

m.t.
PEDRO DUARTE NOVAES

PLACA DENTAL DE INCISIVO INFERIOR DE RATO:
OBSERVAÇÕES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E DE TRANSMISSÃO

Impl.
m.t.
Orientador : Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biologia e
Patologia Buco-Dental (Área de
Patologia), Faculdade de Odon-
tologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obten-
ção do Título de Mestre em
Ciências.

PIRACICABA - S. P.
- 1990 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A

ROSANY e BRAZ, que em silêncio me
deram alicerces onde, com segurança,
eu pudesse construir minha vida.

Aos animais

Aqueles animais que, com os olhos humildes, nos falaram de sua vontade de viver; aqueles animais, vítimas solicitadas pela ciência, o meu respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA,
Professor Titular da Disciplina de
Patologia da Faculdade de Odontolo-
gia de Piracicaba-UNICAMP, que me
transmite com integridade e honesti-
dade os ensinamentos humanos e cien-
tíficos.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a. Dr.^a. TEREZA DE LOURDES SCARPARI BARRICHELLO, Coordenadora do Curso de Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos Profs. Drs. LOURENÇO BOZZO e MÁRIO ROBERTO VIZIOLI, da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Ao Prof. Dr. RUY GASTALDONI JAEGER, do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, que nos possibilitou a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

As minhas amigas MARIA HELENA DE VASCONCELOS PERON e FABIANA FACCO CASAROTTI, Técnicas do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pela ajuda e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grande amigo Sr. ANTONIO KERCHES DE CAMPOS, pela paciência e atenção a mim dedicadas no início de minha carreira.

Aos colegas do Curso, VANESSA MONTEIRO PEDRO, MARIA RITA MASSELLI, ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE, MARCO ANTONIO SAAVEDRA FRANCO E MARCOS ANTONIO DE ALMEIDA LEME, pela amizade que conseguimos cultivar juntos.

Ao VALDIR SEIJE ITO pela ajuda na confecção das fotografias e pela simples convivência que transformamos em grande amizade.

Ao IVES ANTONIO CORAZZA, MARCOS ANTONIO RAPETTI e ROSA MARIA FORNASIARI, pela digitação do texto.

Ao ELISEO APARECIDO BERTTI, desenhista da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA.	4
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO.	42
RESUMO	47
SUMMARY.	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Os aspectos morfológicos da colonização inicial e da organização da placa no esmalte e no cimento foram descritos por vários autores "in vitro" e "in vivo" (THEILADE e THEILADE, 1970; LISTGARTEN, 1976; BRECX e cols., 1981; TEN NAPEL e cols., 1985; NYVAD e FEJERSKOV, 1987 a, b; CARASSI, SANTARELLI e ABATI, 1989). Há inicialmente deposição de película orgânica, seguida da aderência de cocos e bacilos gram positivos sobre a superfície do dente. Após 8 horas, além de cocos e bacilos, filamentosos também estão presentes formando uma monocamada, que depois de 24 horas já é espessa, com os microrganismos imersos numa matriz intercelular. Dos vários modelos descritos na literatura, em nenhum é possível estudar a formação, organização e destruição da placa dental simultaneamente. O incisivo de rato é de crescimento contínuo, e por esta particularidade tem sido extensivamente usado nas várias áreas da biologia dental (WARSHAWSKY, 1985; TSE e cols., 1987). Como nos molares, no incisivo há também formação de placa dental, entretanto este aspecto não foi estudado, exceto por SCHEMEHORN e cols., (1984) que descreveram a ação de substâncias antimicrobianas no acúmulo de placa dental no esmalte de incisivos de rato, considerando o modelo adequado para observações quantitativas "in vivo". Como a placa tem atividades metabólicas, composição química e efeitos patogênicos variados, dependendo de onde e como se forma, a placa dos incisivos de rato deve ter

características únicas de formação, organização e destruição, cujo estudo pode contribuir para o melhor conhecimento de alguns aspectos da biologia da placa dental. Neste trabalho serão descritos os aspectos morfológicos da placa que se forma na superfície do cemento de incisivos de rato através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

REVISÃO DA LITERATURA

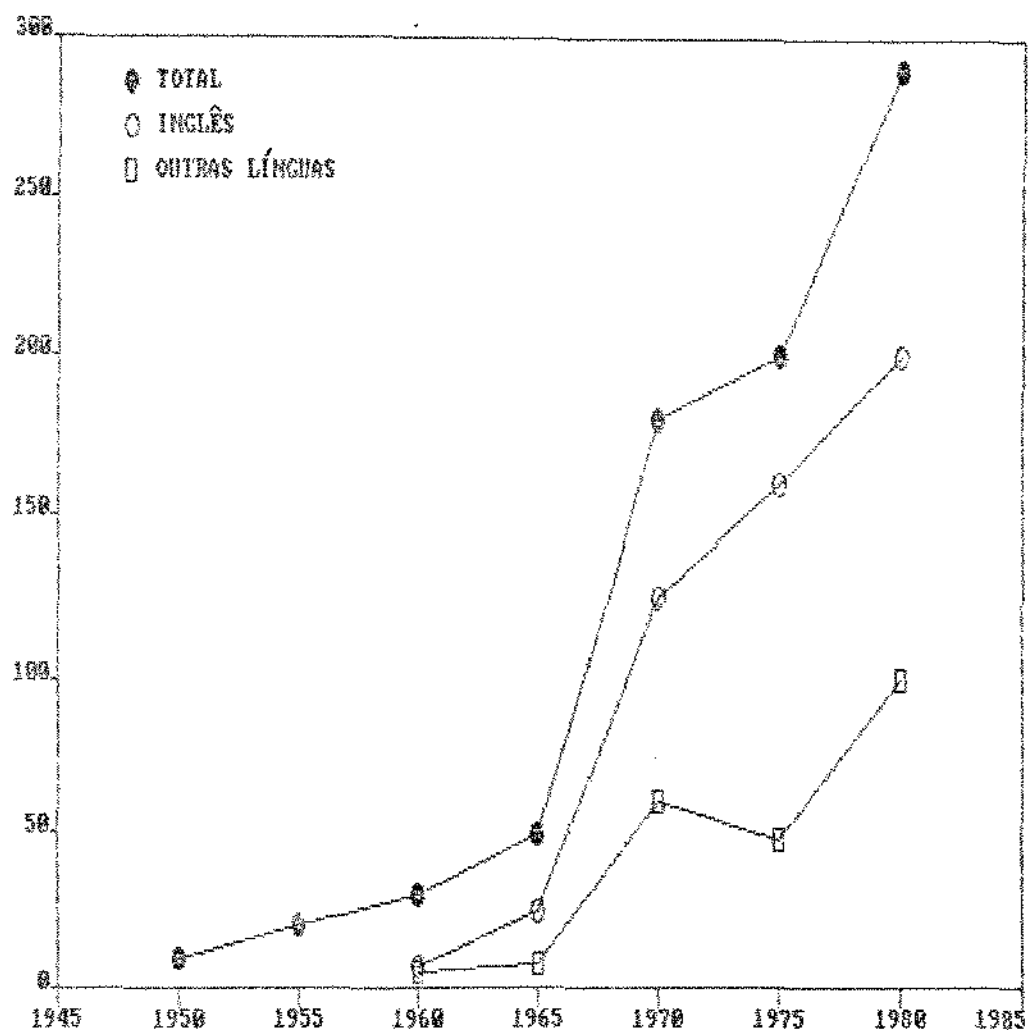
REVISÃO DA LITERATURA

PLACA DENTAL

As bactérias da boca foram observadas pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek (DOBELL, 1932). Em 1897 Williams demonstrou a presença de bactérias associadas à cárie, e no ano seguinte, G.V. Black (LEACH, 1969) introduziu o termo placa microbiana gelatinosa. Atualmente o termo mais usado é placa dental, correspondendo ao agregado de bactérias sobre as superfícies duras do dente, estimando-se que contém 400 milhões de bactérias/mg, valor semelhante ao número de bactérias num meio de cultura (NAVIA, 1984), sendo 70% da área ocupada por bactérias e 30% de material orgânico (SCHRÖEDER e DE BOEVER, 1970). Clinicamente a placa tem coloração branco amarelada, de espessura variável, cuja quantidade pode ser melhor avaliada usando-se evidenciador de placa como fucsina ou vermelho neutro.

Pela sua importância na cárie e doença periodontal muitas revisões sobre placa dental foram publicadas, abordando os mais variados aspectos, destacando-se as de (FITZGERALD, 1968; MANDEL, 1968; GENCO, EVAN e ELLISON, 1969; LEACH, 1969; KRASSE, 1970; GIBBONS, 1970; LAIRD e GRANT, 1983; NAVIA, 1984; MAIDEN e cols., 1990).

A partir de 1950 houve aumento progressivo de publicações sobre a placa dental, como ilustrado no gráfico a seguir, publicado por LAIRD e GRANT (1983) a partir de dados do "Indices to Dental Literature".



Número de referências sobre placa dental, em inglês e outras línguas, de 1950 a 1980, de acordo com o "Indices to Dental Literature" (LAIRD e GRANT, 1983).

PELÍCULA ADQUIRIDA

Imediatamente após a erupção, os dentes estão recobertos por estruturas de origem embrionária que são rapidamente eliminadas, havendo adsorção no esmalte de glicoproteínas salivares ácidas, formando a película adquirida. Após a limpeza rigorosa das superfícies duras do dente, há formação da película em 2 horas. THEILADE e MIKKELSON, (1972), demonstraram sua presença após 15 minutos, o mesmo ocorrendo em superfícies artificiais colocadas na boca (SONJU e ROLLA, 1973, SONJU e GLANTS, 1975, LIE, 1978, BERTHOLD, 1979). A película é acelular (SCHRÖEDER, 1970), contendo carboidratos, proteínas e lipídios e segundo LEACH e SAXTON (1966) tem processos dendríticos que penetram 1-3 μ m no esmalte. A formação da película não depende de bactérias, sendo formada em animais "germ free" (LISTGARTEN e HANECHAN, 1973; LIE, 1978). A película pode ser coletada e analisada após a dissolução do esmalte com HCl a 5% (MAYHALL, 1970). Após a aderência de bactérias, a composição da película é modificada podendo mesmo sofrer degradação, com interface dente-placa tendo espessura variável e podendo ser descontínua (FRANK e BRENDEN, 1966). A rigor, a película deve ser considerada apenas quando antes da colonização por bactérias (NYVAD e FEJERSKOV, 1987 a e b).

COLONIZAÇÃO

A superfície do dente contém cerca de 10^6 bactérias viáveis por cm^2 depois de 1 hora de exposição ao meio bucal (van HOUTE, GIBBONS e BANGHART, 1970). Inicialmente no esmalte as bactérias são principalmente *Streptococcus* (*S.mitior* e *S.sanguis*) e *Actinomyces* (*A.naeslundii* e *A.viscosus*), o mesmo ocorrendo no cimento e superfícies artificiais (RÖNSTRÖM, EDWARDSSON e ATTSTRÖM, 1977, CARASSI, SANTARELLI e ABATI, 1989). A aderência é um processo seletivo pois cerca de 45% do total de *Streptococcus* na saliva e 41% sobre a língua são *S.salivarius* e apenas 3-4% fazem parte do total de bactérias da placa.

Os mecanismos de adsorção de bactérias à superfícies naturais ainda não são bem conhecidos, mas estudos com bactérias marinhas indicam que ocorre em duas fases, uma inicial reversível, e a segunda que requer algumas horas, sendo mais estável após formação de material extracelular (MARSHALL, STOUT e MITCHELL, 1971). As bactérias têm carga negativa e através de energia cinética aproximam-se da superfície dentária, que também é negativa, até cerca de 20nm. Com a aproximação, forças de Van der Waals exercem atrações, mas as cargas negativas repelem. Quando macromoléculas (película) são introduzidas, há formação de ligações como pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e pontes de Ca^{++} , e com a síntese de matriz intercelular a união torna-se mais estável (GIBBONS e van HOUTE; 1973, 1975; STAAT, LANGLEY e DOYLE, 1980; NESBITT, DOYLE e TAYLOR, 1982; GIBBONS, 1984). A película adquirida pode ser importante, mas não essencial para a aderência

das bactérias, visto que na ausência de saliva há formação de placa "in vitro" (HAGEAGE, JOHANSEN e TANZER, 1970). Os microrganismos inicialmente aderidos se multiplicam formando acúmulo local de várias camadas. Após a remoção da placa dental durante o tratamento periodontal, ainda não se sabe se a recolonização ocorre por proliferação de organismos não removidos ou por reinfeção (LAVANCHY e cols., 1987; MAGNUSSON e cols., 1984).

ORGANIZAÇÃO DA PLACA

A organização da placa dental no esmalte e cimento tem sido descrita por vários autores em microscopia de luz e eletrônica de transmissão e varredura "in vivo" e "in vitro" (THEILADE, e THEILADE, 1970; LISTGARTEN, 1976; BRECX e cols., 1981; IMFELD, 1983; TEN NAPEL e cols., 1985; NYVAD e FEJERSKOV, 1987 a, b; CARASSI, SANTARELLI e ABATI, 1989).

Após a deposição da película há adsorção de cocos e bacilos, que recobrem a superfície exposta após 8 horas (PALENSTEIN HELDERMAN, 1981). O crescimento inicial da placa é principalmente vertical, por divisão celular, em relação a superfície do dente, visto que o crescimento lateral muitas vezes não é possível (LISTGARTEN, MAYO e TREMBLAY, 1975), resultando em microcolônias perpendiculares à superfície do dente. Depois de 24 horas a placa já é espessa, com as bactérias imersas numa matriz intercelular e presença de outros tipos morfológicos como longos bacilos, filamentosos e espiroquetas (RITZ, 1967). A densidade de microrganismos aumenta com o tempo, e a viabilidade diminui na concentração

de oxigênio nas partes mais profundas da placa, com mudança progressiva de microbiota, aeróbia e anaeróbia facultativa para anaeróbios facultativos e estritos. A distribuição das bactérias não é homogênea, sendo que se os *Streptococos* estão distribuídos por toda a placa, *Neisseria* localiza-se preferencialmente na superfície e *Veillonella* na porção central e profunda da placa.

De um modo geral na organização da placa tem-se inicialmente uma população de cocos Gram positivos anaeróbios facultativos (*Streptococcus*) e bacilos Gram positivos (*Actinomyces*), com aumento progressivo de Gram negativos, especialmente bacilos e filamentosos (*Bacteroides*, *Fusobacterium*).

ASPECTOS GERAIS DA MICROBIOLOGIA DA PLACA DENTAL

A boca tem vários nichos ecológicos caracterizados por condições microambientais específicas, resultando em floras diferentes, como ocorre na língua, mucosa, amígdala e superfícies dentais (GIBBONS e van HOUT, 1973; NAVIA, 1984). A composição microbiana da placa é variável nas diferentes áreas de um mesmo dente, assim como em diferentes regiões da mesma placa (KRASSE, 1954, GIBBONS e cols., 1964). Numa única amostra é possível isolar 30 ou mais espécies (LAIRD e GRANT, 1983), das mais de 200 presentes na placa supra e subgengival, e as principais estão abaixo citadas.

BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS	BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Streptococcus milleri</i>	<i>Haemophilus segnis</i>
<i>Streptococcus mitior</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Veillonella atypica</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Bacteroides oralis</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Bacteroides</i> , outras espécies
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Corinebacterium matruchotii</i>	<i>Treponema vincentii</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Campylobacter concisus</i>
<i>Lactobacillus</i> , outras espécies	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
<i>Arachnia propionica</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
<i>Eubacterium alactolyticum</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>Eubacterium saburreum</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>
<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Estreptococcus anaerobius</i>	<i>Actinobacillus actinomycetem-</i> <i>comitans</i>

Embora a variedade de bactérias seja muito grande, há cada vez mais tentativas de se associar a cárie e doença periodontal com bactérias específicas. Na cárie são especialmente importantes as que fermentam carboidratos como *S. mutans*, *Lactobacillus* e *A. viscosus*; na doença periodontal os *B. gingivalis*, *B. melaninogenicus* e *Treponema*.

As dimensões das bactérias da placa são variáveis, com a *Leptotrichia buccalis* medindo 2x20µm, e um *Estreptococo* típico

1x0,6µm (BOYDE e WILLIAMS, 1971).

Na placa dental há interação entre as bactérias, com comensalismo, simbiose e antagonismo. As bacteriocinas são antibacterianos produzidos por alguns *Streptococos* contra bactérias específicas, como o *A. viscosus* que podem diminuir o crescimento de microrganismos nas vizinhanças dos estreptococos bacteriocinogênicos. Entretanto estes efeitos estudados "in vitro" ainda não foram estudados "in vivo". Por outro lado, a *Veillonella* utiliza ácido láctico como fonte de energia, e as bactérias de placa que mais produzem esse ácido são os estreptococos e actinomyces. (van der HOEVEN, 1980). As bactérias também podem se agregar através de receptores proteicos ou moléculas de carboidratos da membrana celular (GIBBONS e NYGAARD, 1970; ELLEN e BALZERAK-RACZKOWSKI 1977). As formações em "espiga de milho" consistem de filamentosos cobertos por camada única e compacta de cocos (JONES, 1971, 1972), sendo bom exemplo de interação bacteriana. A porção filamentosa foi identificada como *Corynebacterium matruchotii* e os cocos *S. sanguis* e *S. mitior* (GIBBONS e van HOUTE, 1975, MOUTON, REYNOLDS e GENCO, 1977, 1980). Portanto a interação das bactérias, além da multiplicação, é fator importante para o desenvolvimento e organização da placa.

MATRIZ INTERCELULAR

O material presente na placa entre as bactérias é formado de proteínas salivares e plasmáticas, produtos bacterianos e substâncias incorporadas na dieta. As imunoglobulinas são principi

palmente do tipo IgG e provavelmente derivadas do fluido gengival (NEWMAN, SEYMOUR e CHALLACOMBE, 1979). Contém também substâncias inorgânicas como Ca, fosfato e flúor. A matriz serve para manter as bactérias aderidas e como meio de nutrição (GIBBONS e van HOUTE, 1975).

A placa contém cerca de 80% de água, 20% de sólidos, com as proteínas correspondendo a 40-50% do peso seco da placa, carboidratos 13-18% e lipídios 10-14% (HOTZ, GUGGENHEIM e SCHMID, 1972). Os carboidratos são os principais componentes da matriz, influenciando não só na composição da placa, como nos tipos bacterianos e atividade metabólica das bactérias, como produção de energia e material de reserva (BIRKED, ROSELL e GRANATH, 1979). O aspecto microscópico da matriz é de material fibrilar, possivelmente glucano alfa 1-3 (HOTZ, GUGGENHEIM e SCHMID, 1972) globular ou granular. Os principais polissacarídeos extracelulares são os glucanos e frutanos. Heteropolissacarídeos compostos de N-acetilglicosamina, galactose, glicose e ácido urônico são formados pelo *A. viscosus* (ROSAN e HAMMOND, 1974). Além dos extracelulares, os carboidratos aparecem na placa como peptidoglicanos das paredes celulares e glicogênio intracelular, com propriedades iodofílicas.

Os glucanos são polímeros de glicose com os de ligações alfa 1-6, sendo os dextranos, que são solúveis. Quando a predominância é de ligações alfa 1-3, a molécula é insolúvel e não degradável, podendo formar agregados fibrosos.

Os frutanos, usualmente de alto peso molecular, são bastante solúveis sendo divididos em levano (cadeias alfa 2-6 fruto-

furanose) produzido pelo *S. salivarius* e *A. viscosus* e inulina (cadeias alfa 1-2 de frutofuranose) produzido pelo *S. mutans*. Os glucanos e frutanos são os componentes mais abundantes da placa quando a sacarose é metabolizada por *Estreptococos*.

A tabela abaixo mostra os microrganismos da placa formadores de polissacarídeos extracelulares (NEWBRUN, 1988).

MICRORGANISMOS DE PLACA FORMANDO POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES

GLUCANOS	FRUTANOS	HETEROPOLISSACARÍDEOS
<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>viscosus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Streptococcus mitior</i>	<i>mutans</i>	
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus</i>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>salivarius</i>	
<i>Neisseria sp.</i>		

PLACA SUPRA-GENGIVAL

A formação da placa supra-gengival inicia-se na margem gengival e cresce em direção a incisal e podem ter crescimento favorecido por irregularidades do esmalte. Durante as primeiras 96 horas a placa cobre, na face vestibular dos incisivos centrais superiores e inferiores, 15% da superfície, e nos caninos e pré-molares 30-35% (QUIRYNEN e van STEENBERGHE, 1989). Durante a noite o crescimento da placa é menor, talvez porque a placa supra-gengival tem parte de seus nutrientes oriundos da saliva (CARLSSON, 1980).

Inicialmente há aderência de cocos e bastonetes Gram positivos (KRASSE, 1977), sendo o *S.sanguis* o mais frequente (THOMSON e cols., 1980). Outras espécies Gram positivas frequentes são *A.viscosus*, *A.israeli*, *S.mitior*, *S.mutans*, *Rothia dentocariosa* e *S.epidermidis*. Posteriormente predominam anaeróbios facultativos Gram negativos, entre eles *V.parvula*, *Fusobacterium* e *B.oralis*.

PLACA SUB-GENGIVAL

Na região sub-gengival a película adquirida é formada provavelmente por componentes plasmáticos, assim como a placa é permeada por estes mesmos elementos. Nesta região as bactérias podem aderir à superfície do dente ou das células epiteliais, e a composição é bastante variada, dependendo da presença ou não de bolsa periodontal.

GENGIVA NORMAL

A placa sub-gengival numa gengiva normal é semelhante a da placa supra-gengival, consistindo de anaeróbios facultativos, cocos e bacilos Gram positivos e menos quantidade de anaeróbios Gram negativos (SLOTS, 1977; NEWMAN e cols., 1978; OFFENBACHER, ODLE e van DYKE, 1985). Espiroquetas são pouco frequentes. Em percentagem, no sulco gengival sadio, 50-85% são cocos e bastonetes Gram positivos, 15-30% cocos e bastonetes Gram negativos, 8% fusobactéria e filamentosos e 2% espiroquetas (KELSTRUP e

THEILADE, 1974; SLOTS, 1977).

GENGIVITE

Praticamente todas as pessoas dentadas apresentam um ou mais dentes com gengivite, e 7-15% da população adulta têm doença periodontal (JOHNSON e cols., 1988). Não há evidências de que a gengivite não tratada é seguida de doença periodontal. A gengivite mais estudada é a experimental, provocada pela suspensão da higiene oral por período até 21 dias. As bactérias mais frequentemente isoladas são: *A.israelii*, *A.viscosus*, *A.noeslundii*, *A.odontolyticus*, além de *B.melaninogenicus*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema* (LOESCHE e SYED, 1978).

GUNA

Na gengivite ulcero-necrosante aguda a flora predominante é de espiroquetas (*Treponema vincentii* e *Fusobacterium* (LOESCHE e cols., 1982).

PERIODONTITE JUVENIL

Na periodontite juvenil há predominância de anaeróbios Gram negativos sacarolíticos (LILJENBERG e LINDHE, 1980). O principal organismo envolvido parece ser o *Actinobacillus actinomyces* *temcomitans* (ZAMBOM, 1985; SLOTS e DAHLEN, 1985), e em alguns casos *Capnocytophaga* *sp* e *Eikenella* *sp* parecem ser relevantes

(MOORE e cols., 1985).

PERIODONTITE CRÔNICA

Placas sub-gengivais de bolsas periodontais contém maior proporção de Gram negativos estritamente anaeróbios do que placas de dentes sem bolsas. SLOTS (1977) isolou 475 espécies de bactérias de bolsas periodontais, sendo 75% Gram negativas e 90% anaeróbios obrigatórios. Deve-se destacar entretanto que grande quantidade de placa não significa necessariamente presença de bolsa periodontal (LISTGARTEN, 1988).

Comparando-se bolsas ativas e inativas as principais bactérias associadas com as ativas são *B.gingivalis*, pequenos espiroquetas, *B.intermedius*, *A.actinomycescomitans*, *Capnocytophaga ochracea*, *Wolinella recta* (SLOTS e GENCO, 1984; DZINK, SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1988). Vários estudos indicam portanto que algumas bactérias são mais relevantes para a doença periodontal, destacando-se *A.actinomycescomitans*, *B.intermedius*, *B.gingivalis* (SLOTS e cols., 1986; MAIDEN e cols., 1990). Deve-se considerar que cerca de 200 espécies presentes, cada pesquisador isola o que estiver eventualmente mais interessado. Os espiroquetas estritamente anaeróbios estão presentes na placa e têm sido considerados importantes na doença periodontal (GREENSTEIN e POLSON, 1985). O *Treponema* é difícil de ser cultivado, lembrando que o *Treponema pallidum*, causador da sífilis, ainda não foi cultivado.

Alguns autores têm procurado determinar fatores sistêmicos, salivares e bacterianos indicadores do risco de doença pe-

riodontal, mas os mecanismos básicos da doença ainda não estão bem determinados (WILTON e cols., 1988, MAIDEN e cols., 1990). Vários são os possíveis mecanismos de ação das bactérias como o *B.gingivalis*, que produzem além dos lipopolissacarídeos, vesículas de membranas, proteases, enzimas e substâncias tóxicas. Somente quando o pH da bolsa sobe durante a inflamação, os *bacteroides* produzem grande quantidade de protease semelhante a tripsina que pode destruir imunoglobulinas e complemento (McDERMID, McKEE e MARSH, 1988).

Duas correntes disputam se a placa atua por mecanismos específicos ou não específicos, sem entretanto até o momento definição sobre o assunto. Segundo a hipótese não específica a doença periodontal desenvolve devido a modificações no equilíbrio entre hospedeiro e placa, e a teoria específica considera a presença de um único ou pequeno grupo de bactérias que infecta o indivíduo suscetível, causando a doença como em outras infecções conhecidas. A tabela a seguir (NEWBRUN, 1988) indica as principais bactérias envolvidas nas gengivites e periodontites.

DOENÇA	LOCALIZAÇÃO	MICROORGANISMOS
Gengivite	Placa supragengival Placa subgengival	Actinomyces viscosus Actinomyces israelii Capnocytophaga gingivalis Fusobacterium nucleatum Veillonella parvula Campylobacter sputorum Espiroquetas (pequenos)
Gengivite ulcerativa necrosante aguda	Placa subgengival Tecidos gengivais	Fusobacterium sp. Bacteroides melaninogeni- cus B.intermedius Selenomonas sputigena Espiroquetas (tamanho in- termediário) Espiroquetas (tamanho in- termediário)
Periodontite crônica	Placa subgengival	Bacteroides melaninogeni- cus B.intermedius Eikenella corrodens Eubacterium sp. Espiroquetas
Periodontite rapi- damente destrutiva	Placa subgengival	Bacteroides gingivalis Wolinella recta Selenomonas sputigena Bacteroides gracilis Bacteroides capillosus Actinobacillus actinomyce- temcomitans Eikenella corrodens Espiroquetas (tamanho in- termediário)
Periodontite juvenil	Placa subgengival	Actinobacillus actinomyce- temcomitans Capnocytophaga ochracea Bacteroides melaninogeni- cus B.intermedius Eubacterium saburreum Espiroquetas

MORFOLOGIA DA PLACA

Morfologicamente a placa pode ser dividida em 4 camadas: interface placa-dente, camada condensada, corpo da placa e superfície da placa.

A interface dente-placa consiste da película e suas modificações após a colonização bacteriana, descrito anteriormente. A camada condensada corresponde a porção mais interna da placa (próxima a superfície do dente), rica em cocos, e de aspecto colunar, devido ao crescimento perpendicular à superfície do dente (SCHRÖEDER, 1970), que foi comparado a arranha-céus por LISTGARTEN, MAYO e TREMBLAY (1975). A espessura é variável, podendo ter de 3 a 20 células, e muitas estão em divisão. O corpo da placa é formado de espécies diferentes de microrganismos, sem disposição organizada, com o longo eixo das bactérias perpendiculares à superfície do dente. A camada superficial tem amplos espaços intercelulares, com grande variedade de microrganismos, inclusive formações em "espiga de milho" (JONES, 1972). A interpretação morfológica das bactérias deve ser cuidadosa, visto que por exemplo, o *Actinomyces* pode parecer cocoide "in vivo" mas são bacilos ou filamentosos em cultura (JORDAN e HOWELL, 1965; BERTHOLD, LAI e LISTGARTEN, 1982).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro incisivos inferiores de dois ratos Wistar *Rattus norvegicus* normais, pesando 200-220g e alimentados com ração e água "ad libitum" foram usados para as observações em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os animais foram mortos por inalação excessiva de éter etílico, a mandíbula retirada e imersa em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato pH 7,4, por 6 horas a 4°C. Os incisivos foram cortados transversalmente, preservando-se a gengiva e a região erupcionada. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora, seguida de desidratação em série crescente de álcoois, imersão em acetato de amila e secagem em aparelho de ponto crítico (Baltzers), com fluxo contínuo de CO₂. Os espécimes foram colados com cianoacrilato em bases de alumínio, e recobertos com ouro em "sputtering catódico" (Baltzers). As observações e documentações foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (EtecAutoscan) a 20KV e vácuo a 10⁻⁴ Torr. da Faculdade de Odontologia da USP.

Para os estudos de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) também foram utilizados quatro incisivos inferiores de dois ratos normais, com as características descritas anteriormente. Os dentes foram fixados em glutaraldeído a 2,5%, descalcificados em EDTA de acordo com WARSHAWSKY e MOORE (1967) e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. A face distal foi seccionada em vários segmentos transversais, desde a gengiva até o terço incisal

e incluídos em Araldite. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e os ultrafinos com acetato de uranila e citrato de chumbo. As observações foram feitas num microscópio Zeiss EM-10 da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

RESULTADOS

RESULTADOS

O incisivo inferior de rato é de crescimento contínuo, sendo recoberto na face labial por esmalte e nas proximais por cimento e é nítido o limite amelo-cementário. Na face distal há formação de camada homogênea de placa dental sobre a superfície do cimento (Figs. 1 e 2). A placa da região mais próxima à margem gengival e na região incisal, tem aspecto mais homogêneo do que da região central, como mostra a microscopia eletrônica de varredura (Fig. 3).

A microscopia eletrônica de transmissão do epitélio juncional de incisivo inferior de rato, mostra células epiteliais em contato com o cimento, grande quantidade de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, e células epiteliais granuladas, achatadas e compactadas do epitélio sulcular. Entre células epiteliais próximas ao cimento e os neutrófilos observa-se espaços intercelulares (Fig. 4) contendo grande quantidade de bactérias em forma de cocos e bacilos. Algumas bactérias parecem estar no interior do citoplasma das células epiteliais e dos neutrófilos (Figs. 5, 6 e 7). Na região do sulco gengival há grande quantidade de PMN sobre a superfície do cimento, apresentando vacúolos citoplasmáticos contendo bactérias e material em degradação. O epitélio sulcular situa-se acima da camada de PMN, com algumas células epiteliais separadas das demais, indicando processo de descamação e outras apresentando grânulos citoplasmáticos (Figs. 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Entre a margem gengival e o início da placa dental observam-se células epiteliais, leucócitos e bactérias isoladas ou formando pequenos aglomerados sobre a superfície do cimento. A faixa

escura bem próxima à margem gengival, como mostra a Fig. 15, provavelmente está associada à retração gengival ocorrida durante o preparo do material.

A cerca de 100µm da margem gengival, bactérias isoladas ou formando monocamada estão aderidas ao cimento, com predominância de cocos, bacilos e alguns filamentos, havendo rapidamente a formação de placa com várias camadas de bactérias (Figs. 16, 17 e 18). O aspecto desta região em Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.) é de uma camada de bactérias recobrando de forma homogênea o cimento, exceto em algumas regiões. Grupos de leucócitos são encontrados sobre as bactérias, com inúmeras projeções da membrana celular (Fig. 19). A M.E.V. permite melhor análise morfológica das bactérias que inicialmente aderem ao cimento. Nesta fase de organização da placa, as bactérias estão frouxamente agregadas, e envolvidas parcialmente por matriz intercelular, formando uma monocamada bacteriana com formas cocóides e bacilares (Fig. 20). A Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.), mostra a superfície do cimento com pequenas ondulações, e uma matriz escassa e de aspecto granular existindo, entretanto, algumas estruturas membranosas entre as bactérias (Figs. 21, 22 e 23). A monocamada se torna espessa com 4 a 6 camadas de bactérias, a medida que avança para a região incisal; a matriz é bem mais rica e com aspecto fibrilar, particularmente imersas na matriz intercelular. Nesta fase de organização as bactérias, principalmente os bacilos, estão orientados perpendicularmente ao cimento. A superfície da placa dental é irregular, e algumas bactérias parcialmente envolvidas pela matriz estão aparentemente aderindo ao sendo elimi-

nadas da placa (Figs. 24, 25 e 26).

No terço médio do cemento a placa atinge espessura máxima, cerca de 20 μ m e 20 camadas de bactérias, com o longo eixo das mesmas geralmente perpendicular à superfície do cemento. A densidade das bactérias é variável, assim como os tipos morfológicos e a quantidade de matriz intercelular. Células em divisão celular são vistas principalmente nas áreas próximas ao cemento (Fig. 27). A M.E.V. mostra que a superfície da placa nesta região é formada de vários tipos bacterianos em diferentes graus de agregação, onde em algumas áreas as bactérias estão unidas por grande quantidade de matriz intercelular e em outras, microrganismos parecem estar flutuando na superfície, e as formas bacterianas é predominantemente filamentosas e bacilares (Fig. 28).

Nas regiões próximas ao cemento a placa se apresenta com colunas de bactérias cocoides e bacilares perpendiculares à superfície do dente. A matriz intercelular é densa e com aspecto fibrilar, orientada paralelamente às bactérias. Observa-se também algumas bactérias em divisão celular. O cemento não apresenta alteração ou invasão por bactérias (Figs. 29 e 30).

A superfície da placa dental se apresenta com diferentes tipos bacterianos dispostos sem organização definida. A matriz é menos densa, sem características fibrilares, com grande quantidade de vesículas aparentemente não associadas às bactérias, assim como divisões celulares não são evidentes. Algumas bactérias parecem estar aderindo-se ou deixando a superfície da placa (Figs. 31, 32, 33 e 34).

No terço incisal a placa está em desorganização, com

acúmulos focais de agregados bacterianos, regiões cobertas por 1 a 3 camadas de bactérias e cimento já destituído de microrganismos. As bactérias estão fracamente unidas, indicando pequena quantidade de matriz intercelular (Figs. 35 e 36). A quantidade de bactérias diminui ao mesmo tempo que a matriz começa perder o aspecto fibrilar, algumas bactérias parecem estar se soltando da superfície da matriz desorganizada (Figs. 37 e 38).

Na porção final da placa dental, já se encontra pequeno número de bactérias formando "ilhas", cimento com ausência de bactérias, e algumas áreas onde os microrganismos foram deslocados, deixando cavidades na matriz ainda presente na superfície do cimento (Figs. 39 e 40). Em M.E.T. é nítida a desorganização da matriz, a qual já perdeu o aspecto fibrilar, e se apresenta com muitos espaços e com vacúolos delimitados por estruturas membranosas (Figs. 41 e 42). A Fig. 43 mostra em M.E.V. que o cimento está irregularmente recoberto por matriz, contendo algumas bactérias e grande quantidade de cavidades que no conjunto dão aspecto de "favo de mel", e a M.E.T. mostra que nesta área de destruição da placa, a matriz se apresenta bastante desorganizada e pequenas cavidades deixadas provavelmente pelas bactérias que foram eliminadas. Na porção mais incisal, o cimento sem sinais de alteração morfológica, está livre de bactérias e de matriz intercelular (Figs. 44, 45 e 46).

A partir das observações em Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.) e Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.), foi feito um esquema (Fig. 47) ilustrando as principais características da placa dental do incisivo inferior de rato.

Fig. 1 - Incisivo inferior de rato mostrando através da microscopia eletrônica de varredura a placa dental (P) na superfície do cimento (C) e esmalte (E). A placa inicia-se na região próxima à margem gengival (G) e estende-se até o terço incisal (Seta). MEV 25 x.

(*)

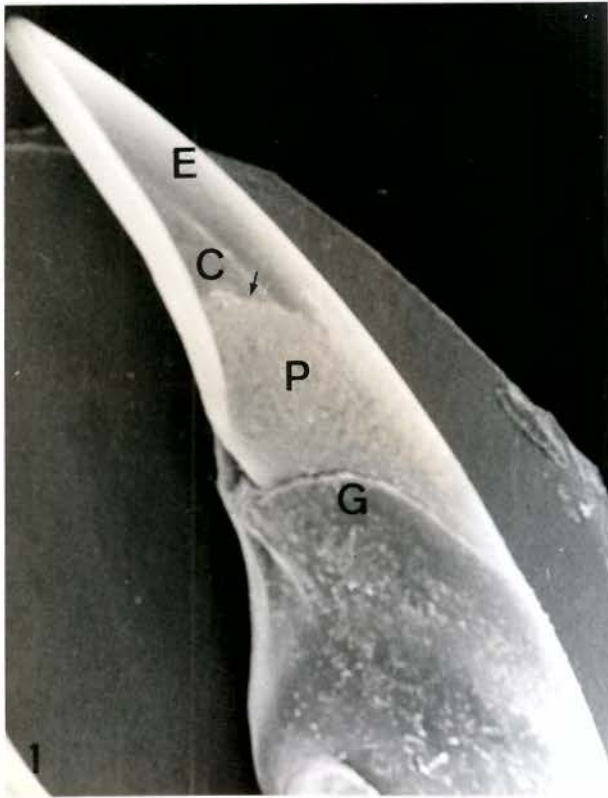
Fig. 2 - Corte longitudinal de incisivo inferior de rato mostrando a placa dental (Setas) sobre a superfície distal. O material foi incluído em parafina e corado com hematoxilina-eosina o que não permite boa preservação da placa dental, dando entretanto uma vista geral do que será ilustrado nas demais figuras em microscopia eletrônica. 126x.

G - Gengiva

D - Dentina

Po - Polpa

(*) OBS.- Todas as figuras estão arranjadas de tal modo que as estruturas estão orientadas no sentido gengivo-incisal de baixo para cima.



2

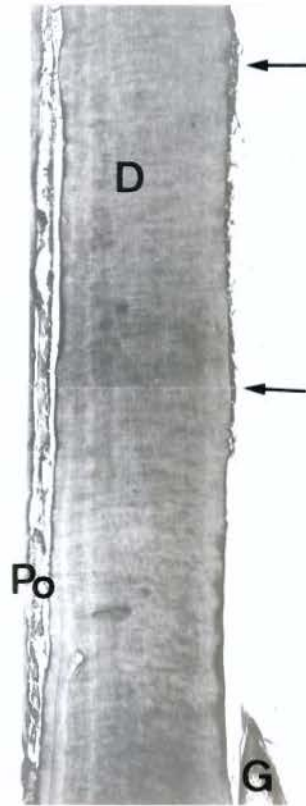


Fig. 3 - Maior aumento da Figura 1 mostrando esmalte (E), cimento (C) e limite amelo-cementário (Seta) parcialmente recobertos pela placa dental. Entre a margem gengival e a placa nota-se pequena faixa escura que provavelmente corresponde à retração gengival durante o preparo do material (*). A placa na região mais próxima a margem gengival (Pg) e na região incisal (Pi) tem aspecto mais homogêneo do que na região central (Pc).
MEV 40 x.

Fig. 4 - Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio juncional de incisivo inferior de rato, mostrando células epiteliais em contato com o cimento; grande número de PMN (Setas) e mais externamente camada de células epiteliais granuladas, achatadas e compactadas. Entre as células epiteliais mais internas e PMN há grande quantidade de espaços intercelulares. MET 1220 x.
D - Dentina
C - Cimento
CE - Células Epiteliais

Fig. 5 - Porção do epitélio juncional mostrando entre os espaços intercelulares (EI) acúmulo de bactérias em forma de cocos e pequenos bacilos (Setas). MET 4740 x.
D - Dentina
C - Cimento
V - Vacúolo Citoplasmático

Fig. 6 - Epitélio juncional mostrando espaços intercelulares (EI) contendo bactérias cocóides. As células epiteliais apresentam projeções (Setas) na superfície da membrana, e aparentemente contém bactérias intracelularmente (*).
MET 6000 x.
D - Dentina
C - Cimento
V - Vacúolos Citoplasmáticos

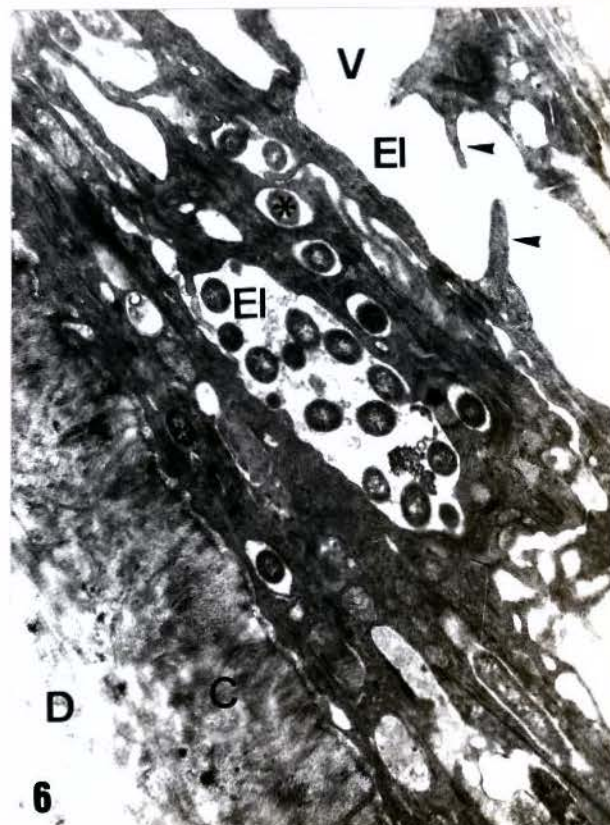
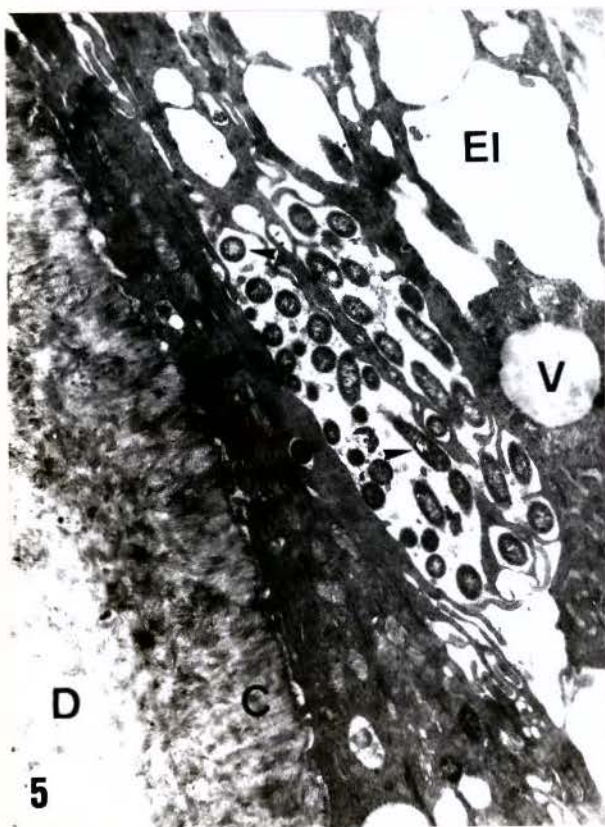
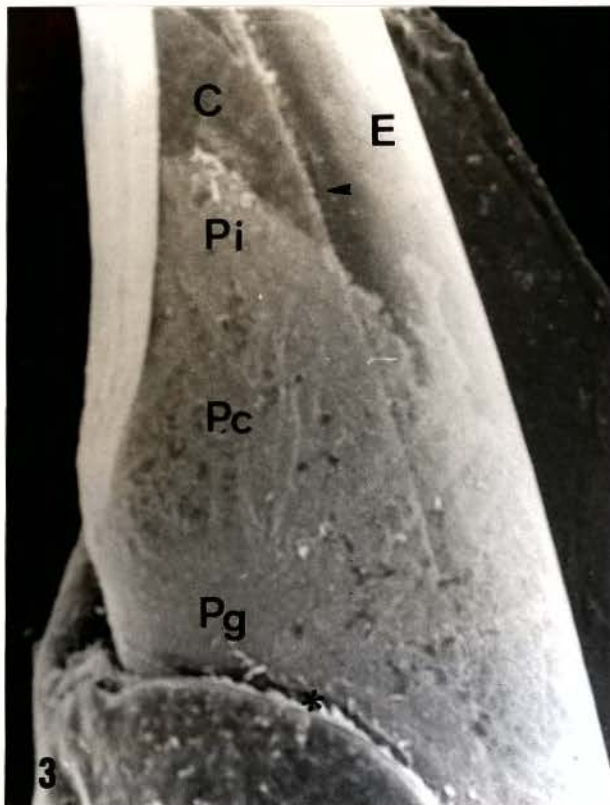


Fig. 7 - Neutrófilos (*) próximos ao cimento no sulco gengival, recobertos por célula epitelial. Bactérias são observadas nos espaços intercelulares e no interior dos neutrófilos (Seta). MET 3000 x.

C - Cimento

CE - Célula Epitelial.

Fig. 8 - Região profunda do sulco gengival mostrando grande quantidade de polimorfonucleares (PMN) sobre a superfície do cimento. As células do epitélio sulcular são alongadas e achatadas, apresentando quantidade variável de grânulos citoplasmáticos. As setas mostram os PMN. MET 600 x.

D - Dentina

C - Cimento

ES - Epitélio Sulcular

Fig. 9 - Maior aumento da Figura 8 mostrando a região mais profunda do sulco gengival com neutrófilos (*) próximos a superfície do cimento. O epitélio sulcular situa-se acima da camada de PMN, havendo entretanto células epiteliais (Seta) entre os neutrófilos. MET 1220 x.

D - Dentina

C - Cimento

ES - Epitélio Sulcular

Fig. 10 - Maior aumento da Figura 8 mostrando região do sulco próxima à margem gengival. Os PMN (*) formam uma camada sobre o cimento e apresentam vacúolos citoplasmáticos (Seta). A célula epitelial mais próxima à camada de neutrófilos está se separando das demais, indicando processo de descamação (CE). MET 1220 x.

D - Dentina

C - Cimento

ES - Epitélio Sulcular

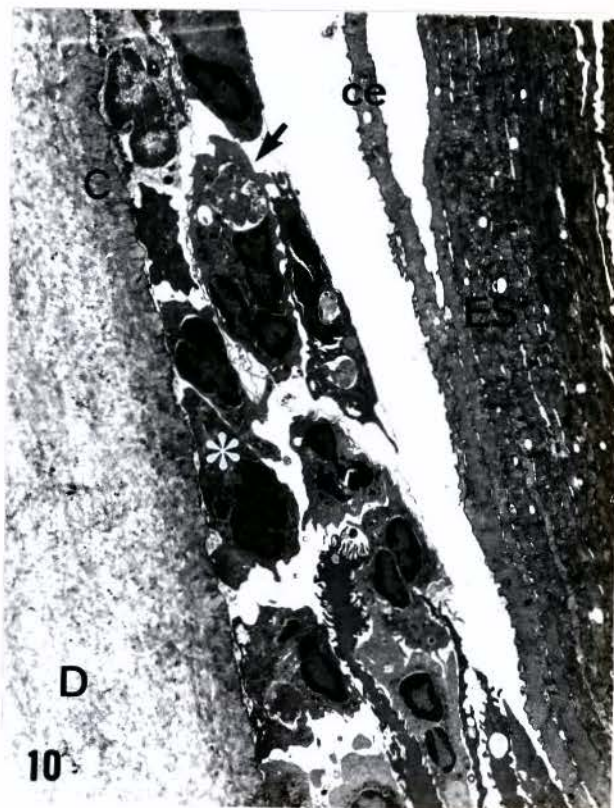
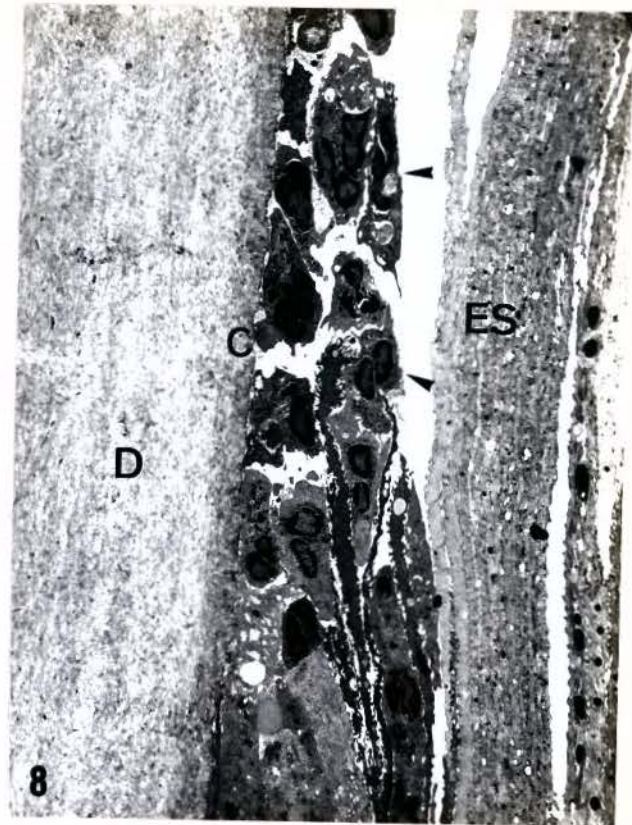
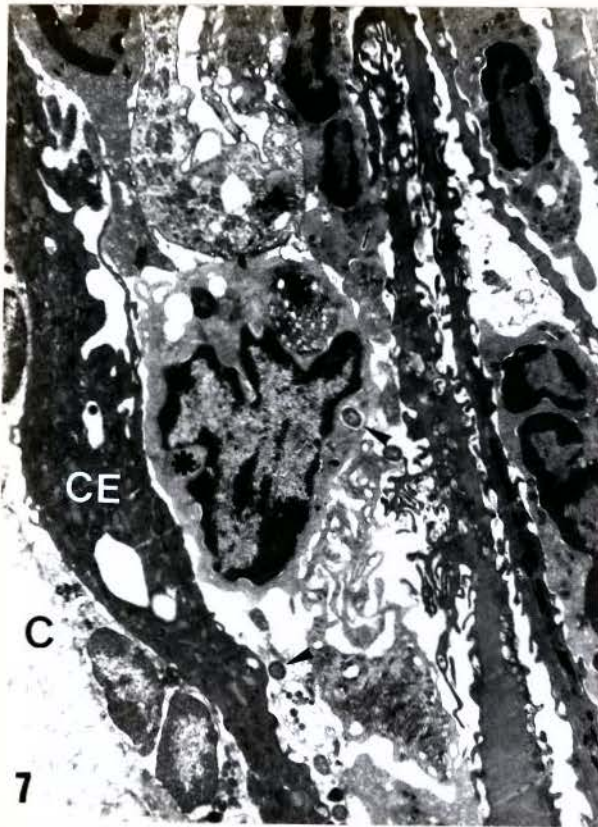


Fig. 11 - Maior aumento da camada de neutrófilos na região do sulco próxima à margem gengival. Entre os PMN observa-se prolongamento de célula epitelial (CE). MET 3000 x.

ES - Epitélio Sucular

C - Cimento

D - Dentina

Fig. 12 - Região do sulco próxima à margem gengival mostrando neutrófilo contendo grande quantidade de bactérias (Seta) num vacúolo citoplasmático. Nas proximidades as células epiteliais (*) não estão bem justapostas indicando processo de descamação. MET 2400 x.

Fig. 13 - Região próxima à margem gengival mostrando neutrófilos com evidentes vacúolos citoplasmáticos (V) contendo material em degradação. Algumas bactérias isoladas estão próximas ao cimento (Seta). No canto superior ^{DIREITO} ~~inferior~~, prolongamentos de células epiteliais também são observadas (*). MET 3000 x.

D - Dentina

C - Cimento

Fig. 14 - Região logo acima da margem gengival mostrando próximo à superfície do cimento bactérias isoladas (Seta) e neutrófilos contendo vacúolos citoplasmáticos (*), provavelmente associados a fagocitose de bactérias. A estrutura vacuolizada e envolvida por membrana, corresponde a célula epitelial descamada e em desintegração (CED). MET 1220 x.

D - Dentina

C - Cimento

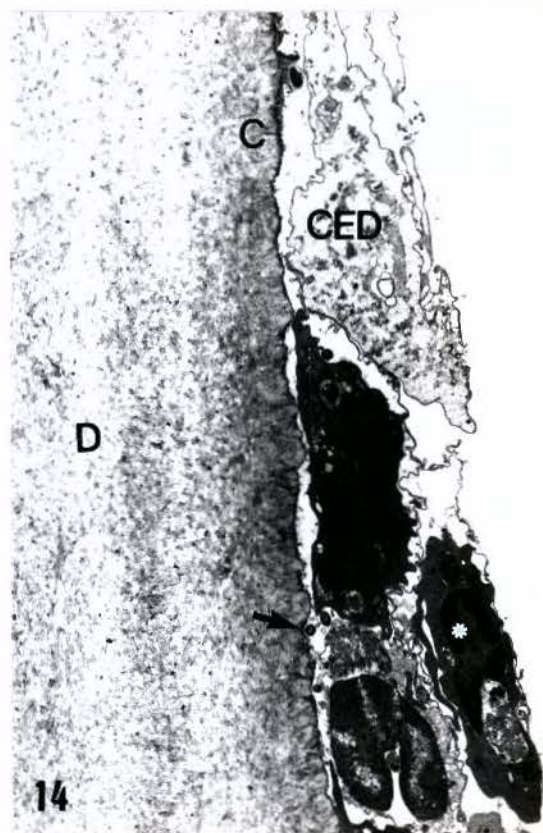
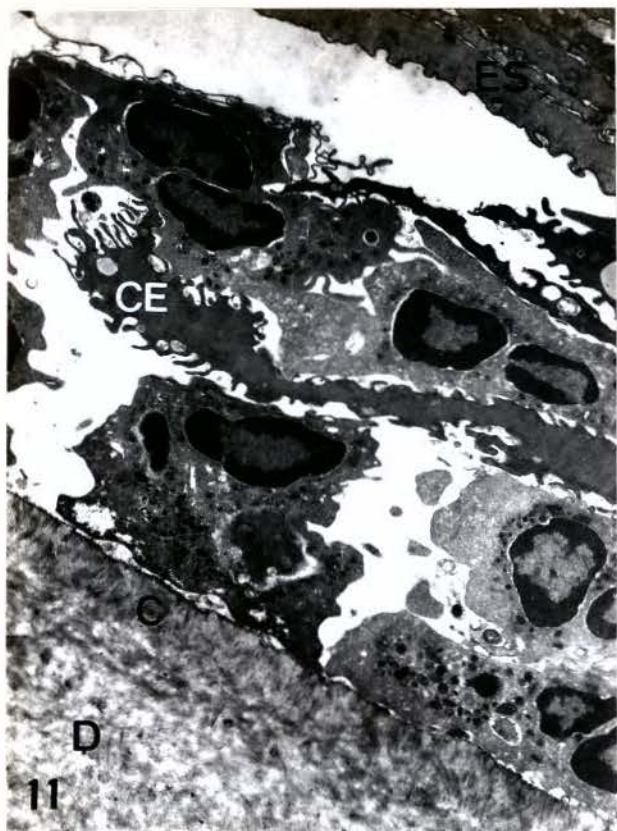


Fig. 15 - Microscopia eletrônica de varredura da região próxima à margem gengival da superfície distal do incisivo inferior de rato. Células epiteliais (CE), assim como material globular (Seta) sugestivo de leucócitos são observados entre a margem gengival (G) e a placa dental (P). A faixa escura (*) bem próxima à gengiva provavelmente corresponde a retração gengival durante o preparo do material. No canto superior direito a placa já está bastante espessa. MEV 450 x.

Fig. 16 - Região próxima à margem gengival onde nota-se grande quantidade de células epiteliais descamadas (CED), aglomerado de leucócitos (L), hemácias (*) e bactérias isoladas ou em pequenos grupos sobre a superfície do cimento (C). MEV 1050 x.

Fig. 17 - Região próxima à margem gengival mostrando sobre o cimento células epiteliais (CE), hemácias (*) e bactérias isoladas ou agrupadas (Setas), formando uma camada delgada de bactérias, correspondentes a fase inicial de formação da placa (P). Nota-se que parte das bactérias são filamentosos MEV 2000 x.

Fig. 18 - Região próxima à margem gengival. Na metade inferior da figura observa-se células epiteliais descamadas (CED), hemácias (Seta) e acúmulos de leucócitos (L) com a superfície do cimento (C) pobre em bactérias. Na metade superior nota-se camada relativamente espessa de placa em diferentes graus de organização (P). MEV 2000 x.

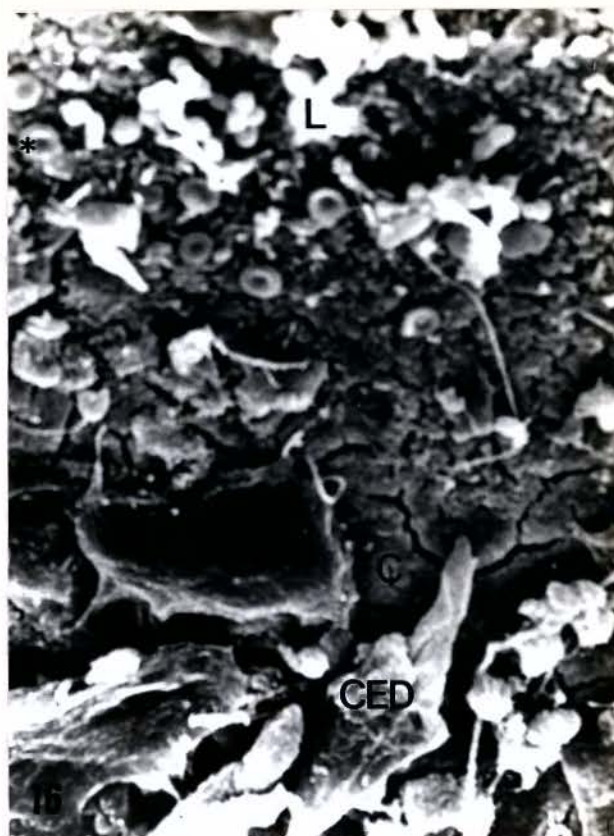


Fig. 19 - Superfície do cemento de incisivo inferior de rato recoberta por delgada camada de bactérias (*), exceto numa pequena área (C). Sobre as bactérias estão vários leucócitos (L) provavelmente PMN, que apresentam evidentes projeções na superfície celular. MEV 8000 x.

Fig. 20 - Placa dental de incisivo de rato, correspondente as fases iniciais de aderência e organização. As bactérias estão frouxamente agregadas e apenas parcialmente envolvidas por matriz intercelular, como ilustrado no canto superior esquerdo (Seta). Nesta área predominam bastonetes e alguns cocos. MEV 12000 x.

Fig. 21 - Microscopia eletrônica de transmissão da superfície do cemento (C) recoberta por monocamada de bactérias com formas predominantemente cocóides. Não se observa película homogênea entre o cemento e a camada de bactérias. MET 3000 x
D - dentina

Fig. 22 - Detalhe da Figura 21 mostrando que a superfície do cemento tem pequenas ondulações, e que a matriz intercelular é escassa. Estruturas membranosas estão apontadas pela seta.
MET 6000 x.
D - Dentina
C - Cimento

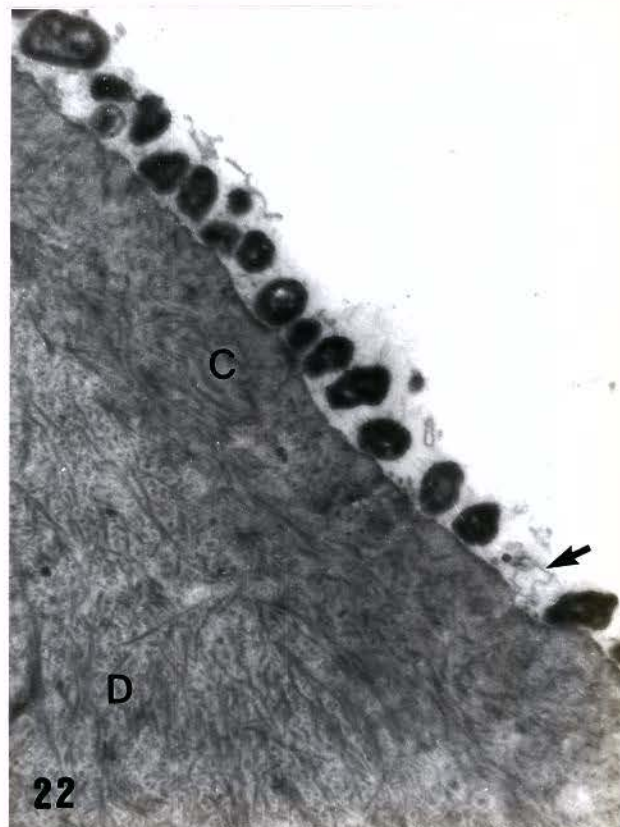
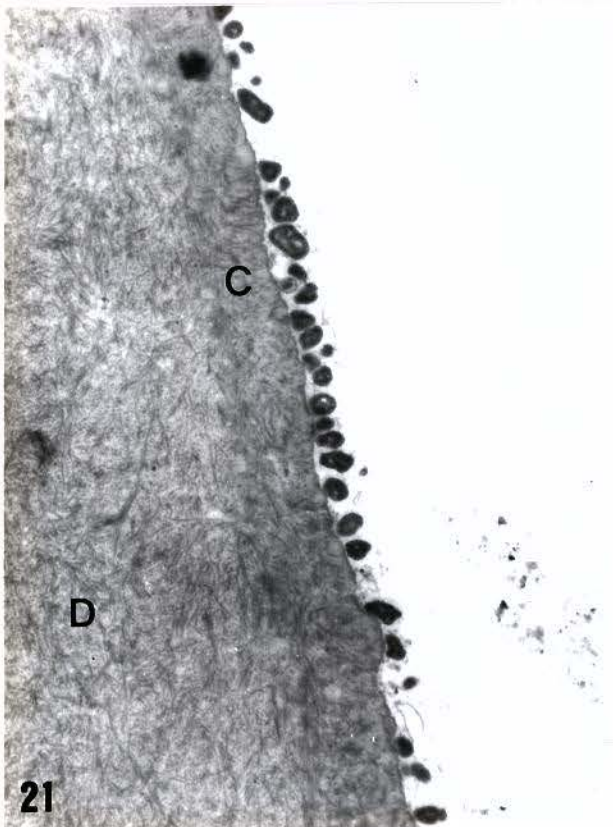
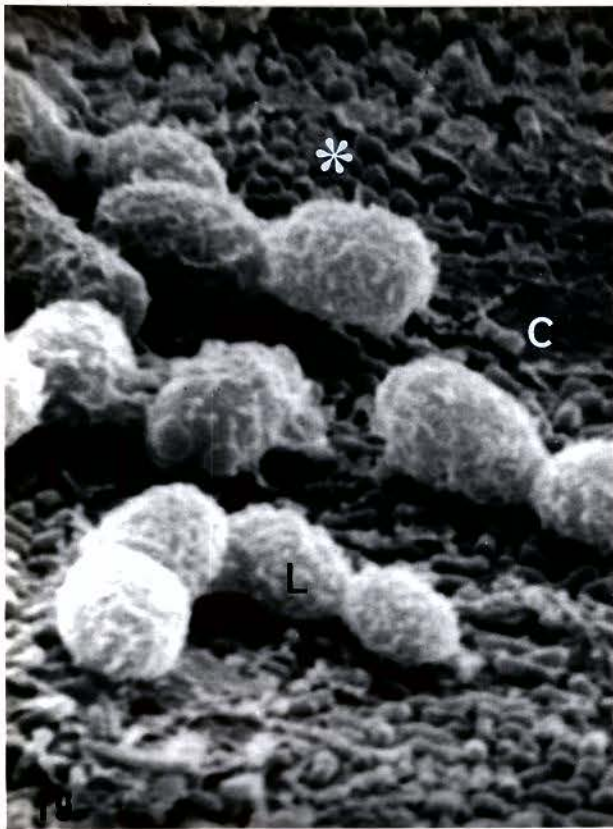


Fig. 23 - Camada delgada de bactérias iniciando a organização da placa dental sobre o cimento. A matriz é de aspecto grnular (*), e as bactérias são principalmente cocos e pequenos bacilos. Na matriz observa-se estruturas membranas (Seta).

MET 6000 x.

D - Dentina

C - Cimento

Fig. 24 - Superfície do cimento recoberta por bactérias. A monocammada se torna espessa a medida que avança para a região incisal. As formas celulares são principalmente cocos e pequenos bacilos. As bactérias estão imersas em matriz intercelular fracamente evidenciada (Seta). MET 1880 x.

D - Dentina

C - Cimento

Fig. 25 - Placa dental em fase de organização mostrando cocos e bacilos imersos numa matriz densa e fibrilar (*). As estruturas fibrilares são observadas nas regiões mais próximas ao cimento e na superfície da placa a matriz é mais frouxa.

MET 6000 x.

D - Dentina

C - Cimento

Fig. 26 - Placa dental em organização com varias camadas de bactérias, principalmente cocos e bacilos. A matriz é bastante densa e rica em estruturas fibrilares (*) orientadas perpendicularmente ao cimento. A superfície da placa é irregular, e algumas bactérias parcialmente envolvidas pela matriz estão aparentemente aderindo ou sendo eliminadas da placa. Algumas bactérias estão em divisão celular (Seta), e nota-se também que o longo eixo das formas bacilares é perpendicular à superfície do cimento. MET 6000 x.

D - Dentina

C - Cimento

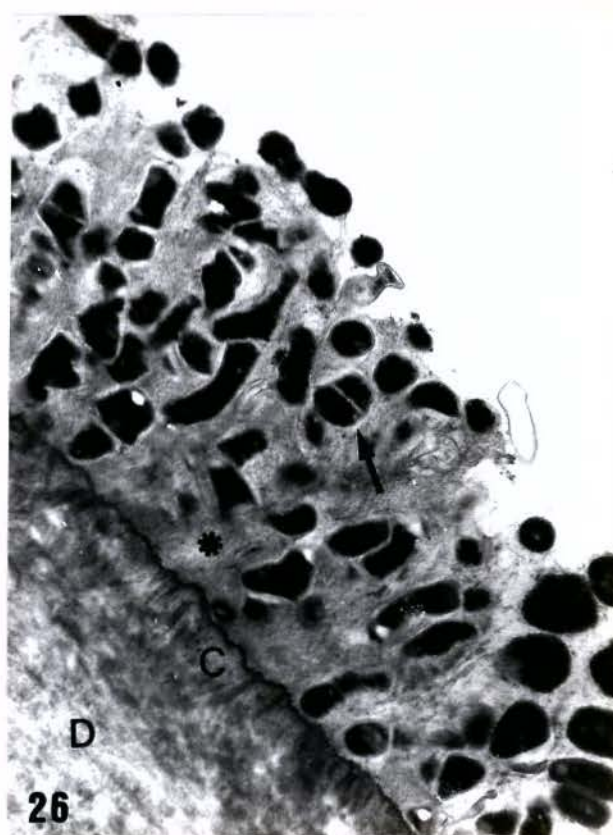
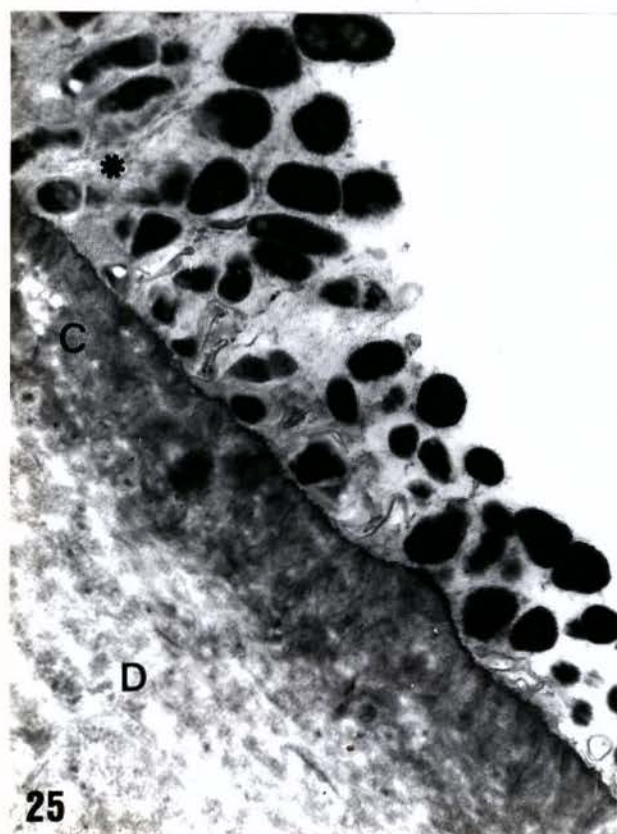
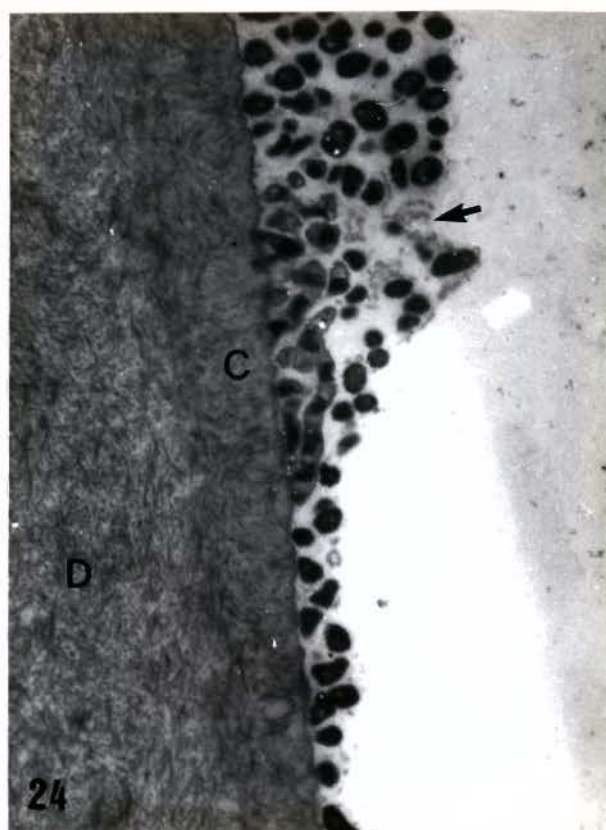
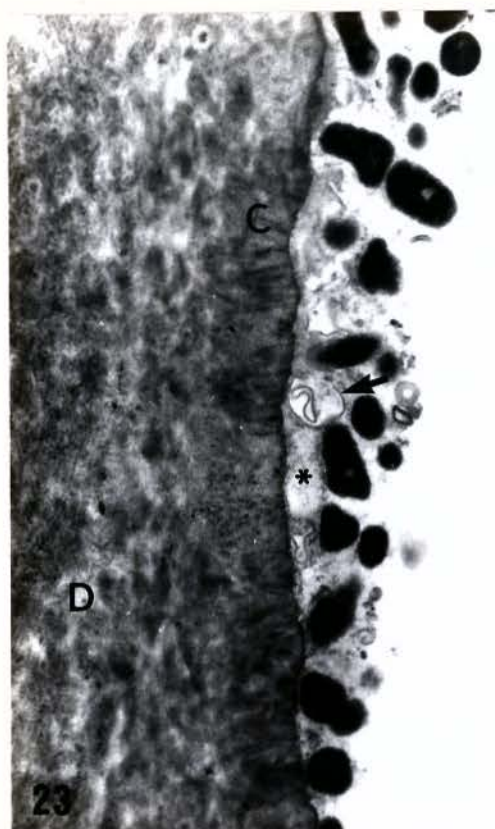


Fig. 27 - Microscopia eletrônica de transmissão da placa dental de incisivo de rato numa região em que atingiu espessura máxima. A densidade das bactérias é variável, assim como os tipos morfológicos e a quantidade de matriz intercelular. A espessura do cimento (C) é de cerca de $4\mu\text{m}$ e da placa de $20\mu\text{m}$. Com exceção do terço superficial, as bactérias estão dispostas perpendicularmente à superfície do dente. Células em divisão celular são vistas principalmente nas áreas próximas ao cimento (Seta). MET 1000 x.

D - Dentina

Fig. 28 - Região semelhante a mostrada na Figura 27, apenas que observada em microscopia eletrônica de varredura. A superfície da placa está formada de vários tipos bacterianos em diferentes graus de agregação. Observa-se em algumas áreas grande quantidade de matriz intercelular (*) recobrindo e unindo as bactérias. Em outras regiões, microrganismos parecem estar flutuando na superfície (Seta). A predominância é de formas filamentosas e bacilares. MEV 10000 x.

Fig. 29 - Porção interna da placa dental mostrando colunas de bactérias cocóides e bacilares perpendiculares à superfície do dente. A substância intercelular (*) é densa e fibrilar, orientada paralelamente às bactérias. Observa-se também bactérias em divisão celular (Seta).

MET 1600 x.

C - Cimento.

Fig. 30 - Região próxima ao cimento mostrando com mais detalhes a matriz intercelular fibrilar (*), as divisões celulares (Seta) e a disposição das bactérias. Nota-se que o cimento não apresenta alteração ou invasão por bactérias. MET 6000 X.

D - Dentina

C - Cimento

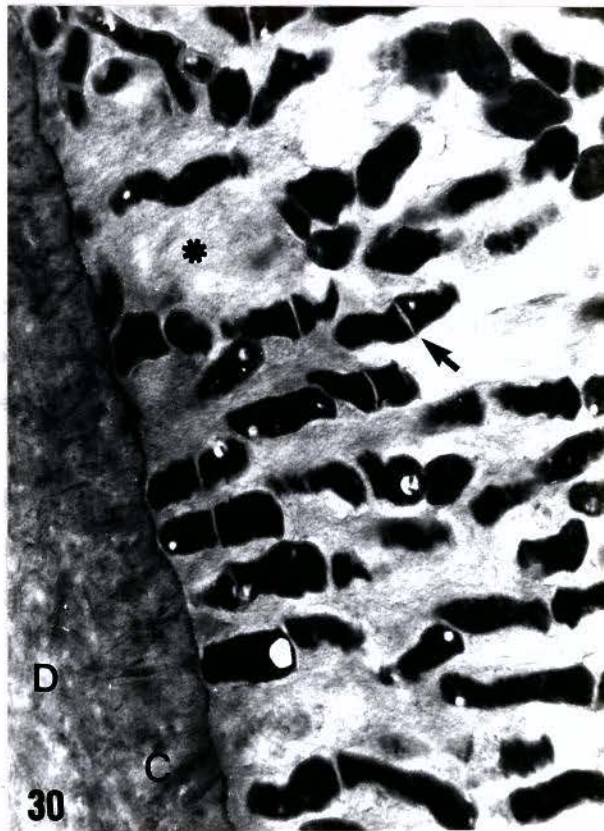
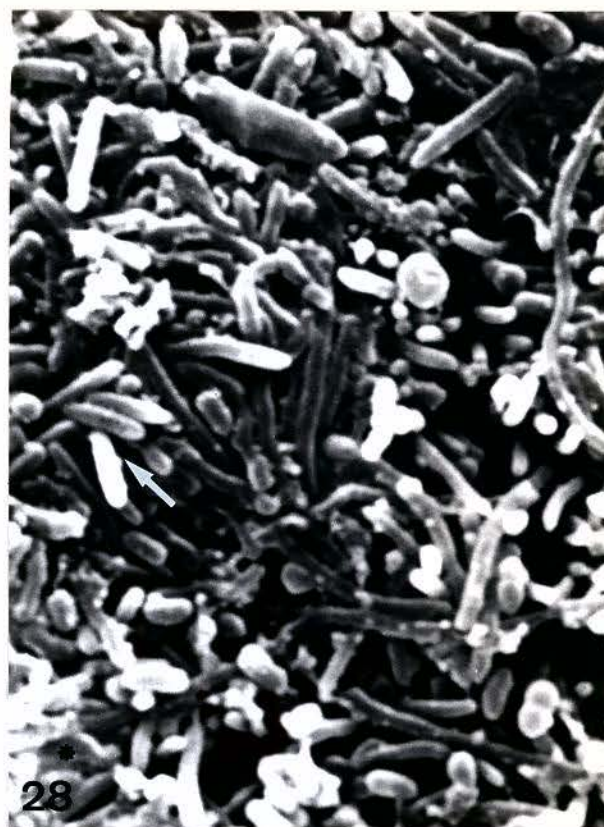
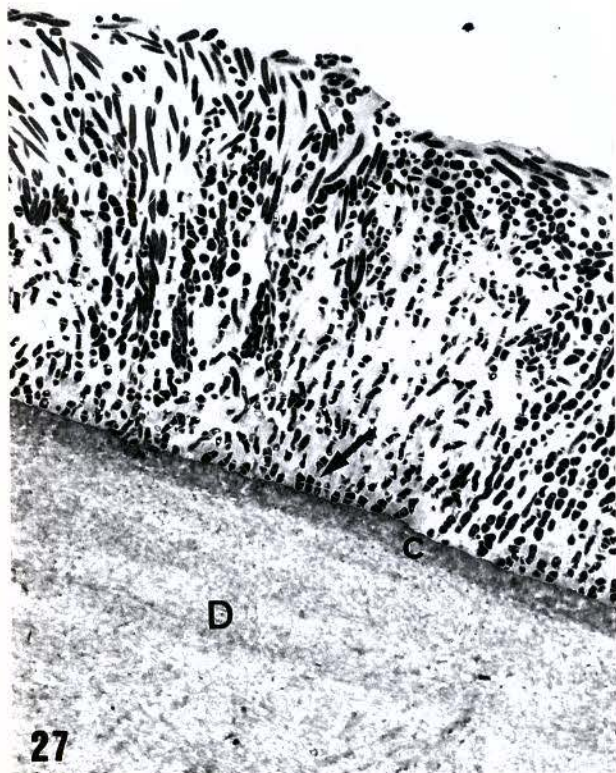


Fig. 31 - Aspecto geral da organização da placa dental, mostrando áreas de intensa condensação bacteriana (*). Na superfície da placa as bactérias estão mais frouxamente agregadas, e algumas aparentemente soltas (Seta). MET 1220 x.

D - Dentina
C - Cimento

Fig. 32 - Região superficial da placa dental com diferentes tipos bacterianos dispostos sem organização definida. A matriz é menos densa, contendo pequenas vesículas (Seta). Algumas bactérias estão aparentemente soltas sobre a superfície da placa (*). MET 6000 x.

Figs. 33 e 34 - Estas figuras mostram com mais detalhes que nas regiões próximas à superfície da placa a matriz é menos densa e fibrilar do que nas áreas próximas ao cimento, apresentando também estruturas vesiculares (V). Os variados tipos bacterianos não apresentam orientação definida, assim como bactérias em divisão celular não são evidentes. MET 10000 x.

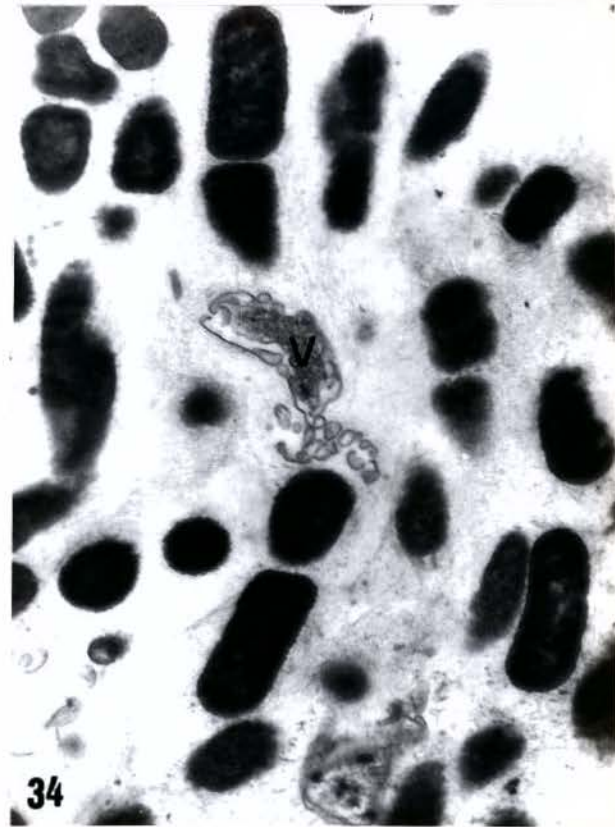
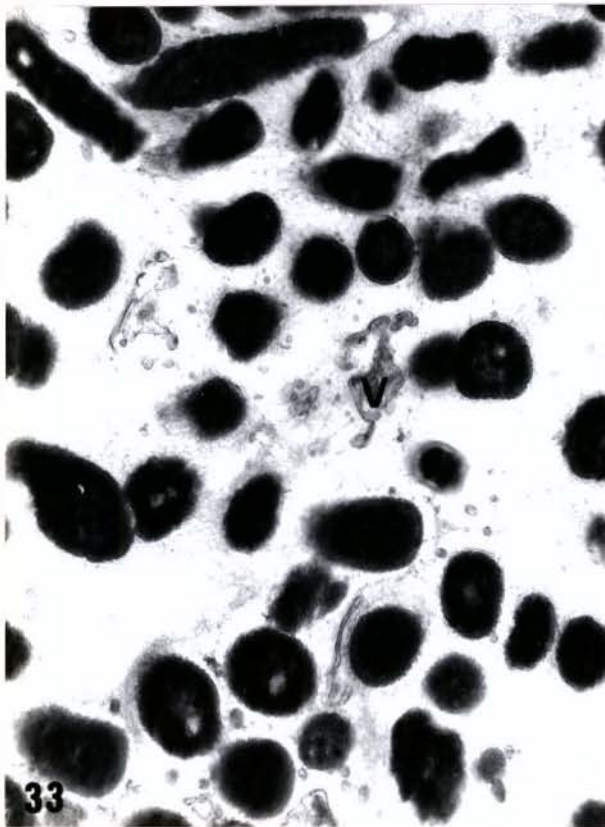
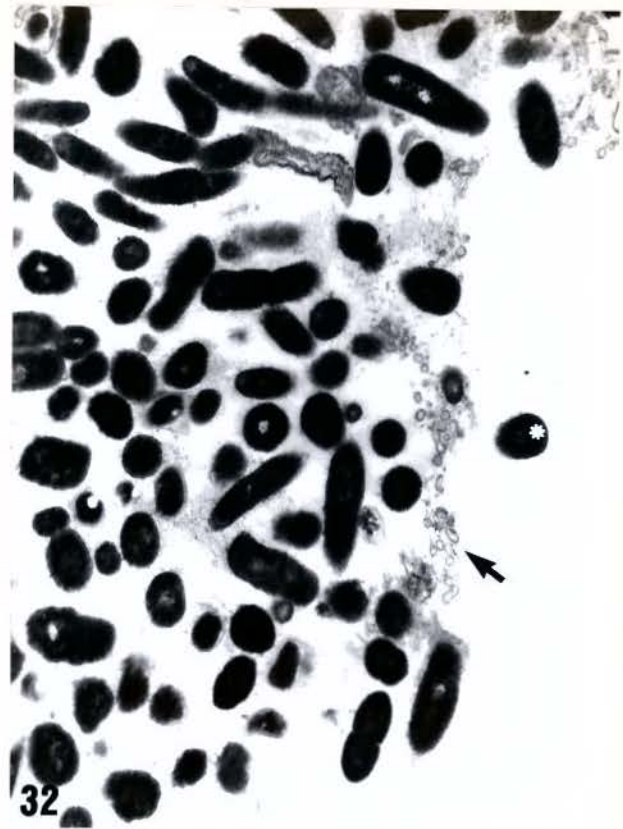
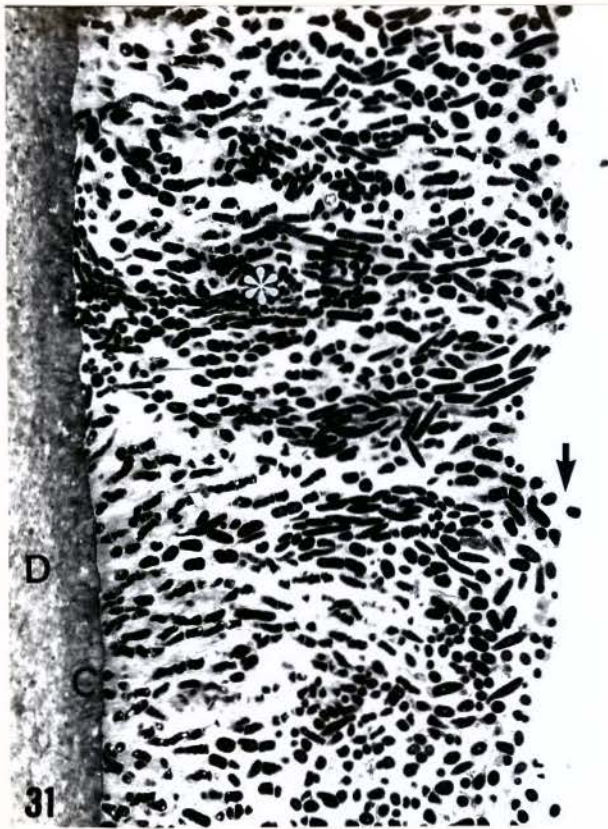


Fig. 35 - Microscopia eletrônica de varredura do terço incisal do incisivo de rato, mostrando destruição da placa dental, com diminuição na quantidade e organização das bactérias, até o cimento (C) ficar praticamente sem microrganismos. Nesta área as bactérias podem ser vistas isoladamente ou formando pequenos agregados (Seta).

MEV 2000 x.

Fig. 36 - Microscopia eletrônica de varredura da área de destruição da placa dental, mostrando o cimento (C) irregularmente coberto por bactérias. Os microrganismos estão frouxamente agregados, indicando pequena quantidade de matriz intercelular. MEV 4000 x.

Fig. 37 - Região de destruição da placa dental em microscopia eletrônica de transmissão com a matriz intercelular (*) em desorganização, e poucas bactérias, sendo que algumas parecem estar se soltando da matriz (Seta).

MET 6000 x.

C - Cimento

Fig. 38 - Área de destruição da placa dental onde a maioria das bactérias parece estar na superfície da matriz desorganizada. Entre o cimento (C) e as bactérias nota-se vacúolos delimitados por membranas irregulares (Seta).

MET 3000 x.

D - Dentina

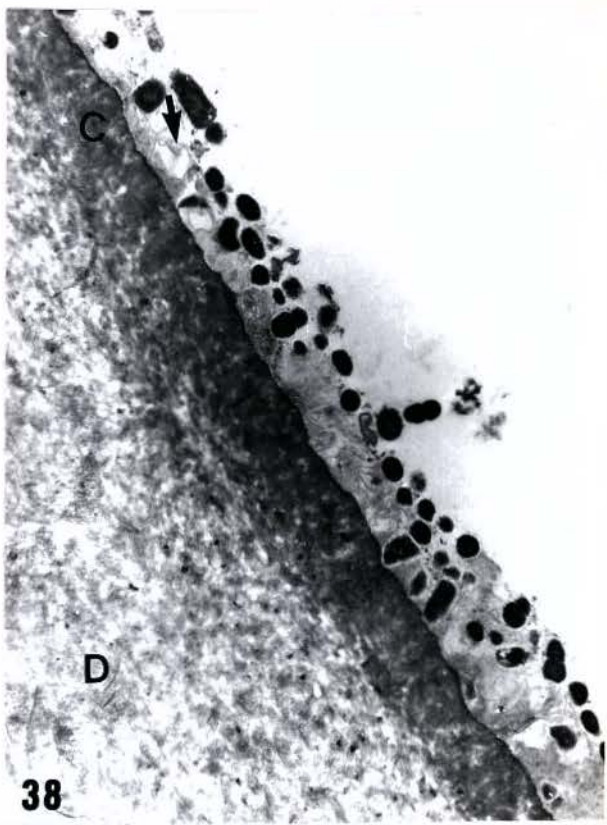
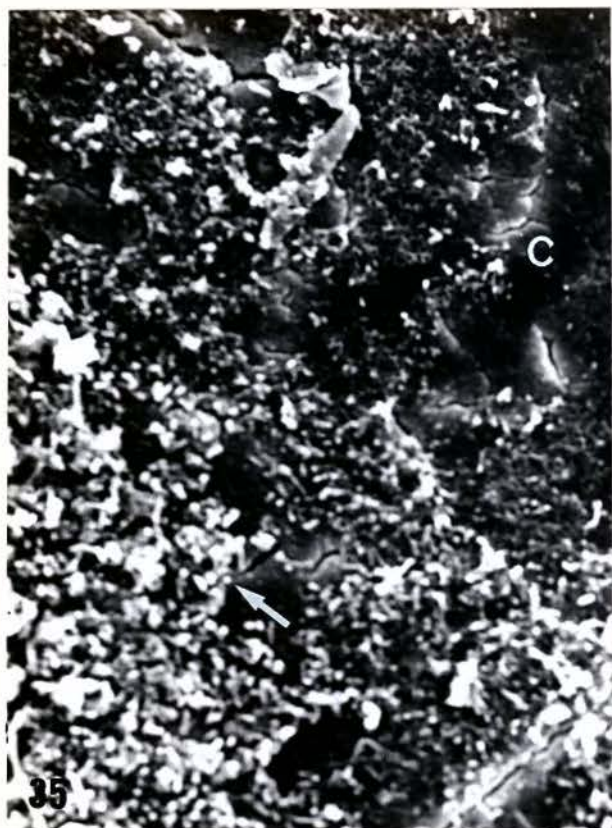


Fig. 39 - Microscopia eletrônica de varredura da porção final da placa sobre a superfície incisal do cimento onde se observa poucas bactérias formando "ilhas" e cimento destituído de bactérias (C). MEV 2000 x

Fig. 40 - Microscopia eletrônica de varredura da região final da placa onde algumas bactérias foram deslocadas deixando cavidades (Seta) na matriz ainda presente na superfície do cimento (C). MEV 16000 x.

Fig. 41 e 42 - Área de destruição da placa dental com poucas bactérias e escassa matriz intercelular. A matriz mostra várias estruturas membranosas (Setas). Observa-se também que a matriz perdeu o aspecto fibrilar (*), sugerindo destruição. Na figura 42 uma das bactérias (B) mostra vesículas associadas à sua superfície.

MET 10000 e 19000 x.

C - Cimento

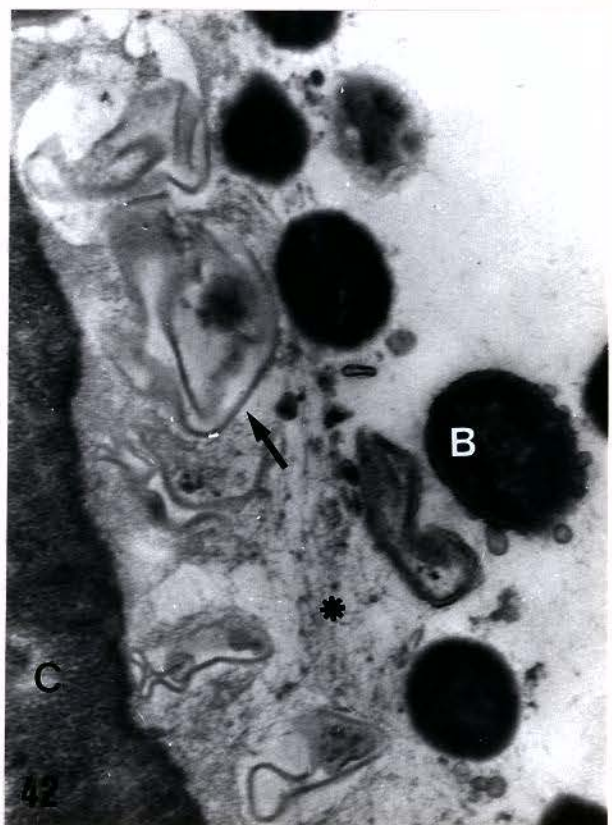
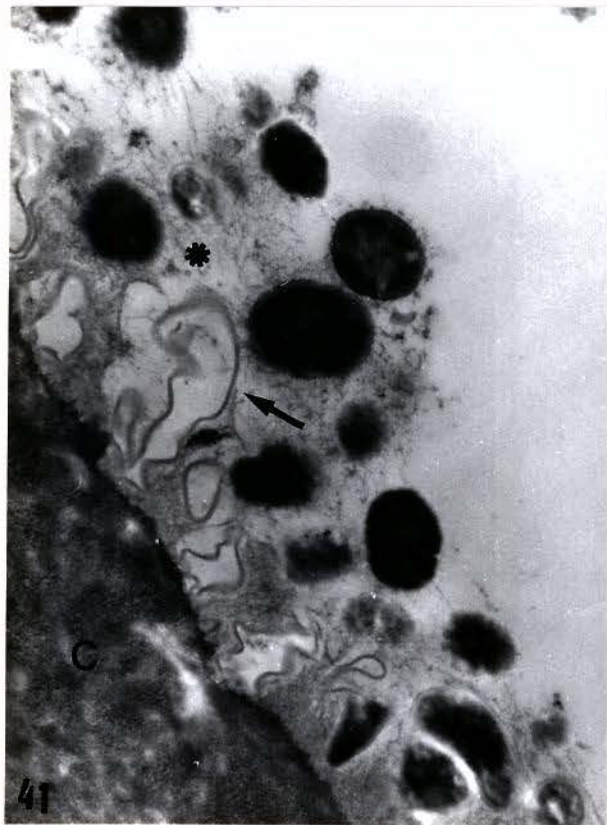
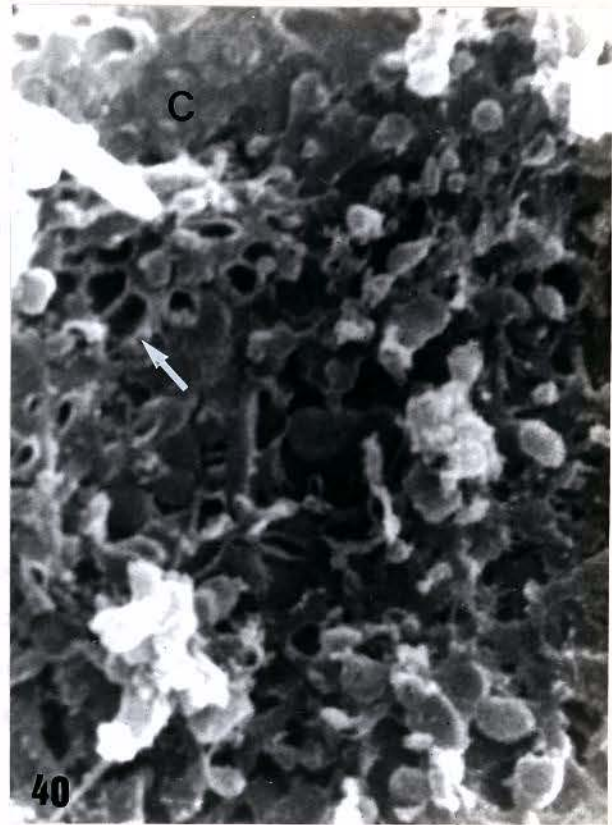
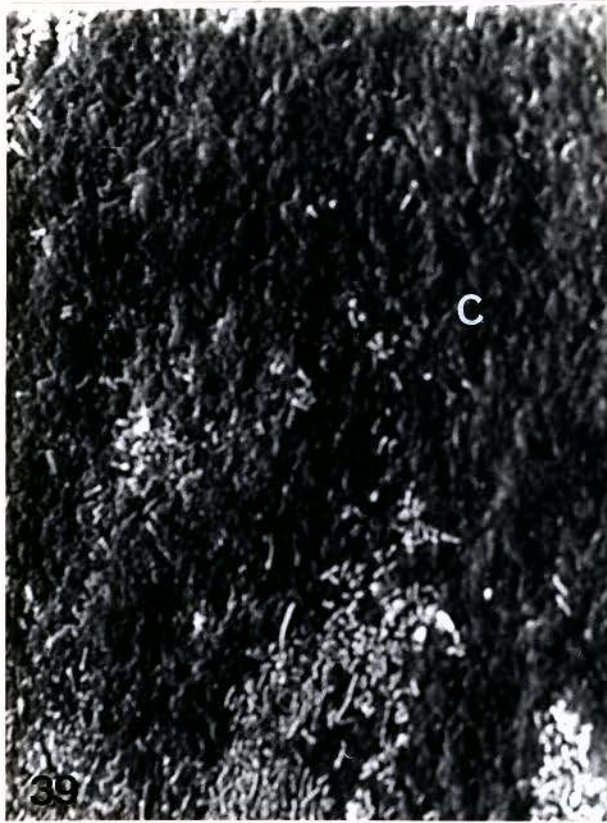


Fig. 43 - Zona de destruição da placa dental, mostrando na matriz intercelular em contato com o cimento (C) pequenas cavidades adjacentes dando aspecto de "favo de mel" (*). Ainda são observadas algumas bactérias sobre a matriz (Seta). MEV. 10500 x.

Fig. 44 - Área de destruição da placa dental com a matriz apresentando-se bastante desorganizada, sem características fibrilares, com vacúolos delimitados por estruturas membranosas (*) e cavidades (Seta) deixadas provavelmente pelas bactérias que foram eliminadas. MET 6000 x.

D - Dentina

C - Cimento

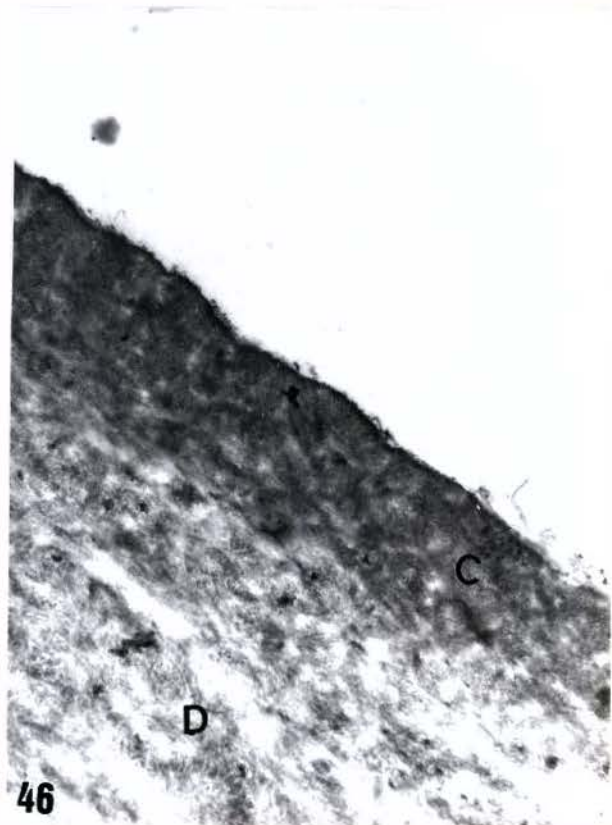
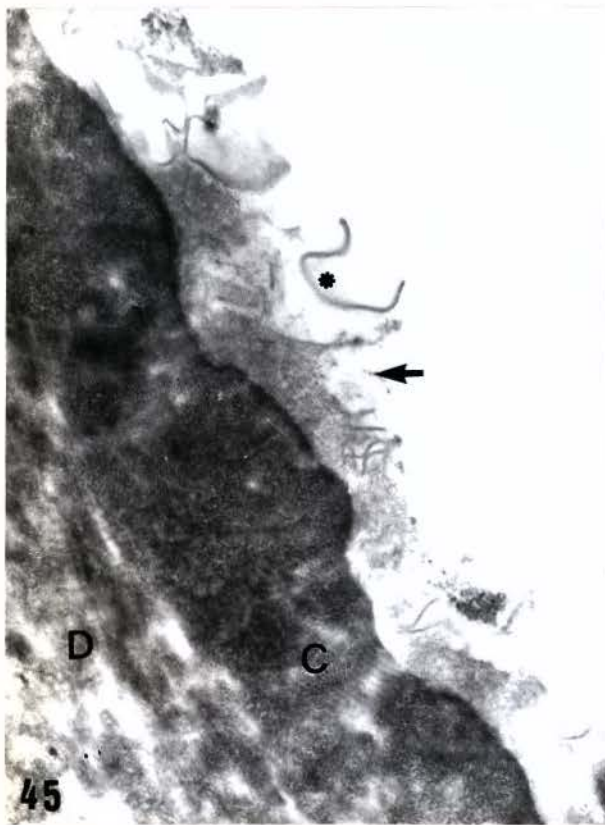
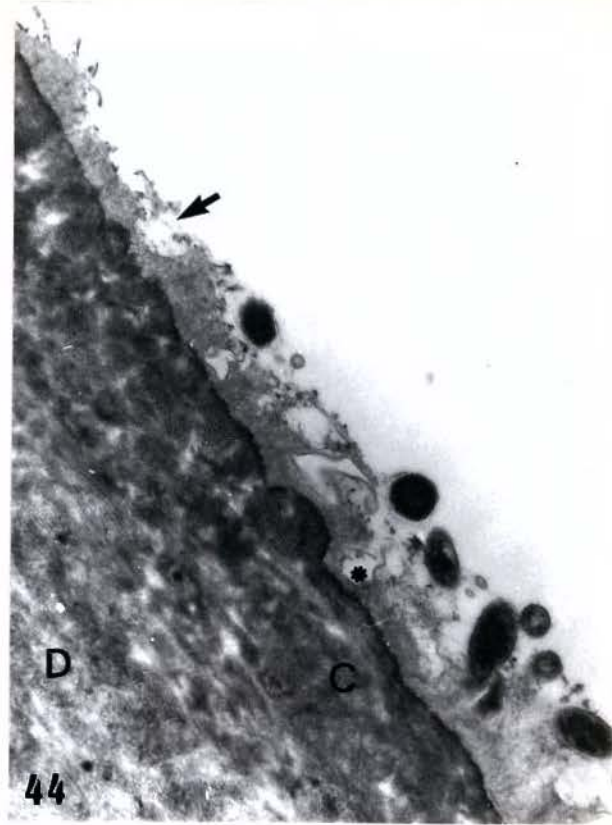
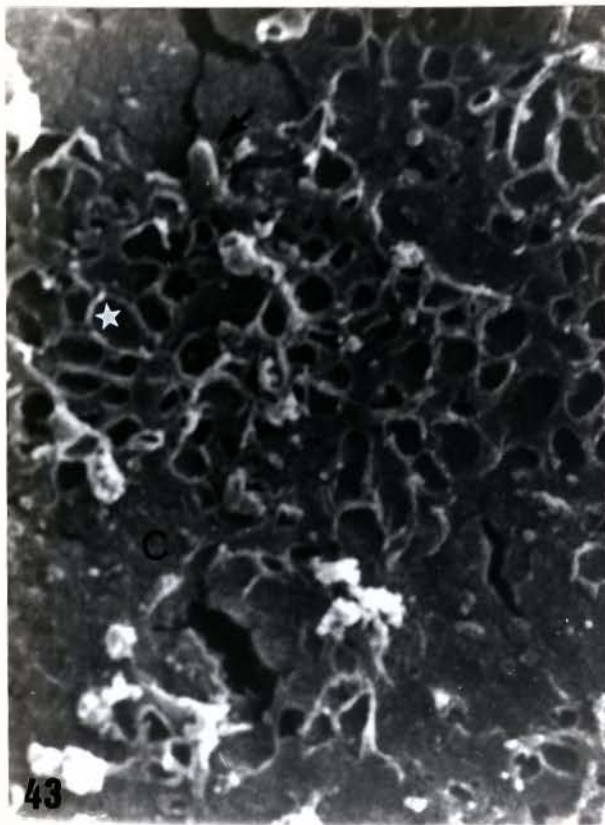
Fig. 45 - Área final de destruição da placa onde não se nota a presença de bactérias, restando apenas uma matriz delgada e desorganizada, com estruturas membranosas (*) e cavidades onde provavelmente as bactérias estavam alojadas (Seta). MET 10000 x.

D - Dentina

C - Cimento.

Fig. 46 - Porção incisal do cimento (C) que se apresenta livre de bactérias e matriz intercelular. O cimento não apresenta sinais de alteração morfológica. MET. 6000 x.

D - Dentina



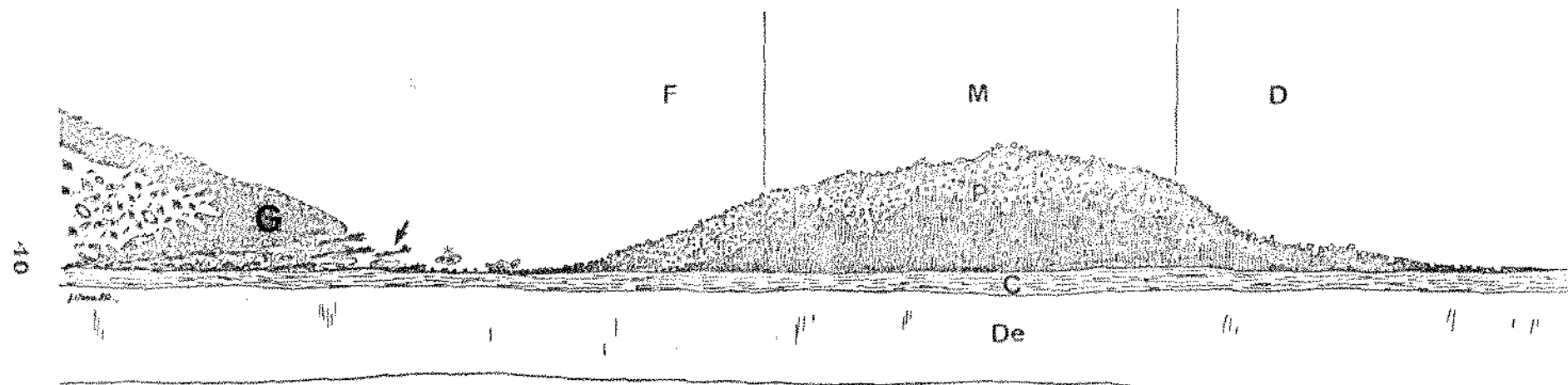


FIG. 47 - Esquema do incisivo inferior de rato mostrando a gengiva (G), neutrófilos (*), células epiteliais descamadas (Seta) e a placa dental (P) sobre a superfície do cemen-
to (C).

De - Dentina

F - Formação da placa

M - Maturação da placa

D - Destruição da placa

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Vários modelos tem sido utilizados para o melhor conhecimento da formação e organização da placa dental, entretanto em nenhum é possível observar simultaneamente a formação, organização e degradação da placa. O incisivo de rato, por ser de crescimento contínuo, é um modelo que permite estas observações, sendo a placa formada e destruída continuamente num espaço relativamente curto de tempo. No incisivo há formação de placa sobre o esmalte e cimento, e este trabalho foi realizado no cimento pela maior facilidade da feitura de um estudo paralelo em Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.) e Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.). Apesar das vantagens oferecidas pelas particularidades deste modelo, obviamente não é adequado para estudos que envolvam a formação da placa por períodos longos ou na região subgingival. SCHEMEHORN e cols., (1984) foram os únicos autores a utilizar o incisivo de rato para o estudo macroscópico "in vivo" da placa dental, demonstrando que o modelo é adequado para o teste de substâncias antimicrobianas usadas na prevenção a placa dental.

Na superfície distal do incisivo a placa tem comprimento de cerca de 2mm, sendo a erupção do dente 0,43mm/dia (TSE e cols., 1987), portanto a formação e destruição da placa ocorre em aproximadamente 4-5 dias. Como o incisivo é de crescimento contínuo, a placa é apenas supragengival e na região logo acima da margem gengival observa-se bactérias isoladas, além de leucócitos e células epiteliais descamadas. Os leucócitos são quase que exclusivamente neutrófilos, contendo frequentemente bactérias fagocita

das e vacúolos citoplasmáticos com material em degradação. Pela intensa atividade fagocitária, é possível que os PMN neutrófilos tenham participação no controle da aderência bacteriana na região adjacente a margem gengival, o que não deve ocorrer nas demais fases de formação da placa.

Em condições de neutropenia o tecido gengival torna-se mais inflamado, entretanto não há necessariamente maior quantidade de placa dental, indicando que os PMN são mais importantes para a manutenção da saúde gengival, do que para o controle da placa dental (MILLER, LAMSTER E CHASENS, 1984).

A película inicialmente depositada sobre o cimento tem estrutura granular, tornando-se mais densa e fibrilar com a presença de bactérias, que portanto modificam a estrutura e composição do material aderido ao cimento (NYVAD e FEJERSKOV, 1987 a,b). A colonização inicial foi descrita por vários autores (THEILADE, 1970; BRECX e cols., 1981; NYVAD e FEJERSKOV, 1987 a,b; CARASSI e cols., 1989), sendo que 64-90% dos microrganismos são cocos gram positivos, e resultados semelhantes foram descritos neste trabalho. Deve-se considerar que as formas cocoides, bacilares e mesmo filamentosas podem ser de uma mesma bactéria pleomórfica, como o *Aviscosus*, dependendo das condições em que está vivendo (BERTHOLD, LAI e LISTGARTEN, 1982). Posteriormente o cimento fica recoberto por monocamada de bactérias, com aumento gradativo de espessura, atingindo rapidamente um máximo que mantém-se relativamente constante, até atingir 20µm, sugerindo que fatores locais não permitem um crescimento contínuo, apesar do tempo ser curto. Nas regiões mais próximas ao cimento, o aumento da placa deve

ocorrer principalmente por divisões celulares resultando na formação de microcolônias perpendiculares à superfície do dente (LISTGARTEN, MAYO e TREMBLAY, 1975). Por outro lado, nas regiões superficiais da placa a disposição menos organizada das bactérias, assim como a variedade morfológica indicam que a incorporação de células está ocorrendo. As Figs. 28 e 32 deste trabalho mostram bactérias envolvidas em maior ou menor quantidade de matriz, e bactérias aparentemente flutuando sobre a placa sugerindo que estão sendo incorporadas ou eliminadas. Na superfície da placa deve ocorrer constantemente a aderência e eliminação de bactérias e outras substâncias, como as vesículas observadas na matriz, cuja natureza não foi possível esclarecer. A adesão das bactérias em qualquer superfície parece ocorrer em duas etapas, uma inicial que é reversível, e a segunda mais estável (MARSHALL, STOUT e MITCHELL, 1971), o mesmo devendo ocorrer na superfície do cimento e da própria placa. Interações entre as bactérias como as formações em "espiga de milho", que consistem em filamentosos cobertos de cocos, como descrito por JONES (1971, 1972), não foram identificadas, provavelmente devido ao tempo curto de maturação da placa neste modelo.

Os aspectos morfológicos sugerem que a destruição da placa é abrupta, pois rapidamente há passagem de áreas de placa organizada, para regiões onde as bactérias formam pequenos aglomerados ou já estão ausentes. Nestas áreas o cimento está parcialmente recoberto por matriz intercelular, apresentando concavidades que no conjunto dão aspecto de favo de mel. Este aspecto sugere que a matriz está firmemente aderida ao cimento, apesar da M.E.T.

mostrar que a desorganização é acentuada. Na literatura não há citação desta característica da placa dental. Os mecanismos que causam a destruição da placa dos incisivos não são conhecidos, e é possível que o principal seja a ação mecânica da mastigação, com ou sem a participação de fatores locais. Provavelmente há menor fluxo salivar no terço incisal, e os nutrientes da placa são principalmente oriundos da saliva (CARLSSON, 1980). De acordo com QUIRYNEN e van STEENBERGHE (1989), há menor formação de placa durante a noite, provavelmente associado ao menor fluxo salivar. Observações preliminares em nosso laboratório demonstraram que ratos xerostômicos praticamente não formam placa sobre a superfície do cimento. Em conclusão, pode-se dizer que a placa de incisivo apresenta características intermediárias entre a que se forma por tempo longo sobre a superfície de dentes de crescimento não contínuo, e a aderência de bactérias em células epiteliais que sofrem descamação, onde a aderência bacteriana precisa ser renovada continuamente.

RESUMO

RESUMO

Os aspectos ultraestruturais da placa dental do incisivo inferior de rato foram estudados através da microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Na região imediatamente acima da margem gengival, cocos e bacilos formam uma monocamada que por multiplicação e deposição de novas bactérias atinge uma espessura de 20µm. Na placa madura, o terço interno é rico em matriz fibrilar, com as bactérias formando microcolônias perpendiculares à superfície do dente. Na porção superficial a morfologia bacteriana é mais variada, com as bactérias dispostas irregularmente numa matriz frouxa e menos fibrilar. A destruição da placa ocorre no terço incisal do dente, com o cemento recoberto por grupos isolados de bactérias e matriz apresentando cavidades com aspecto de favo de mel. O incisivo de rato é um modelo único que permite um estudo simultâneo de formação, organização e destruição da placa dental.

SUMMARY

SUMMARY

The ultrastructural features of dental plaque on the rat mandibular incisors were studied by both transmission and scanning electron microscopy. Close to the gingival margin mainly cocci and short rods colonized the cementum surface individually, forming rapidly a monolayer like a carpet. The maximum thickness of the mature plaque was about $20\mu\text{m}$, with the inner third rich in fibrillar matrix and the organisms forming microcolonies perpendicular to the tooth surface. The bacterial population on the surface of the plaque was more varied, with the cells haphazardly distributed in a loose matrix. On the area of plaque desorganization the cementum was covered by isolated groups of bacteria and the matrix presented holes with a structure similar to a honeycomb. It is concluded that the rat mandibular incisor is a unique model to study simultaneously the pattern of colonization, maturation and degradation of dental plaque.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHOLD, P. Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. An electron microscopic study. J.Periodontol., 50: 397-405, 1979.
- BERTHOLD, P.; LAI, C.H. and LISTGARTEN, M.A. Immuno-electron microscopic studies of *Actinomyces viscosus*. J.Periodont.Res., 17: 26-40, 1982.
- BIRKED, D.; ROSELL, K.G. and GRANATH, K. Structure of extracellular water-soluble polysaccharides synthesized from sucrose by oral strains of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. Arch.Oral.Biol., 24: 51-53, 1979.
- BOYD, A. and WILLIAMS, R.A.D. Estimation of the volumes of bacterial cells by scanning electron microscopy. Arch.Oral.Biol., 16: 259-267, 1971.
- BRECX, M.; RONSTROM, A.; THEILADE, J. and ATTSTROM, R. Early formation of dental plaque on plastic films. Electron microscopic observations. J.Periodont.Res., 16: 213-227, 1981.
- CARASSI, A.; SANTARELLI, G. and ABATI, S. Early plaque colonization on human cementum. J.Clinic.Periodontol., 16: 265-267, 1989.
- CARLSSON, J. Symbiosis between host and micro-organisms in the oral cavity. Scand.J.Infec.Dis.Suppl., 24: 74-78, 1980.
- DOBELL, C. Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals". New York, Harcourt Brace and Co., 1932, p. 237-255.

- DZINK, J.L.; SOCRANSKY, S.S. and HAFFAJEE, A.D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive periodontal lesions. J.Clin.Periodontol., 15: 316-323, 1988.
- ELLEN, R.P. and BALZERAK-RACZJOWSKI, I.B. Interbacterial aggregation of *A.naesei* and dental plaque streptococci. J.Periodont.Res., 12: 11-20, 1977.
- FITZGERALD, R.J. Plaque microbiology and caries. Alab.J.Med.Sciences, 5: 239-246, 1968.
- FRANK, R.M. and BRENDEN, A. Ultrastructure of the approximal dental plaque and the underlying normal and carious enamel. Arch.Oral.Biol., 11: 883-912, 1966.
- GENCO, R.J.; EVANS, R.T. and ELLISON, S.A. Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. J.Amer.Dent.Ass., 78: 1016-1020, 1969.
- GIBBONS, R.J. Mechanisms of interbacterial adhesion of potential importance in plaque formation. In: MCHUGH, W.D. Dental plaque. Livingstone, Ed. Edinburgh, 1970.
- GIBBONS, J. Adhesion interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J.Dent.Res., 63: 378-385, 1984.
- GIBBONS, R.J.; SOCRANSKY, D.S.; De ARAUJO, W.C. and van HOUTE, J. Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque. Arch.Oral.Biol., 9: 365-370, 1964.
- GIBBONS, R.J. and NYGAARD, M. Interbacterial aggregation of plaque bacteria. Arch.Oral.Biol., 15: 1397-1400, 1970.
- GIBBONS, R.J. and van HOUTE, J. On the formation of dental plaques. J.Periodontol., 44: 347-360, 1973.

- GIBBONS, R.J. and van HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann.Rev.Microbiol., 29: 19-44, 1975.
- GREENSTEIN, G. and POLSON, A. Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal diseases. J.Periodontol. 56: 740-747, 1985.
- HAGEAGE, G.J.Jr.; JOHANSEN, I. and TANZER, J.M. "In vitro" plaque formation by several oral diphtheroids implicated in periodontal disease. Infect Immun., 2: 683-687, 1970.
- HOTZ, P.; GUGGENHEIM, B. and SCHMID, R. Carbohydrates on pooled dental plaque. Caries Res., 6: 103-121, 1972.
- IMFELD, T. Scanning electron microscopy of plaque colonization on indwelling glass electrodes. Caries Res., 17: 461-465, 1983.
- JOHNSON, N.W.; GRIFFITHS, G.S.; WILTON, J.M.A.; MAIDEN, M.F.J.; CURTIS, M.A.; GILLET, I.R.; WILSON, D.T. and STERNE, J.A.C. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Evidence for the existence of high-risk groups and individual and approaches to their detection. J.Clin.Periodontol., 15: 276-282, 1988.
- JONES, S.J. Natural plaque on tooth surfaces: A scanning electron microscope study. Apex.J.Univ.Coll.Hosp.Soc., 5: 95-98, 1971.
- JONES, S.J. A special relationship between spherical and filamentous microorganisms in mature human dental plaque. Arch.Oral.Biol., 17: 613-616, 1972.

- JORDAN, H.V. and HOWELL, A. Nutritional control of cellular morphology in an aerobic actinomycete from the hamster. J.Gen. Microbiol., 38: 125-130, 1965.
- KELSTRUP, J. and THEILADE, W. Microbes and periodontal disease. J.Clin.Periodontol., 1: 15-35, 1974.
- KRASSE, B. The proportionomal distribution of *Streptococcus salivarius* and other Streptococci in carious parts of the mouth. Odont.Revy., 5: 241-261, 1954.
- KRASSE, B. A review of the bacteriology of dental plaque. In: McHUGH, W.D. Dental plaque. Livingstone, Ed. Edinburgh, 1970, p. 199-206.
- KRASSE, B. Microbiology of the gingival. In: LEHNER, T. The borderland between caries and periodontal disease. London, Academic Press, 1977, p. 5-12.
- LAIRD, W.R.E. and GRANT, A.A. Dental bacterial plaque. Int.J. Biochem., 15: 1095-1102, 1983.
- LAVANCHY, D.L.; BICKEL, M. and BAEHNI, P.C. The effect of plaque control after scaling and root planing on the subgingival microflora in human periodontitis. J.Clin.Periodontol., 14: 295-299, 1987.
- LEACH, S.A. A review of the biochemistry of dental plaque. In: McHUGH, W.D. Dental plaque. Livingstone, Ed. Edinburch, 1969, p. 143-156.
- LEACH, S.A. and SAXTON, C.A. An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. Arch.Oral.Biol., 11: 1081-1094, 1966.

- LIE, T. Ultrastructural study of garly dental plaque formation. J.Periodont.Res., 13: 391-409, 1978.
- LILJENBERG, B. and LINDHE, J. Juvenile periodontitis: Some microbiological, histopathological and clinical characteristics. J.Clin.Periodontol., 7: 48-61, 1980.
- LISTGARTEN, M.A. Structure of surface coatings on teeth. A review. J.Periodontol., 47: 139-147, 1976.
- LISTGARTEN, M.A. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. J.Clin.Periodontol., 15: 485-487, 1988.
- LISTGARTEN, M.A. and HANEGHAN, J.B. Observations on the periodontium and acquired pellicle of adult germ free dogs. J.Periodontol., 44: 85-91, 1973.
- LISTGARTEN, M.A.; MAYO, H.E. and TREMBLAY, R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. J.Periodontol., 46: 10-25, 1975.
- LOESCHE, W.J. and SYED, S.A. Bacteriology of human experimental gingivitis score. Infect.Immun., 21: 830-839, 1976.
- LOESCHE, W.J.; SYED, S.A.; LAUGHON, B.E. and STOLL, J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J.Periodontol., 53: 221-230, 1982.
- MAGNUSSON, I.; LINDHE, J.; YONEYAMA, T. and LILJENBERG, B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. J.Clin.Periodontol., 11: 193-207, 1984.

- MAIDEN, M.F.J.; CARMAN, R.J.; CURTIS, M.A.; GILLET, I.R.; GRIFFITHS, G.S.; STERNE, J.A.C.; WILTON, J.M.A. and JOHNSON, N.W. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers based on the microbiological analysis of subgingival plaque. J.Clin.Periodontol., 17: 1-13, 1990.
- MANDEL, I.D. Plaque and calculus. Alab.J.Med.Sciences, 5: 313-317, 1968.
- MARSHALL, K.C.; STOUT, R. and MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. J.Gen.Microbiology, 68: 337-348, 1971.
- MAYHALL, C.W. Composition and source of acquired enamel pellicle. Arch.Oral.Biol., 15: 1327-1341, 1970.
- MILLER, D.R.; LAMSTER, I.B. and CHASENS, A.I. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. J.Clin.Periodontol., 11: 1-15, 1984.
- McDERMID, A.S.; McKEE, A.S. and MARSH, P.D. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of bacteroides gingivalis W50. Infect.Immun., 56: 1096-1100, 1988.
- MOORE, W.E.C.; HOLDMAN, L.V.; CATO, E.P.; SMIBERT, R.M.; BURMEISTER, J.A.; PALCANIS, K.G. and RANNEY, R.R. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infect.Immun., 48: 507-519, 1985.
- MOUTON, C.; REYNOLDS, H. and GENCO, R.J. Combined micromanipulation, culture and immunofluorescent techniques for isolation of the coccal organisms comprising the "corn cob" configuration of human dental plaque. J.Biol.Buccale, 5: 321-332, 1977.

- MOUTON, C.; REYNOLDS, H. and GENCO, R.J. Characterization of tufted streptococci isolated from the "corn cob" configuration of human dental plaque. Infect.Immun., 27: 235-245, 1980.
- NAVIA, J.M. Bioquímica da placa. In: MENAKER, L.; MORHART, E. e NAVIA, J.M. Cárie dentária - Bases biológicas. Trad. de Flávio Fava de Moraes. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1984, p. 276-292.
- NESBITT, W.E.; DOYLE, R.J. and TAYLOR, K.G. Hydrophobic interactions in the adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxiapatite. Infect.Immun., 38: 637-644, 1982.
- NEWBRUN, E. Cariologia - 2.ed., Livraria e Editora Santos Ltda, 1988.
- NEWMAN, H.N.; SEYMOUR, G.J. and CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulins in human dental plaque. J.Periodont.Res., 14: 1-9, 1979.
- NEWMAN, M.G.; GRINENCO, V.; WERNER, M.; ANGEL, I.; KARGE, H. and MISENGAARD, R. Predominant microbiota associated with periodontal health in the aged. J.Periodont.Res., 49: 553-559, 1978.
- NYVAD, B. and FEJERSKOV, O. Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand.J.Dent.Res., 95: 287-296, 1987a.
- NYVAD, B. and FEJERSKOV, O. Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand.J.Dent.Res., 95: 297-307, 1987b.
- OFFENBACHER, S.; ODLE, B. and van DYKE, T. The microbial morphotypes associated with periodontal health and adult periodontitis: composition and distribution. J.Clin.Periodontol., 12: 736-749, 1985.

- PALESTEIN HELDERMAN, W.H. Microbial etiology of periodontal disease. J.Clin.Periodontol. 8: 261-280, 1981.
- QUIRYNEN, M. and van STEENBERGHE, D. Is early plaque growth rate constant with time? J.Clin.Periodontol., 16: 278-283, 1989.
- RITZ, H.L. Microbial population shifts in developing human dental plaque. Arch.Oral.Biol., 12: 1561-1568, 1967.
- RONSTRÖM, A.; EDWARDSSON, S. and ATTSTRÖM, R. *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius* in early plaque formation on plastic film. J.Periodontol.Res., 12: 331-339, 1977.
- ROSAN, B. and HAMMOND, B.F. Extracellular polysaccharides of *Actinomyces viscosus*. Infect.Immun., 10: 304-308, 1974.
- SCHEMEHORN, B.R.; McDONALD, J.L.; STOCKEY, G.K. and PARK, K.K. An incisor plaque model in rats. J.Dent.Res., 63: 32-36, 1984.
- SCHROEDER, H.E. The structure and relationship of plaque to hard and soft tissues. Electron microscopic interpretation. Int. Dent.J., 20: 353-381, 1970.
- SCHROEDER, H.E. and De BOEVER, J. The structure of microbial dental plaque. In: McHUGH, W.D. Dental plaque, Livingstone, Ed. Edinburgh, 1970, p. 49-74.
- SLOTS, J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. Scand.J.Dent.Res., 85: 247-254, 1977.
- SLOTS, J.; BRAGD, L.; WIKSTRÖM, M. and DAHLEN, G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J.Clin.Periodontol., 13: 570-577, 1986.

- SLOTS, J. and DAHLEN, G. Subgingival microorganisms and bacterial virulence factors in periodontitis. Scand.J.Dent. Res., 93: , 119-127, 1985.
- SLOTS, J. and GENCO, R.J. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. J.Dent.Res., 63: 412-421, 1984.
- SONJU, T. and GLANTZ, P.O. Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. Arch.Oral.Biol., 20: 687-691, 1975.
- SONJU, T. and ROLLA, G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Caries.Res., 7: 30-38, 1973.
- STAAT, R.H.; LANGLEY, S.D. and DOYLE, R.J. *Streptococcus mutans* adherence, presumptive evidence for protein-mediated attachment followed by glucan-dependent cellular accumulation. Infect.Immun., 27: 675-681, 1980.
- TEN NAPEL, J.M.; THEILADE, J.; MATSSON, L. and ATTSTROM, R. Ultrastructure of developing subgingival plaque in beagle dogs. J.Clin.Periodontol., 12: 507-524, 1985.
- THEILADE, J. and MIKKELSON, L. Ultrastructural study of dental plaque formation during the first 3.hr period. Caries Res., 6: 79-83, 1972.
- THEILADE, E. and THEILAD, J. Bacteriological and ultrastructural studies of developing dental plaque. In: McHUGH, W.D. Dental plaque. Livingstone, Ed.Edinburgh, 1970. p. 27-40.

- THOMSON, L.A.; LITTLE, W.A.; BOWEN, W.H.; SIERRA, L.I.; AGUIRER, M. and GILLESPIE, G. Prevalence of *Streptococcus mutans* serotypes, *Actinomyces* and other bacteria in the plaque of children. J.Dent.Res., 59: 1581-1589, 1980.
- TSE, M.C.P.; BOAVENTURA, M.C.; FERNANDES, G.D. and MERZEL, J. The effects of cerebral hemidecortication on the eruption rats and uptake of (³H) glycine by the periodontal ligament of the rat incisor. Arch.Oral.Biol., 33: 605-611, 1987.
- van DER HOEVEN, J.S. Microbial interactions in the mouth. In: LEHNER, T. and CIMASONI, G. The borderland between caries and periodontal disease II. London, Academic Press, 1980. p. 215-226.
- van HOUTE, J.; GIBBONS, R.J. and BANGHART, S.B. Adherence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on the tooth surface. Arch.Oral.Biol., 15: 1025-1029, 1970.
- WARSHAWSKY, M. Ultrastructural studies on amelogenesis. In: BUTLER, W.T. The chemistry and biology of mineralized tissues. Birmingham, EBSCO Media, 1985. p. 33-44.
- WARSHAWSKY, M. and MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. J.Histochem.Cytochem., 15: 542-549, 1967.
- WILTON, J.M.A.; GRIFFITHS, G.S.; CURTIS, M.A.; MARDEN, M.F.J.; GILLET, I.R.; WILSON, D.T.; STERNE, J.A.C. and JOHNSON, N.W. Detection of high risk groups and individuals for periodontal diseases: Systemic predisposition and markers of general health. J.Clin.Periodontol., 15: 339-356, 1988.
- ZAMBON, J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J.Clin.Periodontol., 12: 1-20, 1985.