

Caracterización del cemento dental del perro mediante microscopía electrónica de barrido

Characterization of dog dental cementum by scanning electron microscopy

Toriggia, P.G.¹; Hernández, S.Z.¹; Negro, V.B.¹; Saccomanno, D.M.¹; Ciappesoni, J.L.¹

¹ Cátedra de Cirugía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1427) CABA.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue caracterizar el cemento dental en el perro utilizando para ello el microscopio electrónico de barrido (MEB). La cara vestibular de 38 raíces dentales fue observada y fotografiada con el MEB, en sus tercios coronario y apical. Se realizó una clasificación morfológica de la superficie y se midió en cada microfotografía el diámetro de 20 fibras de Sharpey, estableciéndose el porcentaje que ocupaban en 600 μm^2 . En el tercio coronario se encontró un cemento de tipo acelular, con fibras de Sharpey densamente agrupadas, proyectándose perpendicularmente a la superficie, ocupando casi su totalidad. El diámetro de las fibras fue de $5.31 \pm 0.98 \mu\text{m}$. En el tercio apical, se encontró un cemento celular con una densidad de fibras de Sharpey menor al 55%, siendo el resto fibras intrínsecas y lagunas celulares. El diámetro de las fibras fue de $5.47 \pm 1.31 \mu\text{m}$. Los diámetros de las fibras de Sharpey del tercio apical fueron significativamente mayores ($p=0.0000$) que aquellos del tercio coronario. Concluimos que la superficie del cemento del perro no es uniforme en toda su extensión, presentando variaciones entre los tercios coronario y apical, así como también dentro del mismo tercio del diente.

Palabras clave: (cemento dental), (ultraestructura), (MEB), (perro).

* Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires y de la Tesis Doctoral de la Veterinaria Paula Gabriela Toriggia.

Correspondencia *e-mail*: Paula Toriggia ptoriggia@fvet.uba.ar

Recibido: 03-01-2012

Aceptado: 28-03-2012

SUMMARY

The aim of this study was to characterize the dental cementum in the dog using the scanning electron microscope (SEM). The buccal surface of 38 dental roots was observed and photographed with the SEM in their coronal and apical thirds. A morphological classification of the surface was performed and also, the diameter of 20 Sharpey fibers was measured in each picture establishing the percentage occupied by them in 600 μm^2 . In the coronal third, acellular cementum was found with the Sharpey fibers closely packed, projecting perpendicular to the surface, occupying almost the whole of it. The diameter of the fibers was of $5.31 \pm 0.98 \mu\text{m}$. In the apical third, cellular cementum was found, with a density of Sharpey fibers less than 55%, the remainder being intrinsic fibers and cell lacunae. The fiber diameter was $5.47 \pm 1.31 \mu\text{m}$. The diameters of Sharpey fibers of the apical third were significantly higher ($p=0.0000$) than those in the coronal one. We conclude that the dog cementum surface is not uniform, being differences between coronary and apical thirds and within the same third of the tooth.

Key words: (dental cementum), (ultrastructure), (SEM), (dog).

INTRODUCCIÓN

El cemento es una delgada capa de tejido calcificado, avascular, de origen mesenquimático que rodea externamente la raíz dental. Funcionalmente, forma parte del periodonto junto con el hueso alveolar, el ligamento periodontal y la encía². El cemento puede ser clasificado, según la presencia o ausencia de células, en acelular -primario- y celular -secundario-^{2,8}. Ambos consisten en una matriz orgánica mineralizada y fibras colágenas. Éstas pueden ser de dos orígenes: las fibras de Sharpey -extrínsecas-, que son la porción embebida de las fibras principales del ligamento periodontal, formadas por fibroblastos; y las fibras intrínsecas, que son producidas por los cementoblastos y corren paralelas a la superficie radicular, en forma perpendicular a las fibras de Sharpey. El cemento normal, no tiene una superficie real; el límite de mineralización del cemento acelular o el nivel de las fibras intrínsecas del cemento celular puede ser considerada la superficie del tejido, pero ésta es una distinción arbitraria¹¹.

Existen algunos trabajos que describen la morfología del cemento estudiada con el microscopio electrónico de barrido (MEB), en

dientes humanos sin alteraciones patológicas^{1,4,12,16} y afectados por enfermedad periodontal^{3,5,11,14}. Sin embargo, sólo existe un trabajo realizado en dientes de perro¹⁷ donde el cemento es estudiado como parte del periodonto, haciendo referencia principalmente, a la relación de las fibras colágenas con el cemento y el hueso alveolar. Dada la escasa información existente sobre este tejido en el perro, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el cemento dental en esta especie utilizando para tal fin el microscopio electrónico de barrido. Se espera, además, que los resultados obtenidos en esta investigación sean útiles para posteriores estudios del cemento del perro en condiciones patológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El criterio de selección de los especímenes fue el siguiente: los dientes debían ser permanentes y maduros (de perros de más de 18 meses de edad), sin lesiones ni defectos. Se utilizaron 38 raíces dentales (provenientes de 19 incisivos, 9 primeros premolares y 7 segundos premolares), extraídas de 7 perros de entre 15 y 30 kilos de peso y de entre 3 y 14 años de edad. Los dientes fueron obtenidos -previo consentimiento

de los propietarios- de pacientes muertos por causas naturales o sometidos a eutanasia por razones humanitarias, provenientes del Hospital Escuela de Medicina Veterinaria (FCV-UBA) o aportados por colegas, habiendo sido el protocolo evaluado y aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias –UBA-. No se sacrificó animal alguno con el solo propósito de ser utilizado en el presente trabajo. El material de necropsia que no pudo ser procesado inmediatamente, (principalmente cabezas) se conservó en un freezer, hasta su utilización. Las extracciones fueron realizadas con elevadores dentales y fórceps.

Los dientes fueron acondicionados mediante una técnica (desarrollada por los autores¹⁹) que permitió obtener muestras desprovistas de tejido blando. Luego de extraídos, los dientes fueron colocados en formol al 10% hasta ser procesados, dejándolos sumergidos no menos de 48 horas. Previo lavado con agua bidestilada, se colocaron en hipoclorito de sodio al 5% durante siete días, en las piezas dentales muy grandes, se realizó el corte de la corona. Luego de lavar nuevamente con agua bidestilada, se realizó la deshidratación mediante series ascendentes de alcohol -25, 50, 75 y 100%- y el secado al aire.

Los especímenes fueron montados en platinas con pegamento en barra, dejando expuesta, para ser observada con el MEB, su superficie vestibular. Posteriormente se metalizaron con oro – paladio y se observaron en el MEB (Philips XL30®), operado a 5 kv. Con la cámara incorporada al microscopio se obtuvieron microfotografías digitales, del tercio coronario y apical de cada raíz con un aumento de 1500 X.

A partir de las observaciones de las microfotografías, se creó una clasificación morfológica, que permitió agrupar las superficies observadas, tanto para el tercio coronario como para el tercio apical (detallada en los resultados).

Las imágenes obtenidas (n= 76) fueron procesadas con un programa analizador de imágenes (UTHSCSA – Image Tool® for Windows® ver. 3.0), midiéndose en cada una de ellas el diámetro de 20 fibras de Sharpey (o

extrínsecas) en sentido mesio–distal (n= 586 en tercio coronario y n= 709 en el tercio apical, ya que no todas las fotos presentaron fibras con características que permitieron su medición) y estableciéndose qué porcentaje ocupaban, en una superficie de 600 μm^2 de cemento. La información se procesó estadísticamente con el software Statistix 8.0® para Windows® estableciéndose las diferencias entre los datos de las diferentes regiones del cemento (tercios coronario y apical de la raíz) a través del test t. Se consideró como significativo $p < 0.01$.

RESULTADOS

La superficie radicular se caracterizó por presentar fibras extrínsecas e intrínsecas del cemento calcificadas en distintos grados. Se presentan los resultados por región radicular:

En el tercio coronario, donde se observó un cemento de tipo acelular, los paquetes de fibras de Sharpey se proyectaban perpendicularmente a la superficie y agrupaban densamente, constituyendo casi el 100% de dicha superficie. En ocasiones lo hacían de manera de cúpulas poco elevadas (Fig. 1) y en otras, sus límites se hallaban delimitados simplemente por microfracturas sobre una superficie prácticamente lisa (Fig. 2). Otras superficies se presentaron de manera más irregular, no distinguiéndose los paquetes de fibras de Sharpey, a pesar de apreciarse fibras proyectándose de manera perpendicular a la superficie, pero sin delimitación (Fig. 3). No se observaron lagunas celulares. El diámetro de los haces de fibras de Sharpey fue de (media \pm desvío estándar) $5,31 \pm 0,98 \mu\text{m}$.

En el tercio apical, se encontró un cemento celular, cuya superficie presentó mas variaciones que el cemento acelular. Se observaron lagunas celulares, representadas por cavidades, cuyas paredes presentaban las aberturas de los canalículos y también una fina trama de fibras colágenas. Las fibras de Sharpey se observaron principalmente de dos maneras; como proyecciones similares a cúpulas -al igual que en el tercio coronario- sobre la superficie o como depresiones en ella (Fig.4). Algunas de éstas, presentaron una textura granular

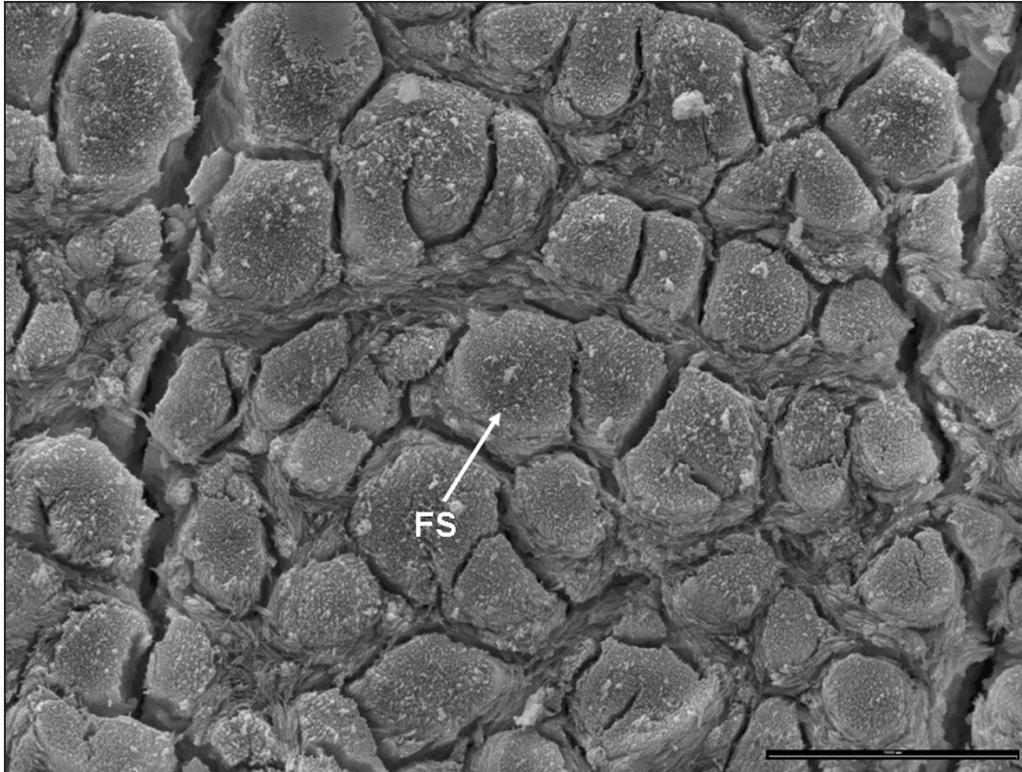


Figura 1. Superficie de cemento tipo 1, encontrada en el tercio coronario. FS: Fibra de Sharpey. Aumento: 3000X. Escala: 10 μ m.

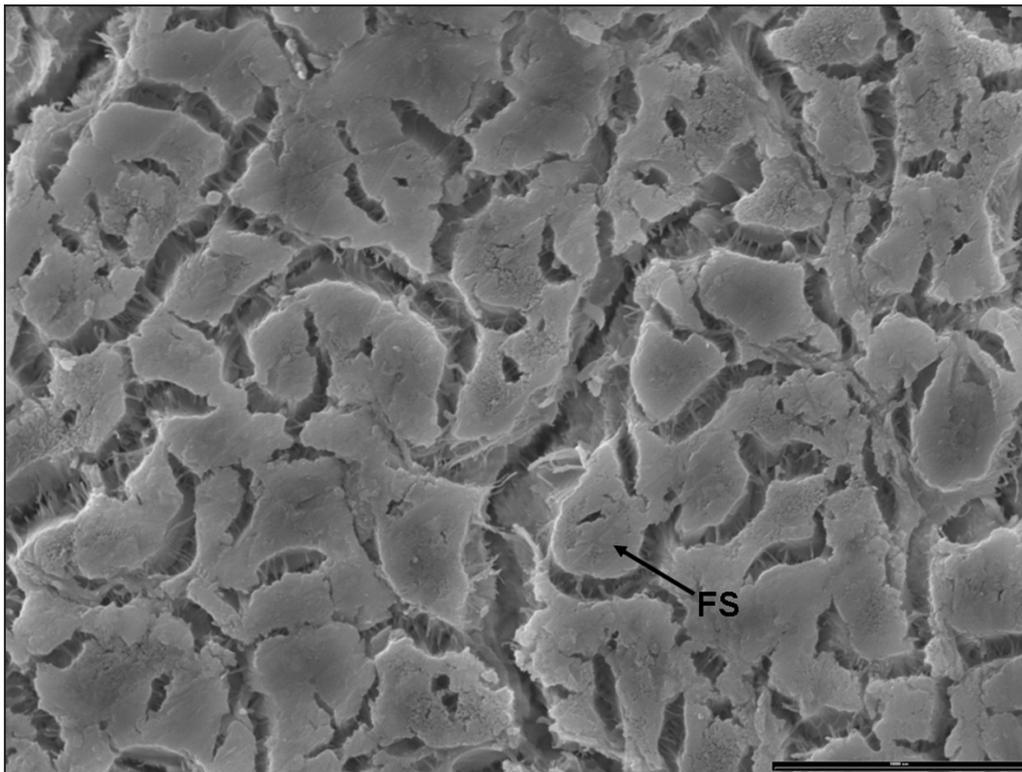


Figura 2. Superficie de cemento tipo 1, encontrada en el tercio coronario. FS: Fibra de Sharpey. Aumento: 3000X. Escala: 10 μ m.

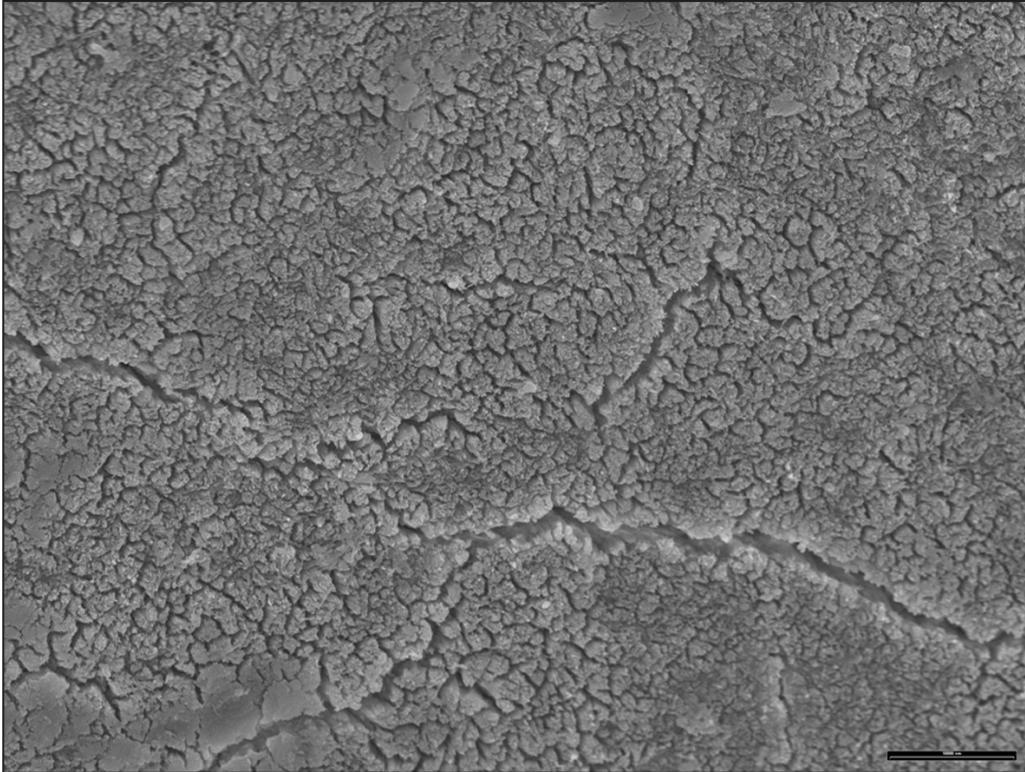


Figura 3. Superficie de cemento tipo 2, encontrada en el tercio coronario. Las fibras colágenas se proyectan desde la superficie sin formar fascículos. Aumento: 1500X. Escala: 10 μ m.

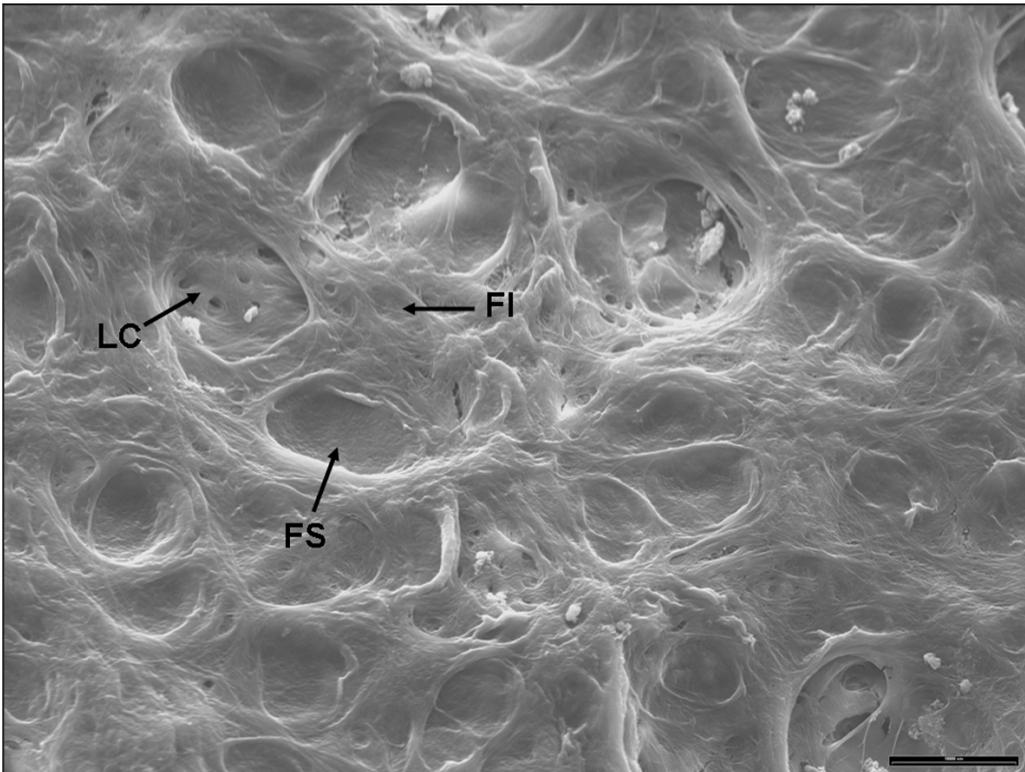


Figura 4. Superficie de cemento tipo 3, encontrada en el tercio apical. Las oquedades representan las fibras de Sharpey que fueron eliminadas por el hipoclorito de sodio. FS: Fibra de Sharpey; FI: Fibras intrínsecas. LC: Laguna celular. Aumento: 1500X. Escala: 10 μ m.

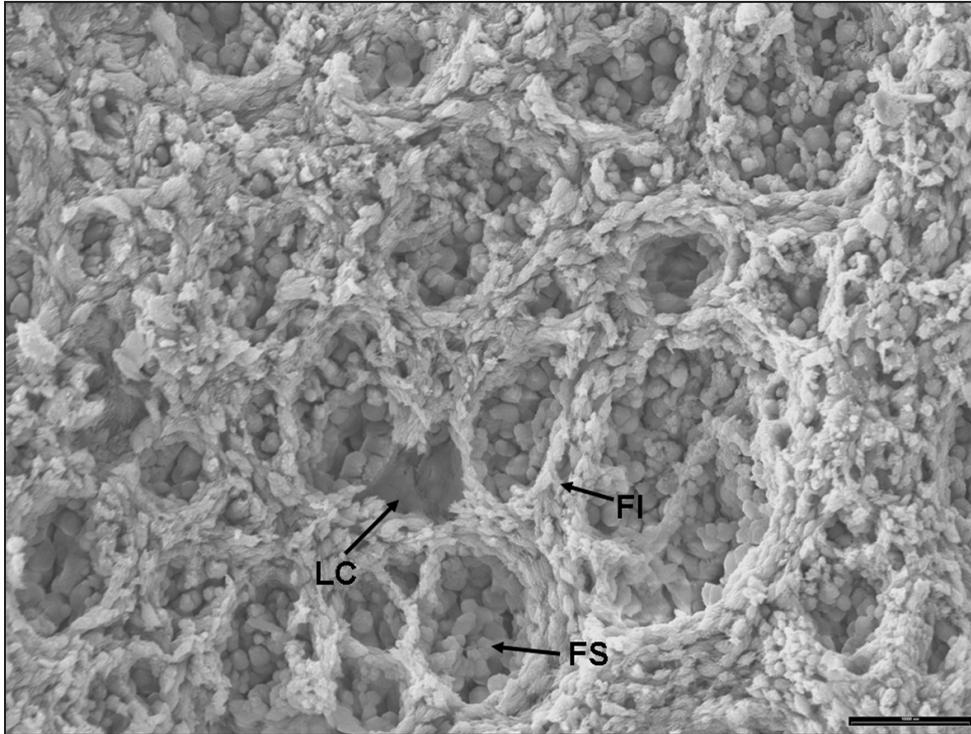


Figura 5. Cemento tipo 3 del tercio apical. Sitios de inserción de las Fibras de Sharpey como oquedades en el frente de mineralización de la matriz intrínseca. FS: Fibra de Sharpey; FI: Fibras intrínsecas. LC: Laguna celular. Aumento: 1500X. Escala: 10 μ m.

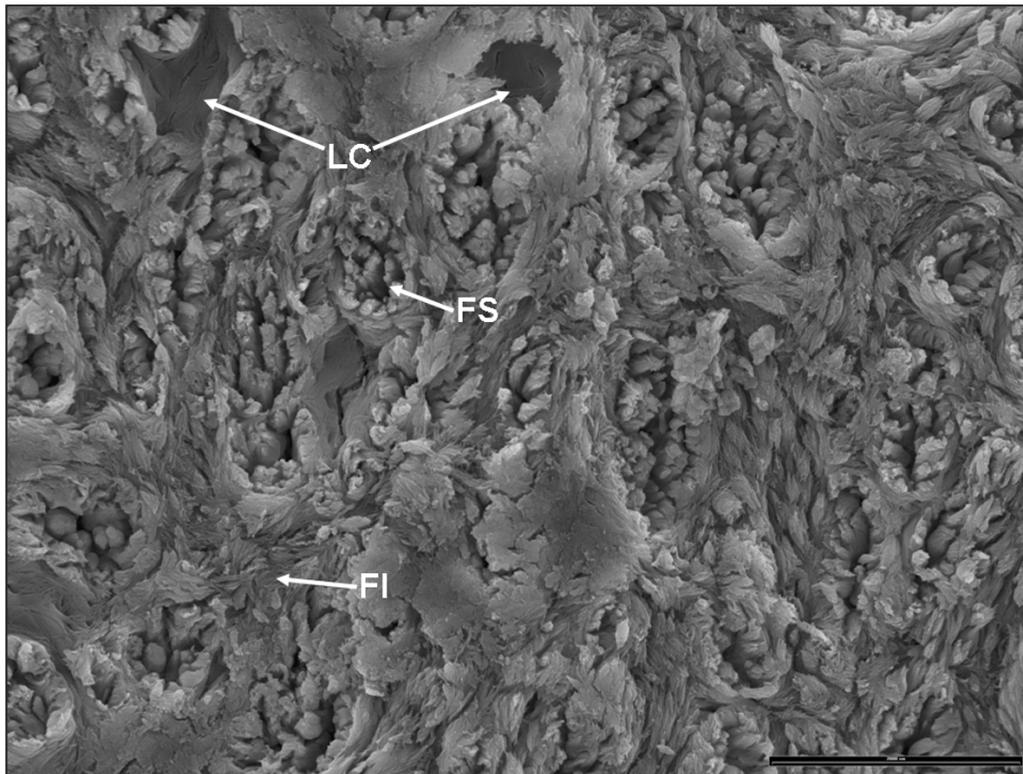


Figura 6. Cemento tipo 1 del tercio apical. Las fibras de Sharpey espiculadas, rodeadas de matriz intrínseca. FS: Fibra de Sharpey; FI: Fibras intrínsecas. LC: Laguna celular. Aumento: 1500X. Escala: 20 μ m.

(Fig. 5) tanto en las oquedades como en su periferia, y corresponderían a microcalcoferitos-nuevo frente de mineralización⁴. También se observaron fibras de Sharpey representadas por formaciones espiculadas (Fig. 6).

A diferencia del tercio coronario, las fibras de Sharpey ocuparon sólo entre el 25 y 55% de la superficie, siendo el resto fibras intrínsecas del cemento. El diámetro de los haces de fibras de Sharpey fue de (media \pm desvío estándar) $5,47 \pm 1,31 \mu\text{m}$.

Las proyecciones y depresiones, nunca se encontraron intercaladas, sino agrupadas por sectores. Es decir, que la superficie del cemento en cada tercio, no fue igualmente pareja en toda su extensión. Sin embargo, raramente se encontraron las fibras como proyecciones y depresiones en el mismo diente.

Los diámetros de los haces de fibras de Sharpey en el tercio apical de la raíz fueron significativamente mayores que aquellos del tercio coronario ($p=0,0000$).

A partir de los patrones morfológicos encontrados, dados por la presencia de las fibras de Sharpey en la superficie del cemento, los autores realizaron la siguiente clasificación de dichas superficies:

Tipo 1: Se identifican los haces de fibras de Sharpey como lobulaciones sobre la superficie del cemento, sobreelevadas en distintos grados y, en ocasiones, de manera espiculada (Fig. 1,2, 6).

Tipo 2: Superficie del cemento irregular, las fibras colágenas se proyectan desde la superficie, sin formar fascículos (Fig. 3).

Tipo 3: Los haces de fibras de Sharpey se identifican en la superficie del cemento como oquedades sobre superficies lisas o granulares -fibras intrínsecas- (Fig. 4 y 5).

En el tercio coronario se encontró la superficie tipo 1 en el 70% y tipo 2 en el 30% mientras que en el tercio apical se halló la tipo 1 en el 86,5% y tipo 3 en el 13,5%.

DISCUSIÓN

El MEB ha demostrado ser una herramienta eficiente para estudiar tanto el cemento normal^{4, 12, 17} como el afectado por la enfermedad

periodontal⁶ o por tratamientos ortodóncicos^{9-10, 18}. Este microscopio posee como ventaja, con respecto al microscopio óptico, su gran definición y profundidad de campo. Además, no depende de cortes ultrafinos de la muestra como lo hace el microscopio electrónico de transmisión ni tampoco de la desmineralización del tejido⁷ permitiendo estudiar la superficie del diente en toda su extensión a través de material sometido a mínima y sencilla preparación.

Los tipos de diente utilizados, fueron incisivos y primeros y segundos premolares debido a que son piezas de fácil extracción, lo que permite no alterar su superficie en este proceso (dado que es el objeto principal de esta investigación). Otros dientes, como los colmillos y las muelas carníceras, están fuertemente arraigados en sus alvéolos y, por lo tanto, difícilmente pueden ser extraídos sin producir algún daño al cemento.

La superficie del cemento observada con MEB, ha sido estudiada en detalle en humanos^{1, 4, 12-13} y en el gato⁷. Un trabajo⁴ incluye en su estudio, dientes de diversos mamíferos, incluido el perro, mencionando luego su mismo autor en otro trabajo¹², que existen ciertas diferencias entre el perro y el humano, que ameritan el estudio de esta especie en forma separada. Sin embargo, no hace una mención específica sobre las características en el perro. Por otro lado, el único trabajo encontrado sobre el estudio del cemento del perro con MEB¹⁷ utiliza una técnica de preparación de muestras que conserva parte de ligamento periodontal, por ser su principal objetivo de estudio -a diferencia de nuestro trabajo, realizado con especímenes desprovistos de materia orgánica-. En el mencionado estudio, se informa la presencia de oquedades -sitios de inserción de las fibras de Sharpey- sobre la superficie de cemento que ha sido denudada de fibras, con un diámetro aproximado de $10 \mu\text{m}$, presentándose en mayor número en la zona coronaria. Las diferencias encontradas entre los resultados de dicho trabajo y el nuestro -mayor diámetro de las fibras, presencia de oquedades en el tercio coronario además de en el apical- se deberían a las distintas técnicas de preparación

utilizadas por ambos, ya que en las piezas que conservan tejido blando, los hoyos estarían formados y delimitados por fibras intrínsecas no mineralizadas y el tejido mineralizado se encontraría por debajo de las mismas. Lo antedicho, demuestra que la preparación de los especímenes es muy importante, ya que podría generar errores al realizar mediciones y dificultar las comparaciones con trabajos de otros autores.

El cemento normal no tiene una superficie real, sino que está dada por el límite de mineralización de sus fibras intrínsecas y extrínsecas¹¹. Por esta razón, a menudo la interpretación de las imágenes de su superficie, obtenidas con el MEB, se dificulta. Las cúpulas, representan fibras de Sharpey que están mineralizadas a un nivel por encima de las fibras intrínsecas lo cual revelaría zonas de relativa inactividad en cuanto a la mineralización. Las depresiones, en cambio, representarían el sitio donde se encontraban las fibras de Sharpey, que fueron eliminadas por el hipoclorito de sodio al estar mineralizadas a un nivel menor que las fibras intrínsecas, lo que indicaría una mayor actividad en este proceso^{4, 12}. Las fibras de Sharpey de forma espiculada no han sido reportadas en la bibliografía. Sin embargo, probablemente también correspondan a un cemento en un estado activo de mineralización dada la forma irregular y espiculada en que se presentan.

Se encontró una similitud entre el hombre y el perro en cuanto al porcentaje de fibras de Sharpey en el tercio coronario y apical, lo cual además coincide con los estudios realizados en gatos^{7, 15}. Esta concordancia, estaría relacionada con los diferentes tipos de cemento (acelular y celular) en el tercio coronario y apical respectivamente, hecho que también está asociado con la presencia de lagunas celulares y fibras de Sharpey presentes como oquedades sólo en el tercio apical en ambas especies, manifestando la presencia de cemento celular activo en el proceso de mineralización. Sin embargo, el diámetro promedio de los haces de fibras de Sharpey encontrado en el perro difirió del hayado en estas especies: 4 µm en el gato, 6

µm en el hombre y 5 µm en el perro. Por otro lado, el gran número de fibras medidas en la presente investigación, permitió determinar diferencias estadísticamente significativas entre el diámetro de las fibras de Sharpey del tercio coronario y apical, a pesar de la escasa diferencia numérica encontrada entre ellos. Los estudios realizados en dientes de humanos desprovistos de materia orgánica^{4, 12} refieren a la superficie del cemento, formada por fibras de Sharpey dispuestas de alguna de las siguientes maneras: como proyecciones similares a cúpulas sobre la superficie o como depresiones en ella. Esto también fue observado en este estudio en los dientes de perro; sin embargo, en esta especie también se encontraron otros tipos de superficies. Este hecho, nos condujo a crear una clasificación propia que permitió agrupar las distintas superficies radiculares observadas en 3 grupos distintos -según se mencionara previamente- a pesar de reconocer inicialmente, al menos 8 formas diferentes de presentación. Entre ellas se encontraban superficies con lobulaciones poco o muy sobreelevadas y a veces de forma espiculada; o haces de fibras de Sharpey con límites marcados por microfracturas sobre una superficie prácticamente lisa, determinándose que pertenecían al mismo grupo -tipo 1-, donde las fibras de Sharpey se encontraban sobreelevadas en distintos grados. No se tomó en cuenta su densidad por considerar que ésta dependía del tercio radicular. Por otro lado se agruparon los haces de fibras que se presentaban como oquedades, fueran éstas sobre una superficie lisa o granulada -tipo 3-. Finalmente, el grupo tipo 2 fue formado por aquellas superficies donde a diferencia de los otros grupos, no pudieron distinguirse los haces de fibras.

La bibliografía especializada consultada menciona distintas formas de preparación de los especímenes para la observación de la superficie del cemento con MEB, pero no las describe en detalle. Por ello fue necesario realizar pruebas preliminares, efectuando diferentes protocolos de preparación, a fin de estandarizar una adecuada técnica de acondicionamiento de los

especímenes. Se utilizaron como variables: formol al 10%, hipoclorito de sodio al 5%, ultrasonido y el secado a aire y por punto crítico. La utilización de formol sin sumersión posterior en hipoclorito de sodio brindó superficies de cemento ocultas por restos de ligamento periodontal por lo que fue descartada. La aplicación de ultrasonido (BioSonic Jr.[®], Coltène/Whaledent, Inc.) generó deterioro de la superficie del cemento. No se encontraron diferencias entre el secado al aire y con punto crítico ya que el tipo de muestra elegida (desprovista de tejido blando) no requiere de este último. Las muestras de tipo inorgánicas, permiten una correcta evaluación de la superficie del cemento y otros tejidos mineralizados^{4,7,12}.

Las imágenes que ayudaron en un primer reconocimiento de las estructuras a observar en la superficie del cemento fueron las obtenidas con una técnica de preparación que brindaba muestras provistas de una pequeña cantidad de material orgánico (ya que la sumersión en hipoclorito de sodio era de 24 horas y no de 7 días). En estas microfotografías, podían distinguirse fácilmente los paquetes de fibras de Sharpey -e incluso las fibras individuales que las formaban- y las fibras intrínsecas, guiando en la identificación de estas estructuras anatómicas en las preparaciones inorgánicas. Lo mismo sucedió con imágenes donde las fibras de Sharpey ocupaban el 100% de la superficie, donde podía observarse su proyección en forma perpendicular, sin formar fascículos -superficie tipo 2-. Lamentablemente, ésta técnica de preparación fue descartada, por proveer muestras muy irregulares por la cantidad de tejido blando que presentaban, lo cual no permitía realizar una buena caracterización de las mismas.

En el tercio coronario, una de las formas de presentación de los paquetes de fibras de Sharpey fue aquella en la que sus límites se encontraban marcados por microfracturas sobre una superficie prácticamente lisa. A pesar de ser ésta, una imagen inicialmente dudosa y no descripta en la bibliografía referente a otras especies, se determinó que las líneas delimitaban los haces de fibras de Sharpey, por su similitud en forma, diámetro y densidad con aquellos haces presentes

como cúpulas sobreelevadas sobre la superficie radicular en el tercio coronario -superficie tipo 1-

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que caracteriza la superficie del cemento de la cara vestibular de dientes de perro desprovistos de materia orgánica, utilizando el microscopio electrónico de barrido. De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- La superficie del cemento no es uniforme en toda su extensión, presentando variaciones entre los tercios coronario y apical y dentro del mismo tercio del diente.
- El patrón morfológico predominante tanto en el tercio coronario como en el apical es el tipo 1, encontrándose también en el primero el patrón tipo 2 y en el segundo el patrón tipo 3.
- En el tercio coronario se encuentra un cemento de tipo acelular, con paquetes de fibras de Sharpey densamente agrupados, proyectándose perpendicularmente a la superficie constituyendo casi el 100% de ella y sin lagunas celulares.
- En el tercio apical se encuentra un cemento de tipo celular, con una densidad de los paquetes de fibras de Sharpey menor al 55%, siendo el resto fibras intrínsecas y lagunas celulares.
- Los diámetros de los haces de fibras de Sharpey en el tercio apical de la raíz son mayores que aquéllos del tercio coronario, al igual que en otras especies, a pesar de ser menores que en el hombre y mayores que en el gato.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barton, NS.; Van Swol, RL. Periodontally diseased vs. normal roots as evaluated by scanning electron microscopy and electron probe analysis. *J Periodontol.* 1987; 58(9):634-8.
2. Berkovitz, BK. Cementum. En Berkovitz, BK. (ed.). *Oral anatomy, histology and embryology*. 3rd Edition. Elsevier Health Sciences, London, 2002:168-79.
3. Bilgin, E.; Gürkan, CA.; Arpak, MN.; Bostanci, HS.; Güven, K. Morphological Changes in Diseased Cementum Layers: A Scanning Electron Microscopy

- Study. *Calcif Tissue Int.* 2004; 74(5):476-85.
4. Boyde, A.; Jones, SJ. Scanning electron microscopy of cementum and sharpey fibre bone. *Cell Tissue Res.* 1968; 92(4):536-48.
 5. Carrassi, A.; Abati, S.; Santarelli, G. The role of scanning electron microscopy in periodontal research. *Scanning Microsc.* 1988; 2(2):1123-38.
 6. Crespo Abelleira, AC.; Rodríguez Cobos, MA.; Fuentes Boquete, IM.; Castaño Oreja, MT.; Jorge Barreiro, FJ.; Rodríguez Pato, RB. Morphological study of root surfaces in teeth with adult periodontitis. *J Periodontol.* 1999; 70(11): 1283-91.
 7. DeLaurier, A.; Boyde, A.; Horton, MA.; Price, JS. Analysis of the surface characteristics and mineralization status of the feline teeth using scanning electron microscopy. *J Anat.* 2006; 209(5):655-69.
 8. Fiorellini, JP.; Kim, DM.; Ishikawa, SO. The tooth-Supporting Structures. En Newman (ed.). *Carranza's clinical periodontology*. 10th Edition. Elsevier, St. Louis, Missouri, 2007: 68-91.
 9. Han, G.; Huang, S.; Von den Hoff, JW.; Zeng, X.; Kuijpers-Jagtman, AM. Root resorption after orthodontic intrusion and extrusion: an intraindividual study. *Angle Orthod.* 2005; 75(6):912-8.
 10. Jimenez-Pellegrin, C.; Arana-Chavez, V. Root resorption in human mandibular first premolars after rotation as detected by scanning electron microscopy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004; 126(2):178-84.
 11. Jones, SJ. The tooth surface in periodontal disease. *Dent Pract Dent Rec.* 1972; 22(12):462-73.
 12. Jones, SJ.; Boyde, A. A study of human root cementum surfaces as prepared for and examined in the scanning electron microscope. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972; 130(3):318-37.
 13. Jones, SJ.; Lozdan, J.; Boyde, A. Tooth surfaces treated in situ with periodontal instruments. Scanning electron microscopic studies. *Br Dent J.* 1972; 132(2):57-64.
 14. Lomcali, G.; Sen, BH.; Cankaya, H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol.* 1996; 12(2):70-6.
 15. Saccomanno, DM.; Negro, VB.; Hernández, SZ.; Toriggia, PG. Characterization of cementum surfaces in teeth of cats by, scanning electron microscopy. Preliminary results. *Proceeding of the XIX European Congress of Veterinary Dentistry*, Nice, France, 2010: 236-8.
 16. Schroeder, H. Human cellular mixed stratified cementum: a tissue with alternating layers of acellular extrinsic-and cellular intrinsic fiber cementum. *Schweiz Monatschr Zahnmed.* 1993; 103(5):550-60.
 17. Shackelford, JM. Scanning electron microscopy of the dog periodontium. *J Periodontal Res.* 1971; 6(1):45-64.
 18. Sreeja, R.; Minal, C.; Madhuri, T.; Swati, P.; Vijay, W. A scanning electron microscopic study of the patterns of external root resorption under different conditions. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(5):481-6.
 19. Toriggia, PG.; Hernández, SZ.; Negro, VB. Técnica estandarizada para preparación de dientes de perro para observar el cemento con el microscopio electrónico de barrido. *I Encuentro Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas y XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas*, Córdoba, Argentina, 2008.