
EL ROL DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO EN ENFERMEDAD PERIODONTAL

Publicado en: Scanning Microscopy
Vol. 2, N° 2, 1988 (Pages 1123 -1138)

A. Carrassi*, S. Abati, G. Santarelli

Department of Dentistry and Stomatology
Faculty of Medicine and Surgery
University of Milan, Italy

Responsable de la traducción:
Dr. Iradier Moreira

INTRODUCCION

Las periodenciopatías son una familia de patologías estrechamente correlacionadas con inflamaciones crónicas, caracterizadas por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dentario. Tienen empujes de rápida destrucción, períodos de reparación y a veces remisión prolongada. (128)

La prevalencia de estas enfermedades no se conoce, pero existe información suficiente para afirmar que "es

una de las plagas más comunes de la humanidad" J. Lindhe. Es mayor en los países menos desarrollados (85, 129)

En los últimos años se han hecho investigaciones en microbiología, inmunología, histología, anatomía y patología clínica; esto ha permitido conocer mejor la etiología, patogenia y evolución de la enfermedad. La nueva forma de diagnosticar ha mejorado los tratamientos.

COMENTARIOS GENERALES SOBRE PARADENCIOPATIAS

Se acepta que las bacterias son la causa más importante de la enfermedad. (84, 127)

Tomando como base la clínica, la microbiología y las radiografías, algunos autores identifican cuatro tipos: 1- Periodontitis Prepuberal, 2- Periodontitis Juvenil, 3- Periodontitis rápidamente progresiva y 4- Periodontitis en adultos. (105)

De más de 300 especies de bacterias recientemente reconocidas en la cavidad oral, solamente el 5% se consideran fuertemente asociadas con las paradenciopatías; *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *actinomycetemcomitans* (AA) *Bacteroides gingivalis*, y *Bacteroides intermedius*, son los más sospechosos patógenos en paradenciopatías en adultos (39, 84, 87)

Es generalmente aceptada la hipótesis que considera las paradenciopatías como una infección específica. Sin embargo la placa subgingival asociada con la enfermedad es muy variable y compleja y se deben extremar los cuidados en el muestreo y cultivos de la microbiota. Por otra parte más de la mitad de las bacterias subgingivales no han sido aún bien identificadas.

Existen distintos puntos de vista. (132)

El daño paradencial o la reparación dependen del balance entre la virulencia del parásito y la respuesta del huésped. (76, 126, 46) Los Polimorfonutrófilos (PMNs) son la primer línea de defensa contra la infección bacteriana. Durante los últimos años se ha estudiado con mucho detenimiento la relación entre PMNs y paradenciopatías. (26, 95, 134)

Se ha descubierto recientemente que la Periodontitis prepuberal, (105, 106), la P. juvenil (34, 133) y la P. rápidamente progresiva están frecuentemente asociadas con disfunciones de los PMNs. Muchos tipos de paradenciopatías afectan un número de dientes limitado y avanzan, evolucionan, a empujes de actividad, seguidos por periodos de remisión o reparación. (128) A pesar de la enorme cantidad de información acumulada sobre etiología, patogenia y formas de evolución de las paradenciopatías en los últimos 15 años, el tratamiento de esta enfermedad inflamatoria crónica es prácticamente el mismo que al comienzo de esta centuria. El principal objetivo del tratamiento es la eliminación diaria de la placa dental supra y subgingival. (112) Esto puede ser acabado por raspado y alisado con o sin cirugía paradencial y un estricto programa de cuidados caseros de higiene oral. Aún no existe un tratamiento óptimo.

REPARACION DE MUESTRAS Y PROBLEMAS RELACIONADOS

Las técnicas para estudiar específicamente con MEB (microscopía electrónica de barrido) de los tejidos paradenciales son prácticamente las mismas que las usadas en otros campos de la investigación biológica. Existen

puestas al día disponibles. (11, 15) Se describen también algunos métodos poco comunes de preparación de muestras de interés para aplicar en paradentología. Con estos criterios se pueden estudiar los tejidos duros; hueso alveolar, cemento y cálculos, primero sólo en sus componentes minerales, segundo la sustancia orgánica que cubre las raíces, tercero los componentes celulares del tejido óseo, cuarto los tejidos blandos y quinto el fluido crevicular. (15)

En este trabajo existe una amplia bibliografía, alrededor de 30 citas, referidas a preparación de muestras.

En la Fig. 1 se puede ver el fluido crevicular, deshidratado, con MEB. Con esta técnica se pueden estudiar los componentes de fluido crevicular por ejemplo: leucocitos y analizar microorganismos en la placa supra y subgingival. Una técnica similar puede ser utilizada para estudiar la morfología bacteriana en cultivos puros Fig. 2. (70)

Varias investigaciones con MEB se han hecho para estudiar la composición y distribución de la placa microbiana dental. (27, 30, 33, 60, 67, 98, 113) También se han investigado las superficies naturalmente expuestas.

MEB Y SUPERFICIE INORGANICA DE LA RAZ

Cemento. La MEB posibilitó un conocimiento bastante detallado de la superficie del cemento, como puede verse en la Fig. 3. (10, 17, 64, 65, 75)

Se han identificado lagunas de reabsorción en áreas apicales de dientes jóvenes. Recientemente en investigación con MEB de 10 dientes extraídos de dos pacientes con periodontitis juvenil y periodontitis rápidamente progresiva; se "propuso" que tales lagunas de reabsorción cuando están presentes en dientes con paradenciopatía, son sitios de retención de placa dental subgingival, aún después de raspados y alisados, convirtiéndose así en causas de recidivas. (118) Se ha demostrado que una sola laguna o varias agrupadas, pueden estar presentes en dientes sin paradenciopatía ni caries. (53, 54, 92, 68, 89, 105) Uno de los más interesantes estudios sobre resorción radicular fue hecho en 1951 usando un microscopio luminoso y hematoxilina-eosina, por Weinmann. (55) Sus resultados mostraron que: 1- la resorción radicular (RR) puede ser considerada como un hecho para fisiológico. 2- El número de raíces afectadas estaba relacionado con la edad. 3- El ancho de una única RR es un buen índice de la gravedad de la lesión y 4- las resorciones del cemento se localizan usualmente en el tercio apical de la raíz.

La RR se ha estudiado bastante con MEB, (7, 64, 72) pero no se ha correlacionado con la "cantidad" de paradencio dañado. En un intento de ordenar la prevalencia, la distribución de áreas de resorción y su correlación con ciertos índices tales; de placa, de sangrado y profundidad de bolsa, se estudiaron recientemente 68 dientes extraídos por enfermedad paradencial (EP) y 28 por razones de tratamiento ortodóntico. (Trabajo no publicado de Carrasi y col). Antes del procedimiento quirúrgico se hizo

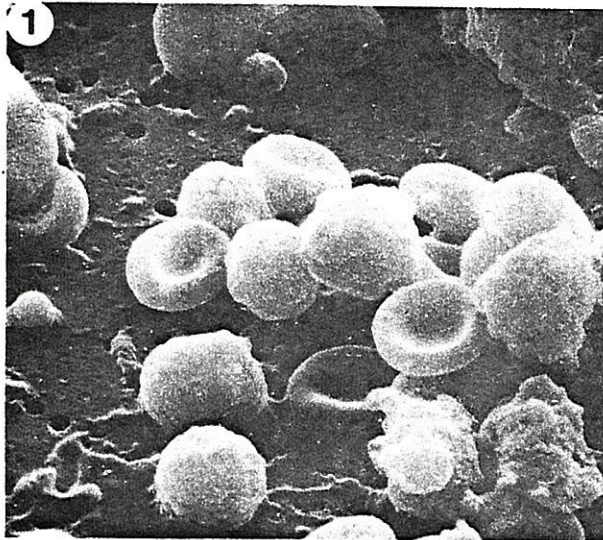


Fig. 1.- Muestra de fluido crevicular por una modificación de la técnica de Skapsky y Lehner. Barra 10 μ m.

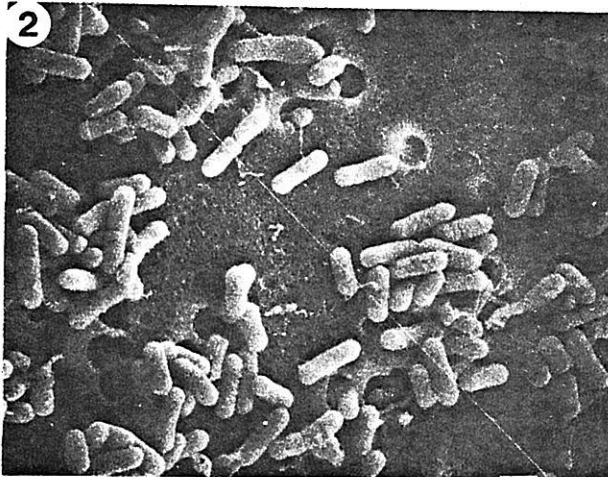


Fig. 2.- MEB. Bacteroides gingivales. Barra 1 μ m

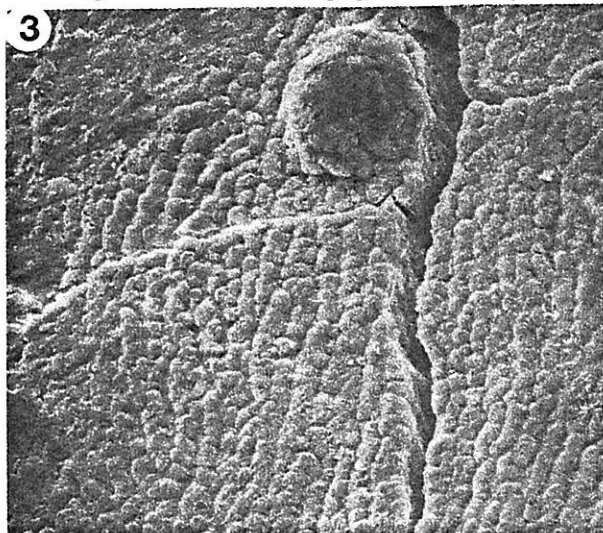


Fig. 3.- Los montoncitos bajos y redondeados son fibras de Sharpey. Un cementículo se ve en la parte superior de la imagen. La grieta de arriba/abajo es un artefacto. Barra 10 μ m.

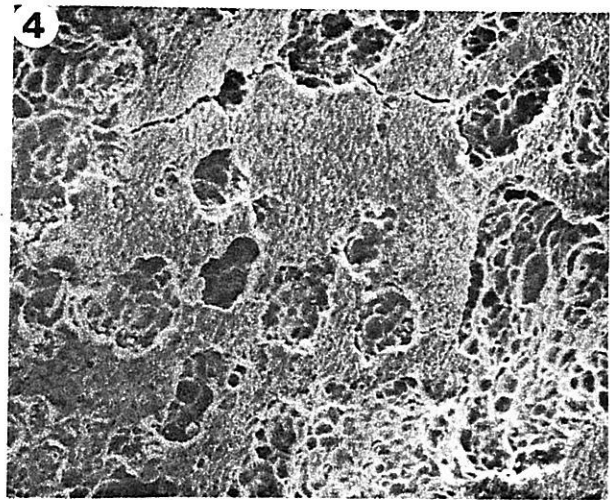


Fig. 4.- Varias lagunas de reabsorción en el tercio apical de dientes extraídos por razones de ortodoncia.

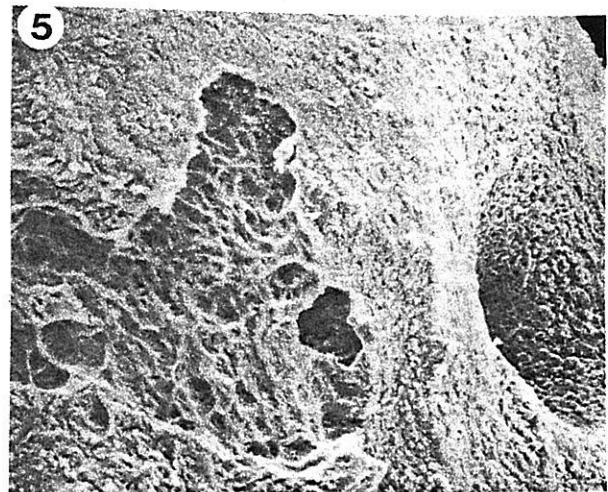


Fig. 5.- Ancha laguna de resorción en área apical de un diente paradencialmente involucrado.

una cuidadosa historia clínica. Los resultados a la MEB mostraron que el número y el ancho de los defectos (RR) estaba significativamente correlacionado con la gravedad de pérdida de adherencia. Las lagunas en dientes sanos son generalmente pequeñas y agrupadas, Fig. 4, mientras que la RR en dientes con el paradencio afectado eran más grandes, profundas y esparcidas. Como se reveló por la muesca hecha anteriormente a la altura de la adherencia las lagunas estaban bajo el tejido adherido y en el tercio apical Fig. 5. Ambos, cemento y dentina, estaban incluidos en la RR Figs. 6 y 7. Una posible explicación a estos hallazgos es que las áreas de RR puedan estar asociadas a función oclusal. El aumento de movilidad dentaria podría deberse a un elevado número de R radiculares.

La morfología típica del cemento puede ser alterada por condiciones tales como Periodontitis Juvenil (PJ). (80) Se estudiaron 4 molares extraídos de cuatro pacientes con PJ; se encontraron extensas áreas de cemento hipoplásico (desarrollo incompleto o defectuoso) con exposición de túbulos dentinarios. Los autores, Carrassi y

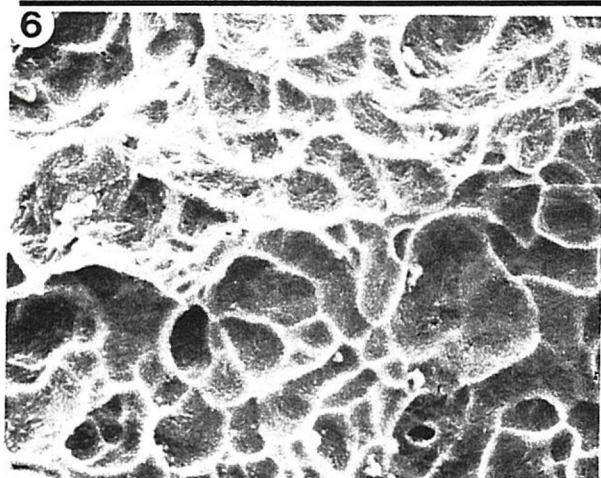


Fig. 6.- Laguna de Howship típica. Resorción sólo en cemento.

col., sugieren que el desarrollo de la enfermedad es iniciada por un trastorno hereditario en la formación de cemento. La MEB es de gran utilidad para el estudio de la superficie cementaria a grandes aumentos.

Los cálculos pueden ser definidos como depósitos calcificados o en calcificación sobre los dientes. Son una placa que ha sido mineralizada.

Se han hecho descripciones a partir de la MEB de la morfología y distribución de los cálculos. (63, 62) Se describieron dos estructuras básicas de mineralización de la placa dental (PD) Figs. 8 y 9. (40, 41, 24)

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO Y PLACA MICROBIANA DENTAL

Se han hecho extensas investigaciones (83, 51, 87, 96, 100, 127, 131) sobre microbiología de PD en salud y enfermedad. Actualmente existe un acuerdo general, que no más de seis a doce bacterias están asociadas con EP. (97, 127) Sin embargo, a pesar de la aplastante evidencia de la fuerte asociación entre ciertas bacterias y la EP, falta, aún, la prueba definitiva que compruebe lo antedicho.

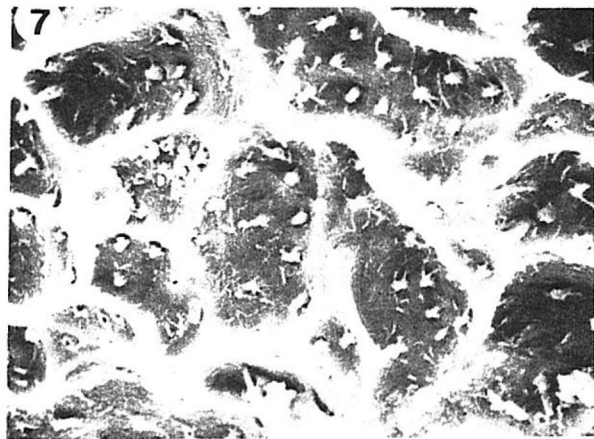


Fig. 7.- En este caso la resorción llega a dentina. Se ven claramente los túbulos dentinarios.

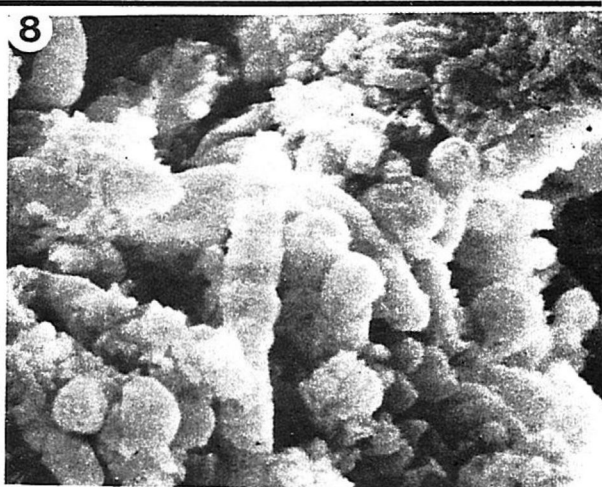


Fig. 8.- Cálculos sobre raíz. La matriz microbiana está calcificada mostrando cocos y bacilos.

Las investigaciones sobre estructura y composición de la PD fue publicada ya en 1971/72. (60) Se reveló sobre la raíz dental una heterogénea distribución de bacterias cocoides y filamentosas. (61) Fig. 10

Recientemente la morfología de la P. subgingival en el síndrome de Papillon-Lefevre (67), PJ, (33), periodontitis crónica en adultos (98) y periodontitis rápidamente progresiva (27,30), se han investigado con MEB). Como resultado de estas investigaciones se ha comprobado la alta organización microbiana sobre la raíz dental. En la parte superior (superficial) y media, cocos y filamentos son las bacterias más frecuentemente identificadas. Los cocos a menudo muestran la bien conocida forma de "marlo", choclo sin grano (corncob). La PD colocada más apicalmente, donde teóricamente causa más daño, ha sido descrita como formada principalmente, por pequeñas y medianas espiroquetas y por bacilos rectos y curvos. Fig. 11

Ocasionalmente a la MEB se han visto "microcolonias" bacterianas. El pequeño tamaño de los microorganismos sugiere que ellos puedan ser especies de género micoplasma. (25) Se ha propuesto el término "bacterias Pioneras" para los microorganismos localizados más apicalmente en la P. subgingival. (113) Ellas son bacilos y espiroquetas. Fig. 12 Un hecho que llama la atención es la ausencia de cocoides en el tercio apical de la P. subgingival. Se podría explicar por el conocido antagonismo entre algunos cocos y ciertos bacilos considerados patógenos paradanciales. (56) Los cocos juegan un rol de pivot en la colonización de las superficies radicales por la PD. (135)

La fase precoz de colonización microbiana en cemento humano "in vivo" ha sido estudiada recientemente. (1) En la Fig. 13 se ven resultados: una fina película cubre el cemento después de 2 hs. y se encuentran algunos microorganismos. Después de 8/24 hs. existe una matriz amorfa con una densa capa de cocoides. Después de 8 hs. se vieron filamentos insertados perpendicularmente dentro de la PD, y más comúnmente, a las 24 hs. Fig. 14. La colonización bacteriana inicial es un proceso selectivo, mediada por una película orgánica que incluye principalmente pululación cocoide.

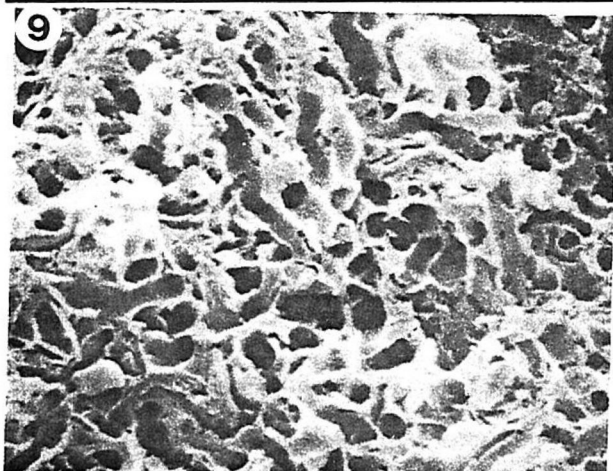


Fig. 9.- Matriz calcificada extrabacterial. Se ven sombras de cocos y bacilos. Barras 10 μ m (Figs. 4-7); y 1 μ m (figs. 8 y 9)

Hay dos importantes limitaciones para la MEB en la investigación de la P. subgingival: es imposible diferenciar las bacterias muertas de las vivas y los microorganismos pueden ser clasificados sólo morfológicamente.

MEB EN PARED DE BOLSA GINGIVAL

En general, se acepta que en ciertos casos el tejido gingival pueda ser invadido, interiormente, por bacterias. Esto fue demostrado (82) en estudio de MEB en gingivitis necrotizante (GN) y a continuación (47) sobre PJ y en periodontitis avanzada. (44) Los microorganismos invasores son morfológicamente heterogéneos y principalmente Gram negativos, incluyendo formas de cocos, bacilos, filamentos y espiroquetas. Recientemente se han visto levaduras en PJ. (49)

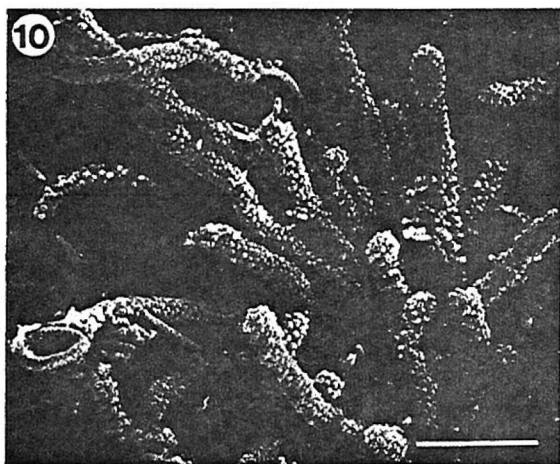


Fig. 10.- Bacterias en superficie de raíz. Corn-cob. Forma de "choclo". Barra 10 μ m

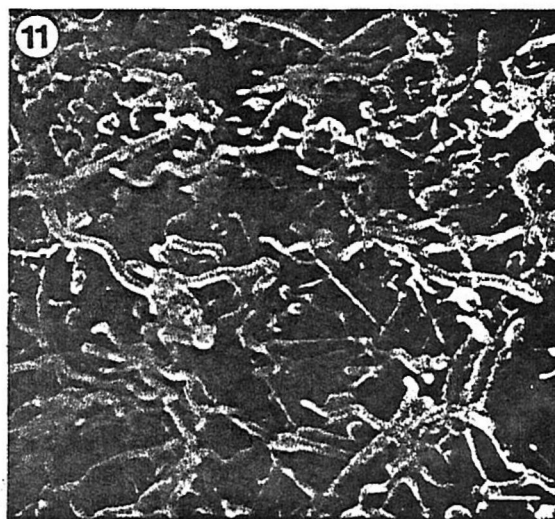


Fig. 11.- Placa subgingival en su porción más apical en periodontitis rápidamente progresiva. Barra 1 μ m.

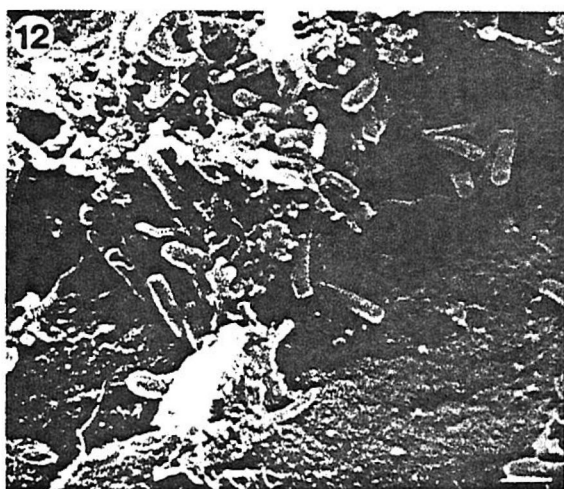


Fig. 12. Bacterias "pioneras" en el frente de avance de la placa. Los microorganismos son similares a los descritos como bacteroides genus. Barra 1 μ m.

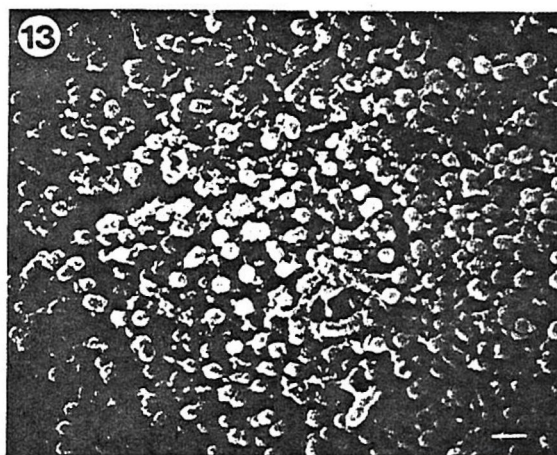


Fig. 13.- Colonización en placa experimental, 24 hs. Filamentos y bacilos largos insertados perpendicularmente en la placa. Barra 1 μ m

Se ha usado la MEB para describir la pared de la bolsa gingival y detectar bacterias dentro del tejido. (115, 116) Se evidenció invasión microbiana en la PJ localizada (25) y en paradentitis avanzada. En cinco de ocho casos de P. avanzada se encontraron bacterias dentro del epitelio, en uno de los cinco casos las bacterias alcanzaron el tejido conjuntivo. Varios morfotipos bacterianos fueron identificados dentro de agrandados espacios intracelulares de la superficie epitelial de las bolsas: cocos, bacilos cortos, filamentos y espiroquetas. (116) En un caso de PJ las bacterias invasoras fueron principalmente Gram negativas, fusiformes, cocobacilos y espiroquetas. (25) Los microorganismos parecen haber invadido el epitelio y conjuntivo subyacente alcanzando la superficie ósea.

Microbios identificados como micoplasmas fueron también encontrados en algunas áreas. (25) Muchas publicaciones opinan que la presencia de microbios en los tejidos pueda ser una introducción artificial (9, 48, 137) pero parecería aceptable que la penetración microbiana sea un hecho. En la paradentitis rápidamente progresiva y en la avanzada se han visualizado bien por MEB la morfología de las paredes de bolsas. (114, 115, 32) Se han descrito muchos cuadros morfológicos, (116) áreas con descamación epitelial, con interacciones bacterioleucocitarias, con leucocitos emergentes, con acumulaciones microbianas y áreas con ulceraciones. La periodontitis de evolución rápida (rápidamente progresiva) es un cuadro clínico raro que se caracteriza principalmente por un daño grave y difuso que comienza entre la pubertad y los 30 años, donde, es muy frecuente una disfunción leucocitaria, neutrófilos y monocitos. (104) La morfología de la pared de las bolsas gingivales fue investigada por MEB y MET (de transmisión). (32) Se seleccionaron 4 pacientes no tratados, 17 a 32 años; promedio 22,4, con paradentitis de evolución rápida. Se estudiaron biopsias de cada uno con MEB y MET.

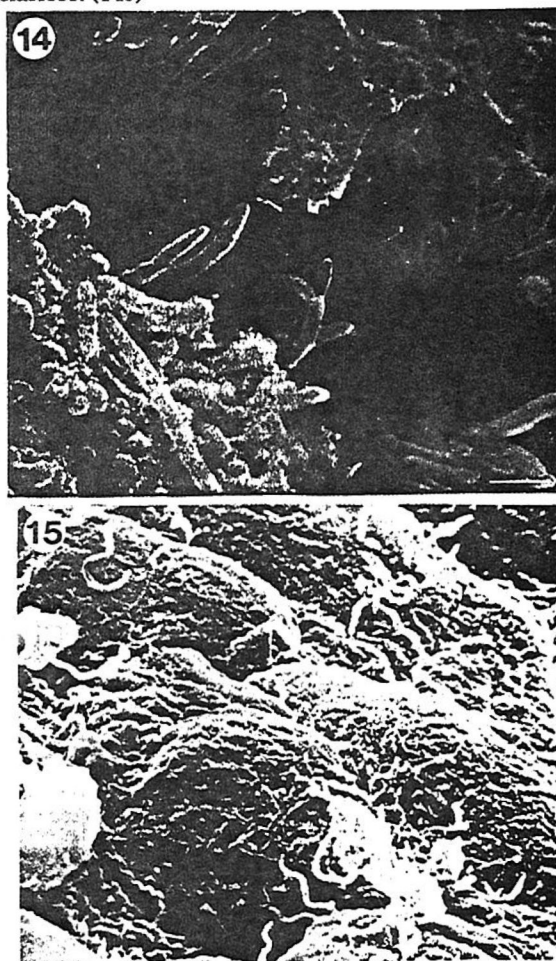
MET no evidenció material invasivo, pero con MEB ocasionalmente se documentó la penetración de espiroquetas dentro de la superficie epitelial. Figs. 15 y 16. Áreas de exocitosis (fusión de lisosomas con membrana citoplasmática del fagocito, (Pumarola 1984 pág. 191) fueron evidentes en las muestras examinadas con MEB. Se ven a menudo espiroquetas en contacto por una punta con neutrófilos. (32) Figs. 17 y 18.

El concepto de episodios patógenos repetidos de invasión microbiana en los tejidos es atractivo para explicar la naturaleza episódica (a empujes) de paradenciopatías. Con la posible excepción de la GN y la PJ no hay todavía evidencia confiable de que ello sea cierto.

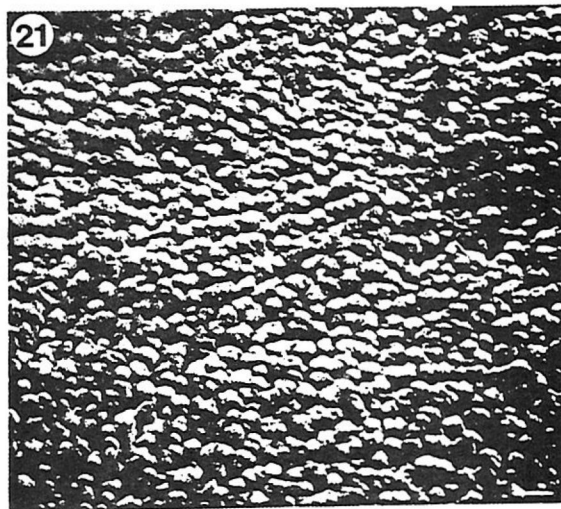
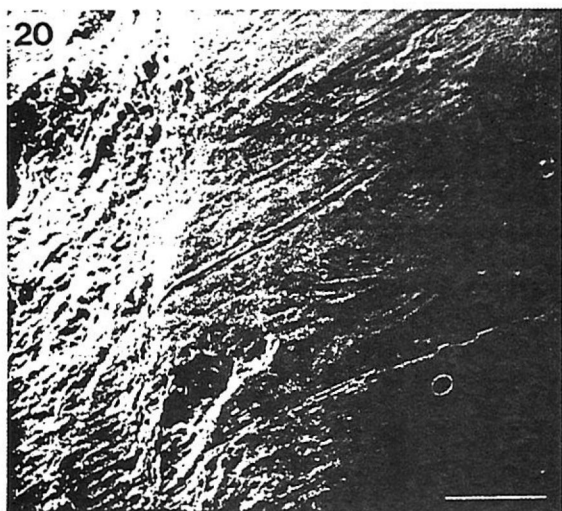
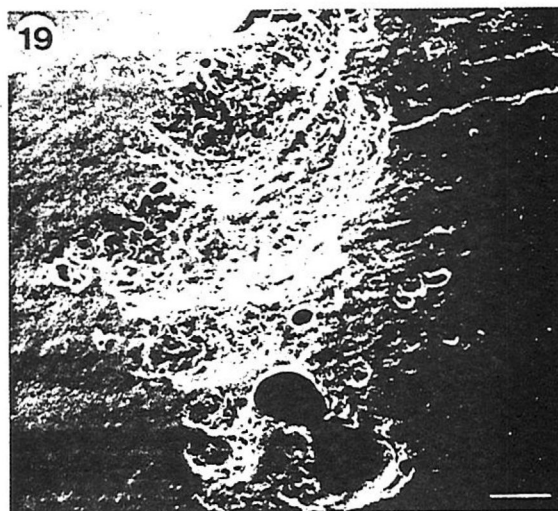
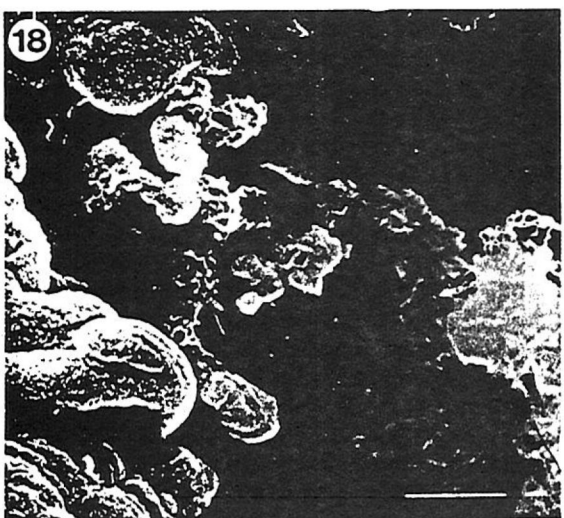
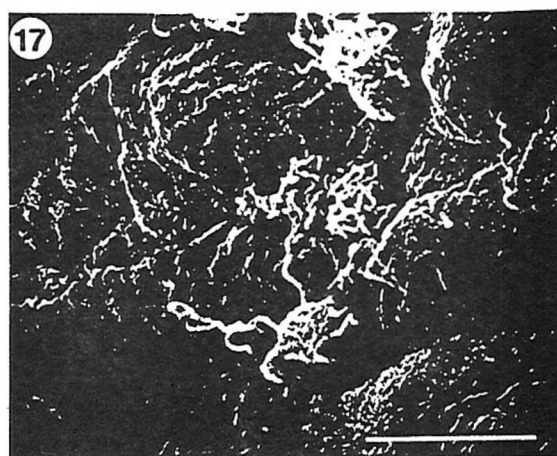
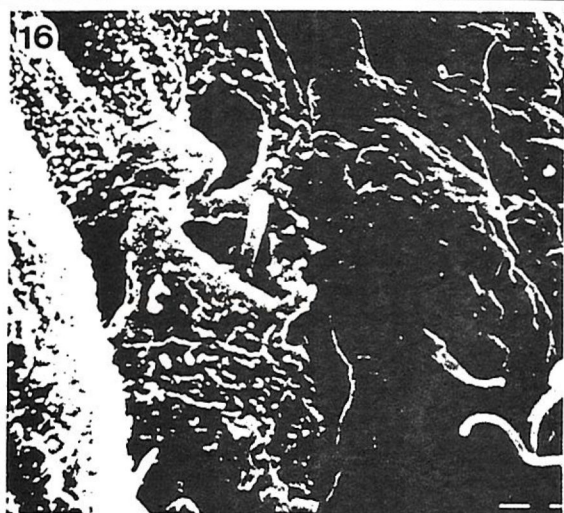
MEB E INSTRUMENTACION RADICULAR

La instrumentación radicular que remueve placa y cálculos es la más importante fase del tratamiento paradencial. (79) Sobre el tema, estudiado con MEB existe abundante bibliografía. (4, 31, 37, 38, 42, 43, 45, 66, 74, 78, 94, 108, 111, 139, 140) La mayoría en esta década. Se ha puesto el acento en la eliminación de la placa y cálculos con distintos tipos de instrumentos y técnicas y se exami-

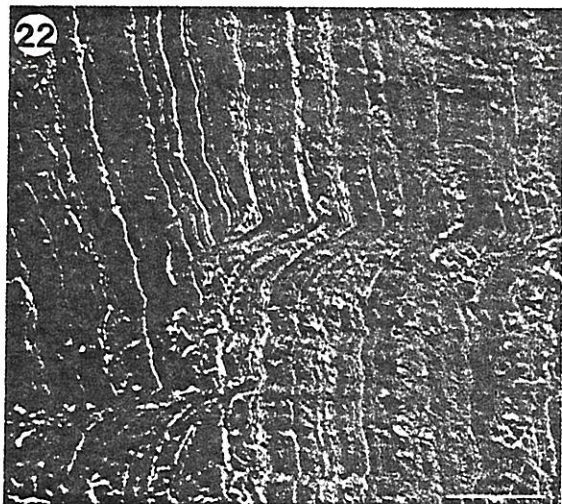
nó el grado de tejidos dañados y/o el cambio producido por el tratamiento. Ni manual ni ultrasónicamente se ha podido eliminar totalmente la PD y los cálculos. (31, 66, 108) En suma no se han encontrado diferencias significativas entre los distintos métodos e instrumentos para eliminar depósitos blandos y duros. Se ha comunicado que los instrumentos de mano remueven más superficie radicular y ésta queda más lisa que con los instrumentos ultrasónicos (IU). (108) Se notaron diferencias significativas de la topografía radicular según el tipo de "raspador" y el número de "pasadas", "golpes", usados. (42) Con puntas ultrasónicas afiladas se encontró que la superficie radicular queda más suave, lisa, que con las mismas puntas ultrasónicas embotadas. (4) Se han propuesto instrumentos rotatorios de diamante, que se describen como capaces de eliminar totalmente los cálculos. (78, 94) Existen evidencias que el ultrasonido es mejor en dientes anteriores, pero no presentan ventaja sobre instrumentos de mano en molares. Se ha probado un nuevo aparato ultrasónico pero no tiene ventaja sobre los clásicos. (140)



Figs. 15/18.- Pared de bolsa en periodontitis rápidamente progresiva. Espiroquetas dentro de un epitelio ulcerado Fig. 15; y enteramente dentro del espacio intercelular. Fig. 16. Fig. 17. varios PMNs sobre la superficie gingival. Uno de estos está fagocitando 2 espiroquetas. Fig. 18 Exocitosis leucocitaria de una úlcera epitelial ancha. Barras 1 μ m (Figs. 15, 16); y 10 μ m (Fig. 17, 18)



Figs. 19/22.- Técnica réplica (duplicada) Fig. 19, 20 antes y después del tratamiento ultrasónico y Fig. 21, 22 después del tratamiento con instrumentos de mano. Barras 10 μ m, sobre cada figura.



Por mucho tiempo se ha considerado que el tratamiento paradencial logra nueva inserción cuando es exitoso. Esto no parece probable sobre superficies radiculares enfermas (que fueron pared de bolsa patológica) las cuales inhiben in vitro la inserción de los fibroblastos, probablemente como resultado de la adsorción de endotoxinas. (2, 3) Recientemente se ha demostrado en humanos que el alisamiento radicular puede remover el material citotóxico adherido, dejando la superficie radicular similar a la de un diente sano (99), permitiendo de este modo una adherencia del nuevo tejido conjuntivo a la raíz. Varias investigaciones con MEB se han hecho conducentes a la llamada "preparación biológica" de raíces enfermas para detectar un tratamiento químico capaz de exponer la matriz colágena del cemento libre de toxinas. (74, 111, 139) Topificaciones con ácido cítrico se han hecho en humanos (945), en monos (111), sobre raíces sanas y enfermas, no tratadas y tratadas. Se aplicó ácido cítrico pH1, sobre raíces alisadas, durante tres minutos y se encontró que era capaz de remover la capa superficial "barro" producida durante la instrumentación, y exponer los orificios de los túbulos dentinarios y zonas intertubulares con fibrillas de morfología similar a un "emparrillado, esterilla". Hialuronidasa y elastasa, después del grabado con ácido cítrico parece resultar más efectivo para exponer la matriz colágena del cemento. (37) Se ha estudiado EDTA y otros. (74, 43) Sin embargo el valor de la creación de una nueva adherencia entre el tejido conjuntivo y la superficie radicular es aún controversial. De hecho la adherencia epitelial no representa un lugar de menor resistencia (90) y una reabsorción radicular puede seguir a un nuevo tejido conectivo adherido. (68)

En las Figs. 19 a 22 los autores, Carrassi y col. en una investigación clínica demuestran que el alisamiento radicular y eliminación de cálculos con instrumentos de mano y ultrasónicos es igualmente eficiente. La limpieza acabada no es total con ninguno de los instrumentos, pero las curetas causan más daño (rayaduras) que el ultrasonido. Desde que los resultados obtenidos con instrumentos de mano o ultrasónicos son similares, ellos dicen, que es razonable, desde el punto de vista costo/beneficio sugerir que se prefieran aparatos ultrasónicos.

MEB: OTRAS CONTRIBUCIONES EN INVESTIGACION PARADENCIAL

A pesar de la gran prevalencia de la enfermedad paradencial muchos aspectos básicos estructurales del aparato de soporte dentario no son claros.

Se ha sugerido un plexo intermedio. (120, 121) Se ha comprendido mejor la morfología del ligamento paradencial (124, 130) en el hombre y otros mamíferos. Alguen (125) piensa que el plexo intermedio sea un artefacto del método de preparación. La red vascular ha sido bien estudiada con MEB. (59) Los cambios vasculares y celulares del periodonto se han estudiado en ratas post tratamiento ortodóntico. (81)

Se ha estudiado la interfase epitelio/conjuntivo en el hombre. (69, 103) Se han identificado tres regiones del epitelio/conjuntivo con distintas características: piso de boca, labios y mejillas, encía y paladar duro. Más investigaciones con MEB se han hecho para estudiar la morfología del estrato córneo de la mucosa oral (35, 36, 71, 93) e inclusive especificidad microbiana relacionada con queratinización en lengua de monos. (5)

Se ha informado sobre morfología de varios de los más sospechosos paradenciopatógenos, tales: fusobacteria (21), AA (57), bacteroides (70) y capnositófagos (110). Se ha propuesto un método para encontrar las diferencias entre microbios adhesivos e invasores en cultivos celulares. (23)

Actualmente se consideran a las espiroquetas, posibles patógenos paradenciales. (86) In vitro se han visto interacciones entre treponema denticola, neutrófilos y células epiteliales en humanos (101, 102). Otra investigación de distintos materiales, tal; vidrio (58, 138), hidroxiapatita (77) se han hecho para estudiar la placa sobre ellos. Estas investigaciones han demostrado que la especificidad de colonización de la placa depende del substracto considerado. La colonización es también alterada por sustancias químicas, tal clorhexidina entre otros. (141)

REFERENCIAS

1. ABATI S, SORAGNA I, SANTARELLI G, REPOSSI F, CARRASSI A (1987). Early phases of bacterial colonization on human cementum. *J. Dent Res* 66:228 Abs., 974.
2. ALEO JU, DE RENZIS FA, FARBER PA (1975). In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surface. *J. Periodontol* 46:639-644.
3. ALEO JU, DE RENZIS FA, FARBER PA, Varconcoer AP (1974). The presence of biologic activity of cementum-bound endotoxin. *J. Periodontol* 45:672-679.
4. ATKINSON DR, COBB CM, KILLOY WJ (1984). The effect of an AIR-Power Abrasive System on in vitro root surfaces. *J. Periodontol* 55:13-18.
5. AUDEMORTE TB, CAMERON IL (1981). The relation of keratinization to bacterial colonization on the Baboon tongue as demonstrated by scanning electron microscopy. *J. Dent Res* 60:1008-1013.
6. BARNES IE (1979). Replication techniques for the scanning electron microscope. 2. Clinical and laboratory procedures: Interpretation. *J. Dent* 7:25-37.
7. BERCY P, FRANK R-M (1980). Microscopie electronique a balayage de la surface du ciment humain dans diverses conditions physiologiques et pathologiques. *Jour Biol Buccale* 8:353-373.
8. BERTHOLD P (1979). Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. *J. Periodontol* 50:397-405.
9. BIBBY BG (1953). The role of bacteria in periodontal disease. *Oral Surg.* 6:318-324.
10. BOYDE A. (1970). The contribution of the scanning electron microscope to Dental Histology. *Apex* 4:15-21.
11. BOYDE A (1972). Biological specimen preparation for the scanning electron microscope - an overview. *Scanning Electron Microsc.* 1972:257-264.
12. BOYDE A (1974). Freezing, freeze-fracturing and freeze-drying in biological specimen preparation for SEM. *Scanning Electron Microsc.* 1974: 1043-1046.
13. BOYDE A (1976). Do's and don't in biological specimen preparation for the SEM. *Scanning Electron Microsc.* 1976:683-687.
14. BOYDE A. (1980). Review of basic preparation techniques for biological scanning electron microscopy. *Electron Microscopy* 2:768-777.
15. BOYDE A (1984). Methodology of calcified tissue specimen preparation for scanning electron microscopy. In: *Methods of Calcified Tissue Preparation*, GR Dikson (ed.) Elsevier, Amsterdam, 251-307.
16. BOYDE A, BAILEY E, JONES SJ, TAMARIN A (1977). Dimensional changes during specimen preparation for scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microsc.* 1977; 1:507-518.
17. BOYDE A, JONES SJ (1968). Scanning electron microscopy of cementum and Sharpey fibre bone. *Z. Zellforsch* 92:536-548.
18. BOYDE A, JONES SJ (1983) Back scattered imaging of dental tissues. *Anat Embryol* 168:211-226.
19. BOYDE A, MACONACHIE E (1979). Volume changes during preparation of mouse embryonic tissue for scanning electron microscopy. *Scanning* 2:149-163.
20. BOYDE A, REID SA, POOLE S, MAROUDAS N, CARRASSI A (1983). A new method of image formation using cathodoluminescence in the SEM: CL adsorption by superficial stain. *Histochemistry* 78:285-288.
21. BOYDE A, WILLIAMS RAD (1971). Estimation of the volumes of bacterial cells by scanning electron microscopy. *Archs Oral Biol.* 16:259-267.
22. BROMAGE TG (1985). Systematic inquiry in tests of negative: positive tests replica combinations techniques for SEM *J Microscopy* 137:209-216.

23. BUKHOLM G, JOHANSEN BV, NAMORK E (1984). A method differentiating between bacterial adhesiveness and invasiveness in cell culture monolayer. *J Microscopy* 133:79-81.
24. CANIS MF, KRAMER GM, PAMEIJER CH (1979). Calculus attachment. *J Periodontol* 50:406-415.
25. CARRANZA JR. FA, SAGLIER, NEWMAN MC, VALENTIN PL (1983): Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-invading microorganism in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 54:589-617.
26. CARRASI A (1986). Granulociti neutrofili e malattie parodontali (Polymorphonuclear neutrophil and periodontal disease). *Mondo Odontostomatologico* 2:43-55.
27. CARRASI A (1986). The morphology of subgingival plaque in rapidly progressive periodontitis. In: *The Borderland between Caries and Periodontal Disease III*, Lehener T, Cimasoni G (eds.), Editions Medicien et Hygiene, Geneve, 376-382.
28. CARRASI A, ABATIS, (1984). La tecnica della replica in microscopia elettronica a scansione: possibilità applicative in campo biologico (Replica technique for the scanning electron microscope. A test of different materials and methods). Studio comparativo di differenti materiali e metodologie. *Mondo Odontostomatologico* 4:11-23.
29. CARRASI A, ABAT S (1985). Le tecniche di preparazione dei tessuti dentari per lo studio al microscopio elettronico a scansione (Dental specimen preparation for the scanning electron microscope). *Odontoiatria Oggi* (2): 31-41.
30. CARRASI A, SANTARELLI G, ABATIS (1985). Morfologia del fronte di avanzamento della placca batterica in un gruppo di pazienti affetti da parodontite rapidamente progressiva (Study of the most apically located plaque in a group of patients with rapidly progressive periodontitis). *Mondo Odontostomatologico* 4:13-22.
31. CARRASI A, SANTARELLI G, CAPPELLETTI G (1986). La preparazione della superficie radicolare. Morfologia e grado di ruosità residue alla strumentazione (Root surface preparation. Morphology and roughness as related to periodontal instrumentation). *Mondo Odontostomatologico* 5:37-50.
32. CARRASI A, SORAGNA I, SANTARELLI G, ABATIS (1985). Ultrastruttura della parete molle della tasca parodontale e chemiotassi dei granulociti (Ultrastructural features of pocket wall and neutrophil chemotaxis in rapidly progressive periodontitis). *Mondo Odontostomatologico* 5:37-49.
33. CARRASI A, WEINSTEIN R, VOGEL G (1983). Studio con il microscopio elettronico a scansione giovanile (The morphology of subgingival plaque in a case of juvenile periodontitis. A scanning electron microscopy investigation.) *Mondo Odontostomatologico* 6:9-17.
34. CIANCIOLO LJ, GENCO RJ, PATTERSON M, MCKENNA J, VAN OSS CJ (1977). Defective polymorphonuclear leukocyte function in human periodontal disease. *Nature* 265:445-447.
35. CLEATON-JONES P, BUSKIN SA, VOCHANSKY A (1978). Surface ultrastructure of human gingiva. *J Periodontal Res* 13:367-371.
36. CLEATON-JONES P, FLEISH L (1973). A comparative study of the surface of keratinized and nonkeratinized oral epithelia. *J Periodontal Res* 8:366-370.
37. DARYABEGI P, PAMEIJER CH, RUBEN MP (1981). Topography of root surface treated in vitro with citric acid, elastase and hyaluronidase. *J Periodontol* 52:736-741.
38. D'SILVA V, NAYAK RP, CHERIAN KM, MULKY MJ (1979). An evaluation of the root topography following periodontal instrumentation. A scanning electron microscopy study. *J Periodontol* 50:283-290.
39. DZINK JL, TANNER ACR, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS (1985). Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 12:648-659.
40. EIDE B, LIE T, SELVING KA (1983). Surface coatings on dental cementum incident to periodontal disease. I. A Scanning electron microscopic study. *J Clin Periodontol* 10:157-171.
41. EIDE B, LIE T, SELVING KA (1983). Surface coatings on dental cementum incident to periodontal disease. II. Scanning electron microscopic confirmation of a mineralized cuticle. *J Clin Periodontol* 11:567-575.
42. EWEN SJ, GWINNET AJ, (1977). A scanning electron microscopy study of teeth following periodontal instrumentation. *J Periodontol* 48:92-97.
43. FERNYHOUGH W, PAGE RC (1983). Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and in diseased tooth roots. *J Periodontol* 54:133-140.
44. FRANK RM (1980). Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J Periodont Res* 15:563-573.

45. GARRET, J.S., GRIGGER, M., EGELBERG, J. (1978). Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodontal REs* 13:155-163.
46. GENCO R.J., SLOTS J. (1984). Host responses in periodontal diseases. *J Dent Res* 63:441-451.
47. GILLET R, JOHNSON, N.W. (1982). Bacterial invasion of the periodontium in a case of juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 9: 93-100.
48. GIPSON W.A., SHANNON, I. (1964). Microorganisms in human gingival tissues. *Periodontics* 2:119-126.
49. GONZALEZ, S., LOBOS, I., GUAJARDO, A., CELIS, A., ZEMELMAN, R., SMITH, C.T., SAGLIE, F.R. (1987). Yeasts in juvenile periodontitis, *J Periodontol* 58:119-124.
50. GORDON, K.D. (1984). Pitting and bubbling artifacts in surface replicas made with silicone elastomers. *J Microsc* 134:183-188.
51. GREENSTEIN, G., POLSON, A. (1985). Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal diseases. A review. *J Periodontal* 56: 740-747.
52. GRUNDY, J.R. (1971). An intra-oral replica technique for use with the scanning electron microscope study. *Brit Dent J* 130:113-117.
53. HARRY, M.R., SIMS, M.R. (1982). Root resorption in cuspid intrusion. A scanning electron microscope study. *Angle Orthodont* 52:235-241.
54. HARVAY, B.L.C., ZANDE, R.H.A. (1959). Root surface resorption of periodontally diseased teeth. *Oral Surg.* 12:1439-1443.
55. HENRY, J.L., WEINMANN, J.P. (1951). The pattern of resorption and repair of human cementum. *J Dent Assn.* 42:270-278.
56. HILLMAN, J.D., SOCRANSKY, S.S., SHIVER, S.M. (1985). The relationship between Streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Archs Oral Biol* 30:791-795.
57. HOT, S.C., TANNER, A.C.R., SOCRANSKY, S.S. (1980). Morphology and ultrastructure of oral strains of *Acinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Infect Immun* 30:588-600.
58. IMFELD, T., (1983). Scanning electron microscopy of plaque colonization on indwelling glass electrodes. *Caries REs* 17:461-465.
59. IWAKU, F., OZAWA, H., (1979). Blood supply of the rat periodontal space during amelogenesis as studied by the injection technique replica SEM method. *Arch histol jap* 42:81-88.
60. JONES, S.J., (1971). Natural plaque on tooth surfaces: a scanning electron microscopy study. *Apex* 5:93-98.
61. JONES, S.J., (1972). A special relationships between spherical and filamentous microorganisms in mature human dental plaque. *Archs Oral Biol* 17:613-615.
62. JONES, S.J., (1972). Calculus on human teeth. *Apex* 6:42-46.
63. JONES, S.J., (1972). Morphology of calculus formation of the human tooth surface. *Proc Roy Soc Med* 65:29-31.
64. JONES, S.J., BOYDE, A., (1972). A study of human root cementum surfaces as prepared for and examined in the scanning electron microscope. *Z Zellforsch* 130:318-337.
65. JONE, S.J., BOYDE, A., (1974). Coronal cementogenesis in the horse. *Archs Oral Biol* 19:605-614.
66. JONES, S.J., LOZDAN, J., BOYDE, A., (1972). Tooth surfaces treated in situ with periodontal instruments. *Brit Dent J* 132:57-64.
67. JUNG, J., CARRANZA, J.R., F.A., NEWMAN, M.G., (1981). Scanning electron microscopy of plaque in Papillon-Lefevre Syndrome, *J Periodontol* 52:442-446.
68. KARRING, T., NYMAN S., LINDHE, J., SIRIRA, T.M., (1984). Potentials for root resorption during periodontal healing. *J Clin Periodontol* 11:41-52.
69. KLEIN-SZANTO, A.J.P., SCHOROEDER, H.E., (1977). Architecture and density of the connective tissue papillae of the human oral mucosa. *J Anat* 123:93-109.
70. KORNMAN, K.S., HOLT, S.C., (1981). Physiological and ultrastructural characterization of a new *Bacteroides* species (*Bacteroides capillus*) isolated from severe localized periodontitis. *J Periodont Res* 16:542-555.

71. KULLA-MILLONEN, A., (1986). Scanning electron microscopic study of surface of human oral mucosa. *Scand J Dent Res* 94: 50-56.
72. KVAM, E., (1977). Scanning electron microscopy of tissue changes on the pressure surface of human premolars following tooth movement. *Scand J Dent Res* 80:375-378.
73. LAMBRECHTS, P., VAN STEENBERGHE, D., VANHERLE, G., (1982). A new in vivo replica technique for scanning electron microscope study of dental plaque morphology. *J Clin Periodontol* 9:252-256.
74. LASHO, D.J., O'LEARY, T.J., KAFRAW, Y.A.H., (1983). A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. *J Periodontol* 54:210-219.
75. LESTER, K.S., BOYDE A., (1970). Scanning electron microscopy of developing roots of molar teeth of the laboratory rat. *J Ultrastruct Res* 33:80-94.
76. LEVINE, M., (1984). Mediators of bacterial virulence in chronic adult periodontitis. *J Periodont Res* 19:578-582.
77. LIE, T., (1977). Early dental plaque morphogenesis. A scanning electron microscope study using the hydroxyapatite splint model and a low-sucrose diet. *J Periodont Res* 12:73-79.
78. LIE, T., MEYER, K., (1977). Calculus removal and loss of tooth substance in response to different periodontal instruments. *J Clin Periodontol* 4:250-262.
79. LINDHE, J., WESTFELT, E., NYMAN, S., SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., (1984). Long-term effect of surgical/nonsurgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 11:448-458.
80. LINDSKOG, S., BOMLOF, L., (1983). Cementum hypoplasia in teeth affected by juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 10:443-451.
81. LINDSKOG, S., LILJA, E., (1984). Scanning electron microscopic study of orthodontically induced injuries to the periodontal membrane. *Scand J Dent Res* 92:334-343.
82. LISTGARTEN, M.A., (1965). Electron microscopic observations on the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 36:328-339.
83. LISTGARTEN, M.A., (1976). Structure of surface coatings on teeth. A review. *J Periodontol* 47:139-147.
84. LISTGARTEN, M.A., (1986). Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13:418-425.
85. LOE, H., ANERUD, A., BOYSEN, H., MORRISON E., (1986). Natural history of periodontal disease in man. *J Clin Periodont* 13:431-440.
86. LOESCHE, W.J., LAUGHON, BE., (1982). Role of spirochetes in periodontal disease. In: *Host-Parasite Interactions in Periodontal Disease*, RJ Genco, SE Mergenhausen (eds.), American Society for Microbiology, Washington DC, 62-75.
87. LOESCHE, W.J., SYED, S.A., SCHMIDT, E., MORRISON, E.C., (1985). Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontal diseases. *J Periodontol* 56:447-456.
88. MACCHIARELLI G, MOTTA, P.M., (1986). The three-dimensional microstructure of the liver. A review by scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microsc* 1986; III:1019-1038.
89. MAGNUSSON, I., CLAFFEY, N., BLGLE, G., GARRETT, S., EGELBERG, J., (1985). Root resorption following periodontal flap procedures in monkeys. *J Periodont Res* 20:79-85.
90. MAGNUSSON, I., RUNSTAD, L., NYMAN S., LINDHE, J., (1983). A long junctional epithelium a locus minoris resistentiae in plaque infection. *J Clin Periodontol* 10:333-340.
91. MNADEL, I.D., GAFFAR A, (1986). Calculus revisited. A review. *J Clin Periodontol* 13:249-257.
92. MASSLER, M., MALONE, A.J., (1954). Root resorption in human permanent teeth. A roentgenographic study. *Amer J Orthodont* 40:619-625.
93. MCMILLAN, M.D., (1980). Transmission and scanning electron microscope studies on the surface coat of the oral mucosa in the rat. *J Periodontal Res* 15:288-296.
94. MEYER, K., LIE, T., (1977). Root surface roughness in response to periodontal instrumentation studied by combined use of microroughness measurements and scanning electron microscopy. *J Clin Periodontol* 4:77-91.
95. MILLER DR, L.A., MSTER IB, CHASENS, A.J., (1984). Role of polymorphonuclear leukocytes in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 11:1-15.

96. MOORE, W.E.C., RANNEY, R.R., HODEMAN, L.V., (1982). Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 38:1137-1144.
97. MOORE, W.E.C., HOLDEMAN, L.V., SMIBER, T.R.M., (1982). Bacteriology of severe periodontal disease: cultural studies. In: *Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseases*, RJ Genco, SE Mergenhagen (eds.), American Society for Microbiology, Washington DC, 13-26.
98. NEWMAN, H.N., (1977). Ultrastructure of the apical border of dental plaque. In: *The Borderland between Caries and Periodontal Disease*. T. Lehner (ed.), Academic Press, London, 79-103.
99. NISHIMINE, D., O'LEARY, T., (1979). Hand instrumentation versus ultrasonic in the removal of endotoxins from root surfaces. *J Periodontol* 50:345-349.
100. OFFENBACHER, S., ODLE, B., VAN DYKE, T. (1985). The microbial morphotypes associated with periodontal health and adult periodontitis: composition and distribution. *J Clin Periodontol* 12:736-749.
101. OLSEN, I., (1984). Attachment of *Treponema denticola* to cultured human epithelial cells. *Scand J Dent Res* 92:55-63.
102. OLSEN, I., LINGAAS, E., HURLEN, B., MIDTVED, T.T., (1984). Scanning transmission electron microscopy of the phagocytosis of *Treponema denticola* and *Escherichia coli* by human neutrophils in vitro. *Scand J Dent Res* 92:282-293.
103. OOYA K., TOOYA, Y., (1981). Scanning electron microscopy of the epithelium-connective tissue interface in human gingiva. *J Periodontal Res* 16:135-139.
104. PAGE, R.C., ALTMAN, L.C., EBERSOLE, J.L., VANDESTEEN, G.E., DAHLBERG, W.H., WILLIAMS, B.L., OSTERBERG, S.K., (1983). Rapidly progressive periodontitis. A distinct clinical condition. *J Clin Periodontol* 54:197-209.
105. PAGE, R.C., DCHOREDER, H.E., (1982). Periodontitis in man and other animals, Karger, Basel, 222-239.
106. PAGE, R.C., SIMS, T.J., GEISSLER, F., ALTMAN, L.C., BAAB, D.A., (1984). Abnormal leukocyte motility in patients with early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 19:591-594.
107. PAMEIJER, C.H., (1979). Replication techniques with new dental impression materials in combination with different negative impression materials. *Scanning Electron Microsc* 1979:II:571-574.
108. PAMEIJER, C.H., STALLARD, R.E., HIEP, N., (1972). Surface characteristics of teeth following periodontal instrumentation: a scanning electron microscope study. *J Periodontol* 43:628-633.
109. PFEFFERKORN, G., BOYDE, A., (1974). Review of replica techniques for scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microsc* 1974:75-81.
110. POIRIER TP, TONELLI, S.J., HOLT, S.C., (1979). Ultrastructure of gliding bacteria: scanning electron microscopy of *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea*. *Infect Immun* 26:1146-1158.
111. POLSON, A.M., FREDERICK, G.T., LADENHEIM, S., HANES P.J., (1984). The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol* 55:443-446.
112. RYLANDER, H., LINDHE J., ROSLING, B., (1983). The cause related phase of periodontal therapy, IN: *Textbook of Clinical Periodontology*, J Lindhe (ed.), Munksgaard, Copenhagen, 327-350.
113. SAGLIE, R., (1977). A SEM study of the relationship between the most apically located subgingival plaque and the epithelial attachment. *J Periodontol* 48:105-115.
114. SAGLIE, R., CARRANZA, J.R., NEWMAN, M.G., PATTISON, G.A., (1982). Scanning electron microscopy of the gingival wall of deep periodontal pockets in humans. *J Periodont Res* 17:284-293.
115. SAGLIE, R., NEWMAN, M.G., CARRANZA, J.R., F.A., (1982). A scanning electron microscopic study of leukocytes and their interaction with bacteria in human periodontitis. *J Periodontol* 53:752-761.
116. SAGLIE, R., NEWMAN, M.G., CARRANZA, J.R., F.A., PATTISON, G.L. (1982). Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 53:217-222.
117. SANDHOLM, L., (1984). Cells and cellular interactions in gingival crevice washings from patients with juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 92:436-442.
118. SCHROEDER, H.E., RATEITSCHAK-PLUSS, E.M., (1983). Focal resorption lacunae causing retention of subgingival plaque in periodontal pockets. *Acta Odontol Scand* 41:1033-1041.
119. SCOTT, E.C., (1981). Replica production for scanning electron microscopy: a test of materials suitable for use in field settings. *J Microsc* 125:337-341.

120. SICHER, H., (123). Bau und Funktion des Fixationsapparates der Meerschweinchen molaren. *Z Stomat* 21:580-584.
121. SICHER, H., (1942). Tooth eruption: the axial movement fo continuously growing teeth. *J Dent Res* 21:201-210.
122. SKAPSKY, H., LEHNER, T., (1976). A crevicular washing method for investigation immune components of crevicular fluid in man. *J Periodont Res* 11:19-23.
123. SLOAN, P., (1979). Collagen fiber architecture in the periodontal ligament. *J Roy Soc Med* 72:188-191.
124. SLOAN, P., (1982). Structural organization of the fibers of the periodontal ligament. In: *The periodontal Ligament in Health and Disease*, BKB Berkovitz, BJ Moxham, HN Newman (eds.), Pergamon Press, Oxford, 51-72.
125. SLOAN, P., SHELLIS, R.P., BERKOVITZ, B.K.B., (1976). Effect of specimen preparation on the appearance of the rat periodontal ligament in the scanning electron microscope. *Archs Oral Bil* 21:633-634.
126. SLOTS, J., DAHLEN, G. (1985). Subgingival microorganisms and bacterial virulence factors in periodontitis. *Scand J Dent Res* 93:633-634.
127. SOCRANSKY, S.S., (1977). Microbiology of periodontal diseade-present status and future considerations. *J Periodontol* 48:497-502.
128. SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE A.D., GOODSON, J.M., LINDHE, J., (1984). New Concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 13:360-366.
129. STAMM, J.W., (1986). Epidemilogogy of gingivitis. *J Clin Periodontol* 13:360-366.
130. SVEJDA, J., SKACH, M., (1973). The periodontium of the human tooth in the scanning electron microscope (Stereoscan). *J Periodontoal* 44:478-484.
131. TANNER, A.C.R., SOCRANSKY, S., GOODSON J.M., (1984). Microbiota of periodontal pocketss losing crestal alveolar bone, *J Periodontal Res* (19:279-291.
132. THEILADE, E., (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 13:905-911.
133. VAN DYKE, T.E., HOROSZEWICZ, H.U., GENCO, R.,J (1982). The polymophonuclear leukocyte (PMNL) locomotor defect in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 53:682-687.
134. VAN DYKE, T.E., LEVINE, M.J., GENCO, R.J., (1985). Neutrophil function and oral disease. *J Oral Pathol* 14:95-120.
135. VAN HOUTE, J., (1982). Colonization mechanisms involved in the development of the oral flora. In: *Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseases*. RJ Genco, SE Mergenhausen (eds.), American Society for Microbiology, Washington DC, 86-97.
136. VONNAHME, F.J., (1977). A scanning electron microscopic study of Kupffer cells in monkey liver. In: *Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells* E. Wisse, DL Knook (eds.), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 103-108.
137. WERTHEIMER, F.W., (1964). A histologic study of microorganisms and human periodontal tissues, *J Periodontol* 35:406-417.
138. WINTER, P.J., RIDGE, C.M., (1982). A scanning electron microscope study, showing that plaque does not adhere to a glass surface in the mouth. *Caries Res* 16:349-452.
139. WIRTHLIN, M.R., HANCOCK, E.B., (1980). Biologic preparation of diseased root sufraces. *J Periodontol* 51:291-297.
140. WOODRUFF, H.C., LEVIN, M.P., BRADY, J.M. (1975). The effects of two ultrasonic instruments on root surfaces. *J Periodontol* 46:119-126.
141. YAMAGUCHI, H., HIRASAWA, K., TANAKA, T., SHIOIRI, T., MATSUE, I., (1981). The inhibitory effect of Chlorhexidine Digluconate on dental plaque formation. *J Periodontol* 52: 630-638.