluated separately, no significant difference was observed between the three approaches. The mean amount of isthmus area filled by irrigant was 65.3%, 63.8%, and 54.5% for XP-Endo Finisher, PUI, and control, respectively. These findings may help explain the results from previous studies showing low effectiveness in cleaning using PPI [10] and disinfection using PUI and XP-Endo Finisher [11]. Therefore, the flow of irrigant generated during delivery by the needle or agitation by mechanical or ultrasonic means does not seem sufficient to improve penetration and filling of the isthmus area. These findings related to the isthmus area suggest that the better results obtained by the XP-endo Finisher instrument in this study for the entire canal system were mostly observed for the apical main canal.

Even so, the volume of isthmus filled by the irrigant was somewhat higher than expected. In addition to the irrigation/agitation methods and the physicochemical features of the irrigant, other factors are also expected to influence the penetration of the irrigant in the isthmus, including the volume and width of the isthmus area in contact with the main canal (only the former was evaluated in this study), the isthmus content (vital or necrotic tissue, dentinal debris) (probably absent in this study), and the time available for diffusion of the irrigant (very short time in this study).

The isthmus type (II, III, and IV) or volume (< or > 1.5 mm^3) did not influence the penetration of irrigant by the adjunctive irrigation (Table 2). Type I or large isthmuses were however not included in the present study; thus, it is not possible to state that these conditions would have any influence in facilitating the irrigant penetration as it can be inferred from previous studies [22, 30, 31] in which this type of isthmus was used and better cleanliness was obtained. The presence of isthmus in the apical 3 mm of the root favored the penetration of irrigant when PUI was used. The reason for this finding is unknown, but the possibility exists that placement and activation of the tip of the ultrasonically energized file at 1-mm short of the WL generated a more effective fluid dynamic than XP-endo Finisher and PPI in that area.

To be visualized in micro-CT scans, NaOCl was mixed with a radiographic contrast medium (Omnipaque 300).

Fig. 2 3D models of the root canal system of the same specimen after irrigation with different adjunctive agitation methods. Superimposition of pre- and post-irrigation scans showing filling of the canal system with the irrigant solution (in light green) and voids (in dark green). **a** Control. **b** Passive ultrasonic irrigation (PUI). **c** XP-endo Finisher instrument

Table 2 Final volume of voids (unfilled areas) in different types of isthmus (Fan's configuration) after adjunctive irrigant activation approaches (mean ± standard deviation)

Irrigation method	Type of isthmus (% voids ± SD)		
	II	III	IV
Passive ultrasonic irrigation	23.6 ± 10.9	40.9 ± 15.1	36.3 ± 16.5
XP-endo Finisher	29.5 ± 27.8	43.2 ± 19.6	21.7 ± 18.0
Control	44.8 ± 25.5	46.9 ± 21.0	43.2 ± 29.9

Pilot testing showed that the best proportion to be used in micro-CT was 40% NaOCl and 60% OmniPaque. The density, surface tension, and viscosity of the mixture are expected to differ from the NaOCl alone and if these differences affect the irrigant flow and distribution is unknown. Because these conditions were identical for the irrigation regimens tested, comparisons between the different approaches are valid. However, direct extrapolation to the clinical condition should be done with caution.

One of the greatest advantages of the present study was the use of the same specimens for all experimental groups. This was done to standardize the anatomy, which is one of the most difficult variables to deal with. A study [32] compared the cleaning effectiveness of different final irrigation techniques and demonstrated that a single specimen could be reused until at least 8 times without any visible defect in the surface of the canal wall. In the present experiment, each specimen was used only three times (1 per group). An effective four-stage washing approach validated in a pilot test was used to remove all the irrigant from the entire canal system before the next technique was tested. Micro-CT scans were always performed before each new sequence of treatment to confirm the efficacy of the 4-stage washing approach.

Using the same specimens for all groups is an important feature of this model to avoid anatomical influence on the results. However, this approach is not free of biases. For instance, chemical reactions between the mixture irrigant and the root canal can lead to more organic ligands being dissolved over time after consecutive treatments. In addition, some residual irrigant may remain in the canal even not detected by micro-CT, and then after several uses, the cumulative residuals might reach a concentration to be detected. Finally, debris may have accumulated in the canal and be gradually removed along with the successive treatments; it is expected that less debris would remain after the 1st, 2nd, and 3rd sequential irrigation. To circumvent these biases, the sequence of specimen exposure to each irrigant protocol was alternated so that all groups had a similar distribution of specimens being exposed for the same number of times. Thus, each tested approach had the same number of specimens being used for the 1st, 2nd, and 3rd time. Use of artificial teeth [33] or 3D-printed teeth replicas [34] would be interesting to standardize the anatomy, but the challenge is to find or develop a synthetic material with similar physicochemical properties to dentin that would not significantly influence the irrigant behavior.

The root surfaces and the apical foramen were covered with resin to create a closed-ended system and generate the vapor lock effect [35]. In addition, the experimental parameters were standardized and controlled, including the irrigant type, volume, temperature, activation and retention time, irrigation flow, needle type, and depth of needle placement. Finally, the use of micro-CT, a nondestructive analytical method, permitted 3D qualitative and quantitative evaluations of irrigant distribution throughout the canal system.

The irrigant flow inside the root canal system is a dynamic process and should be ideally studied in real time. Micro-CT can only capture a static time. Because of that, micro-CT has not been commonly used to evaluate the behavior of irrigation during preparation procedures. In the present study, only final irrigation was evaluated and micro-CT scans were taken immediately after the irrigation approach to avoid significant interferences in irrigant distribution by diffusion. If any occurred, they were similar to all groups compared.

The main limitation of the current study is its laboratorial nature using extracted teeth. As mentioned above, the isthmus content of tissue may limit or impede the in vivo penetration of irrigants in this area. The high radiation required for micro-CT examinations makes it impossible to assess the in vivo penetration of the irrigant. One might think of using cone beam computed tomography (CBCT), but the need to perform pre- and post-irrigation scans would not be ethically accepted due to the still high radiation used. The quality and resolution of images with micro-CT are extremely superior to those of the CBCT and that is why micro-CT is better for ex vivo evaluations.

Conclusions

The adjunctive irrigation method with the XP-endo Finisher instrument showed better performance when compared to PUI and the control group in promoting distribution of the irrigant throughout the mesial canal system of mandibular molars. A separate analysis of the ability to drive irrigant to the isthmus area revealed no significant difference between the tested methods. No approach could predictably promote complete filling of the canal system with the irrigant. Further studies should be encouraged to determine better ways to improve the distribution of the antibacterial irrigant throughout the root canal system.

Funding This study was supported by grants from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazilian Governmental Institutions.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, RJ, under the number 80826817.6.0000.5284. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent For this type of study, formal consent is not required.

References

1. Siqueira JF Jr, Rôças IN (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod 34:1291–1301 e3. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.028
2. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR (2009) Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. J Endod 35:493–502. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.12.014
3. Huffaker SK, Safavi K, Spangberg LS, Kaufman B (2010) Influence of a passive sonic irrigation system on the elimination of bacteria from root canal systems: a clinical study. J Endod 36:1315–1318. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.024
4. Rôças IN, Provenzano JC, Neves MA, Siqueira JF Jr (2016) Disinfecting effects of rotary instrumentation with either 2.5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine as the main irrigant: a randomized clinical study. J Endod 42:943–947. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.03.019
5. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A (2005) Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and $Ca(OH)_2$. J Endod 31:359–363
6. Weller RN, Niemczyk SP, Kim S (1995) Incidence and position of the canal isthmus. Part 1. Mesiobuccal root of the maxillary first molar. J Endod 21:380–383
7. Mannocci F, Peru M, Sherriff M, Cook R, Pitt Ford TR (2005) The isthmuses of the mesial root of mandibular molars: a micro-computed tomographic study. Int Endod J 38:558–563. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00994.x
8. Harris SP, Bowles WR, Fok A, McClanahan SB (2013) An anatomic investigation of the mandibular first molar using micro-computed tomography. J Endod 39:1374–1378. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.06.034
9. Adcock JM, Sidow SJ, Looney SW, Liu Y, McNally K, Lindsey K, Tay FR (2011) Histologic evaluation of canal and isthmus debridement efficacies of two different irrigant delivery techniques in a closed system. J Endod 37:544–548. https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.006
10. Endal U, Shen Y, Knut A, Gao Y, Haapasalo M (2011) A high-resolution computed tomographic study of changes in root canal isthmus area by instrumentation and root filling. J Endod 37:223–227. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.10.012
11. Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Perez AR, Rocas IN, Versiani MA, Sousa-Neto MD, Provenzano JC, Siqueira JF Jr (2016) Adjunctive steps for disinfection of the mandibular molar root canal system: a correlative bacteriologic, micro-computed tomography, and cryopulverization approach. J Endod 42:1667–1672. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.003
12. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B, Cruz AG (2012) One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. J Endod 38:1040–1052. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.04.010
13. Siqueira JF Jr, Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ (1997) Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. J Endod 23:499–502. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(97)80309-3
14. Senia ES, Marshall FJ, Rosen S (1971) The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 31:96–103
15. Rutala WA, Weber DJ (1997) Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. Clin Microbiol Rev 10:597–610
16. Basrani B, Malkhassian G (2015) Update of endodontic irrigating solutions. In: Basrani B (ed) Endodontic irrigation: chemical disinfection of the root canal system. Springer International Publishing, Switzerland, pp 98–115
17. Siqueira JF Jr, Rôças IN (2011) Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: a quest for predictability. Aust Endod J 37:92–98. https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2011.00334.x
18. Van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR (2007) Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. Int Endod J 40:415–426. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x
19. Ahmad M, Roy RA, Kamarudin AG (1992) Observations of acoustic streaming fields around an oscillating ultrasonic file. Endod Dent Traumatol 8:189–194
20. Spoleti P, Siragusa M, Spoleti MJ (2003) Bacteriological evaluation of passive ultrasonic activation. J Endod 29:12–14. https://doi.org/10.1097/00004770-200301000-00004
21. Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS (2013) Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. J Endod 39:190–194. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.09.014
22. Leoni GB, Versiani MA, Silva-Sousa YT, Bruniera JF, Pecora JD, Sousa-Neto MD (2017) Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. Int Endod J 50:398–406. https://doi.org/10.1111/iej.12630
23. Debelian G, Trope M (2015) Cleaning the third dimension. Endod Prac 8:22–24
24. Ulusoy OI, Savur IG, Alacam T, Celik B (2018) The effectiveness of various irrigation protocols on organic tissue removal from simulated internal resorption defects. Int Endod J 51:1030–1036. https://doi.org/10.1111/iej.12919
25. Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT (2016) Efficacy of 4 irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis. J Endod 42:928–934. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.03.009
26. Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M (2017) In vitro efficacy of XP-endo finisher with 2 different protocols on biofilm removal from apical root canals. J Endod 43:321–325. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.021
27. Versiani MA, De-Deus G, Vera J, Souza E, Steier L, Pecora JD, Sousa-Neto MD (2015) 3D mapping of the irrigated areas of the root canal space using micro-computed tomography. Clin Oral Investig 19:859–866. https://doi.org/10.1007/s00784-014-1311-5
28. Fan B, Pan Y, Gao Y, Fang F, Wu Q, Gutmann JL (2010) Three-dimensional morphologic analysis of isthmuses in the mesial roots of mandibular molars. J Endod 36:1866–1869. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.030
29. Elnaghy AM, Mandorah A, Elsaka SE (2017) Effectiveness of XP-endo finisher, EndoActivator, and file agitation on debris and smear layer removal in curved root canals: a comparative study.

Odontology 105:178–183. https://doi.org/10.1007/s10266-016-0251-8
30. Goodman A, Reader A, Beck M, Melfi R, Meyers W (1985) An in vitro comparison of the efficacy of the step-back technique versus a step-back/ultrasonic technique in human mandibular molars. J Endod 11:249–256. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(85)80180-1
31. Stamos DE, Sadeghi EM, Haasch GC, Gerstein H (1987) An in vitro comparison study to quantitate the debridement ability of hand, sonic, and ultrasonic instrumentation. J Endod 13:434–440. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(87)80061-4
32. Jiang LM, Lak B, Eijsvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LW (2012) Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. J Endod 38:838–841. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.002
33. Bitter K, Gruner D, Wolf O, Schwendicke F (2016) Artificial versus natural teeth for preclinical endodontic training: a randomized controlled trial. J Endod 42:1212–1217. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.020
34. Marending M, Biel P, Attin T, Zehnder M (2016) Comparison of two contemporary rotary systems in a pre-clinical student course setting. Int Endod J 49:591–598. https://doi.org/10.1111/iej.12481
35. Tay FR, Gu LS, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K, Arun SN, Kim J, Looney SW, Pashley DH (2010) Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery. J Endod 36:745–750. https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.11.022

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

View publication stats