

Método de preparación del espécimen para evaluar la micromorfología de la interfase adhesiva resina-dentina con un microscopio electrónico de barrido

Albaladejo A*

RESUMEN

La infiltración con resina de las fibras de colágeno desmineralizadas permiten la formación de una capa híbrida con *tags* de resina y ramas laterales, creando de esta manera, retenciones micromecánicas de la resina al sustrato desmineralizado. Dichas retenciones son el principal mecanismo para la adhesión resina-dentina, siendo la penetración de la resina en la dentina intertubular, el factor de mayor importancia en la obtención de unas adecuadas fuerzas de adhesión. Uno de los instrumentos más usados para estudiar los mecanismos que envuelven el proceso de adhesión ha sido el microscopio electrónico de barrido (MEB). El principio del MEB se basa en imágenes tridimensionales que se construyen punto a punto y línea a línea desde los electrones secundarios. El objetivo de este estudio es describir la preparación de los especímenes para evaluar la formación de la capa híbrida, los *tags* de resina y ramas laterales.

Palabras clave: Materiales dentales; dentina; adhesión, microscopio electrónico de barrido.

SUMMARY

The infiltration of demineralized collagen fibers with resin permits formation of a hybrid layer with resin tags and adhesive lateral branches, thus creating micromechanical retention of the resin to the demineralized substrate. The micromechanical retention is the chief mechanism for resin bonding to dentin with resin penetration of the intertubular dentin being of major importance in bond strength. One of the first and most widely used tools to study the mechanisms involved in the process of bonding has been the scanning electron microscope (SEM). The principle of SEM is based upon a pseudo three-dimensional image that is built up point-by-point and line-by-line from secondary electrons. The objective of this study is to describe the preparation of the specimens to evaluate the hybrid layer, resin tags and adhesive lateral branches formations.

Key words: Dental materials; dentin; adhesion; scanning electron microscope.

Fecha de recepción: Septiembre 2006.

Aceptado para publicación: Octubre 2006.

* Profesor Asociado de Ortodoncia. Facultad de Odontología. Universidad de Salamanca.

Albaladejo A. Método de preparación del espécimen para evaluar la micromorfología de la interfase adhesiva resina-dentina con un microscopio electrónico de barrido. *Av. Odontoestomatol* 2007; 23 (4): 197-206.

INTRODUCCIÓN

El mecanismo de adhesión a la dentina ha sido ampliamente estudiado y debatido. Al comienzo del desarrollo de la Odontología Adhesiva se buscó una adhesión química al calcio o a las fibras de colágeno de la estructura dentaria. Hoy en día se habla sobre todo de adhesión mecánica o, más concretamente, adhesión micromecánica (1-2). La infiltración con resina de las fibras de colágeno desmineralizadas permiten la formación de una capa híbrida con *tags* de resina y ramas laterales, creando de esta manera retenciones micromecánicas de la resina al sustrato desmineralizado (1, 3, 4).

En la actualidad, existen dos mecanismos básicos de adhesión a dentina: 1) *Adhesivos de dos pasos*, que eliminan el barrillo dentinario, también llamados auto-imprimadores, que acondicionan la dentina con un ácido y remueven totalmente el barrillo dentinario (5) y, 2) *Adhesivos que disuelven el barrillo dentinario*, los cuales son sistemas adhesivos que mezclan de forma homogénea el barrillo con el *primer* y simultáneamente desmineralizan la superficie del sustrato (5). Como no son lavados, el barrillo se incorpora al proceso de adhesión reduciéndose los problemas asociados a la sensibilidad de la técnica (6, 7). Estos adhesivos los podemos encontrar en uno o dos pasos.

Uno de los principales y más usados instrumentos para estudiar los mecanismos que envuelven el proceso de adhesión ha sido el MEB (5, 8). El principio del MEB se basa en imágenes tridimensionales que se construyen punto a punto y línea a línea desde los electrones secundarios (8). Se va a formar una imagen por un escaneado de la superficie del espécimen. Las ventajas del MEB son:

1. Una imagen con efecto 3D.
2. Permite observar especímenes grandes.
3. Posee un diseño sencillo de la columna.
4. Nos permite realizar fotografías con amplios aumentos, desde $3\times$ hasta $150.000\times$.

Sin embargo, a pesar de presentar todas estas facilidades, tiene unas limitaciones:

1. El espécimen es sometido a un vacío.
2. Se debe metalizar.

3. Sólo es posible observar la superficie del espécimen.
4. Tiene menos resolución que otras técnicas de microscopía electrónica como, por ejemplo, el microscopio electrónico de transmisión (TEM), que se utiliza para observar los especímenes a lo largo de su espesor.

El MEB posee un cátodo que al calentarse emite una fuente de electrones primarios, los cuales van desplazándose guiados por las lentes situadas en los laterales del tubo del microscopio que los mantienen en una trayectoria rectilínea hasta alcanzar el espécimen (Fig. 1). Una vez que llegan a éste, atraviesan la capa de oro que se ha depositado previamente sobre su superficie para facilitar la conducción de los electrones (Fig. 1). Penetran en la materia del espécimen excitando los electrones secundarios que van a ser los que darán la imagen, pues los electrones primarios se desechan, mientras que los secundarios son recogidos por un detector de electrones que convertirá cada electrón en un fotón que tendrá un color dentro de la tonalidad comprendida entre el negro y el blanco, dependiendo del peso molecular del átomo de la materia de la que procede. Cada fotón dará un punto, y la suma de todos formará la imagen.

El objetivo de este artículo es describir el proceso de preparación del espécimen para evaluar la micromor-

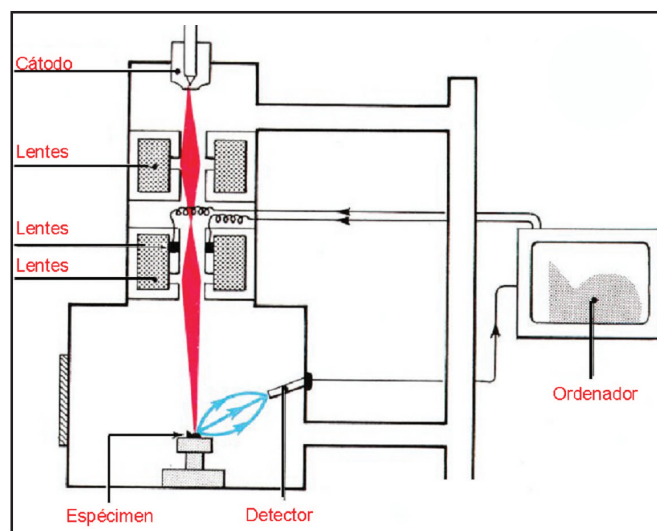


Fig. 1. Esquema del funcionamiento de un MEB.

fología de la interfase adhesiva resina-dentina de la capa híbrida, los *tags* de resina primarios y secundarios formados por un sistema adhesivo en un MEB; así como analizar los posibles fallos cometidos en dicha preparación y sus consecuencias en la obtención de la imagen.

MATERIAL Y MÉTODO

Preparación inicial del espécimen

Se usan molares humanos no erupcionados almacenados en una solución salina como mucho un mes a 4° Centígrados. Los especímenes se seccionan perpendicularmente a su eje mayor en una máquina cortadora de tejidos duros. Las superficies se pulen con una lija de papel de 180 grit bajo una corriente continua de agua hasta exponer una superficie de dentina y haber removido el esmalte remanente, obteniendo una superficie totalmente plana para reali-

zar la adhesión. Después de preparar las superficies, se aplican los agente adhesivos seleccionados siguiendo las instrucciones del fabricante, o aplicando alguna variante sobre ellas, dependiendo de lo que se quiera estudiar. Se construye una corona de resina de 7 milímetros de altura incrementalmente con un composite, donde cada capa se fotopolimeriza durante 40 segundos con una unidad de luz. A continuación, los especímenes se almacenan durante 24 horas en agua destilada a 37° C.

Sección del espécimen en dos partes iguales (Fig. 2)

Los especímenes se seccionan paralelos a su eje longitudinal (Fig. 2a) obteniéndose dos partes iguales (Figs. 2b, c). Una de ellas se prepara para estudiar la capa híbrida (Fig. 2d), y la otra para observar los *tags* de resina principales y secundarios (Fig. 2e).

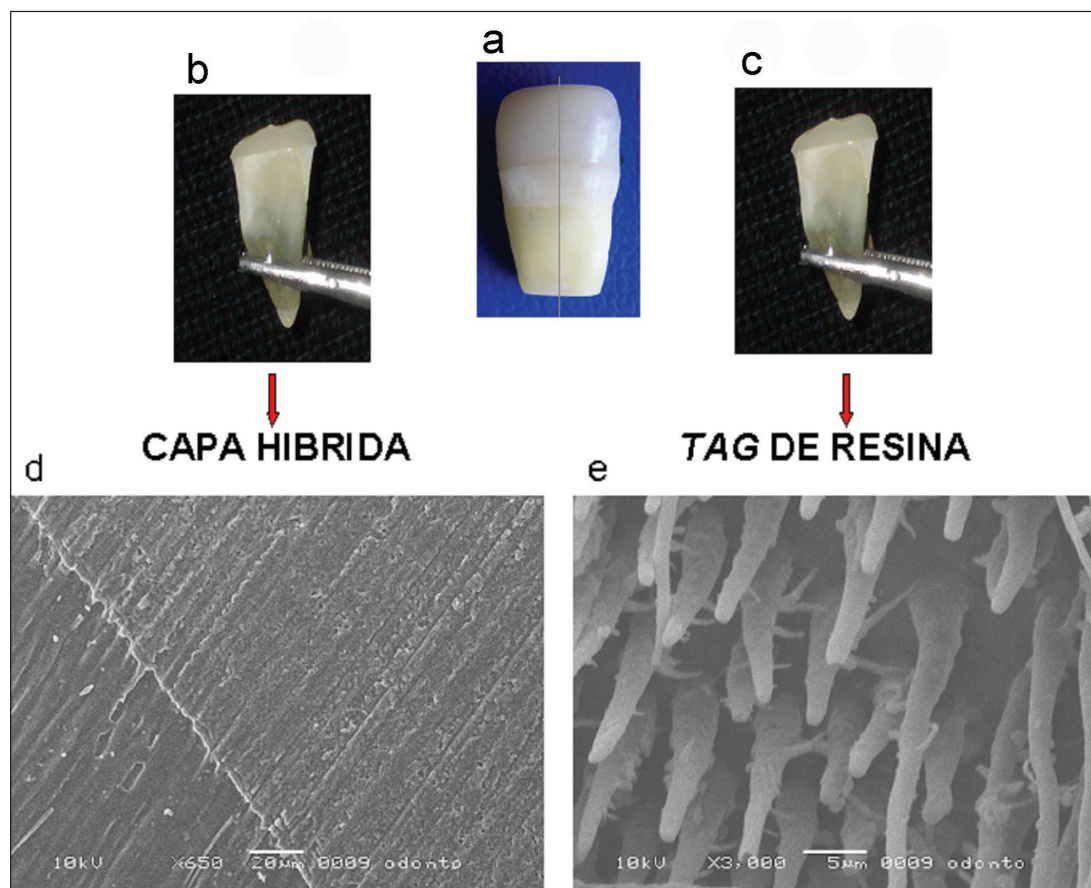


Fig. 2. Esquema de la preparación del espécimen para observar la capa híbrida y los *tags* de resina primarios y secundarios. a) El espécimen se secciona transversalmente, se aplican los adhesivos y se realiza una corona de composite de 7mm. b, c) El espécimen se secciona en dos partes iguales. Cada una de ellas se prepara de manera diferente. d) En una, se observa la capa híbrida y, en la otra, e) los *tags* de resina primarios y las ramas laterales.

Preparación de la parte seleccionada para observar los *tags* de resina principales y las ramas laterales (Fig. 3)

La parte seleccionada (Fig. 3a) se almacena en ácido clorhídrico al 30% durante 48 horas (Fig. 3b) hasta disolver totalmente el sustrato dental (Fig. 3c), transcurrido este tiempo se aclara con abundante agua. A continuación se introduce en hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos (Fig. 3d) y por último se deshidrata incrementalmente con alcohol en concentraciones al 25, 50, 75, 80, 90, 95 y 100%, sucesivamente, con una duración de 10 minutos cada baño (Fig. 3e). Entonces el espécimen se metaliza y se observa en un MEB (Fig. 3f) con unos aumentos estándar de 600, 1.000, 2.000 y 3.000 (Fig. 4).

Preparación de la parte seleccionada para observar la capa híbrida formada entre el sistema adhesivo y el sustrato de dentina (Fig. 5)

La otra parte de la muestra seccionada se conserva en agua destilada en una estufa que mantiene la temperatura a 37 ° C durante 24 horas. A continuación la superficie del espécimen se pule con discos de pulir de 500, 1.000 y 1.200 Grit (Fig. 6a). Se introducen en una máquina de ultrasonidos al 50% de potencia durante 5 minutos (Fig. 6b). Pasado este tiempo, la superficie a observar se descalcifica con ácido ortofosfórico al 32% durante 30 segundos para producir una desmineralización de la parte que se examinará (Fig. 6c). El espécimen se lava (Fig. 6d), se seca (Fig. 6e) y se introduce en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 120 segundos

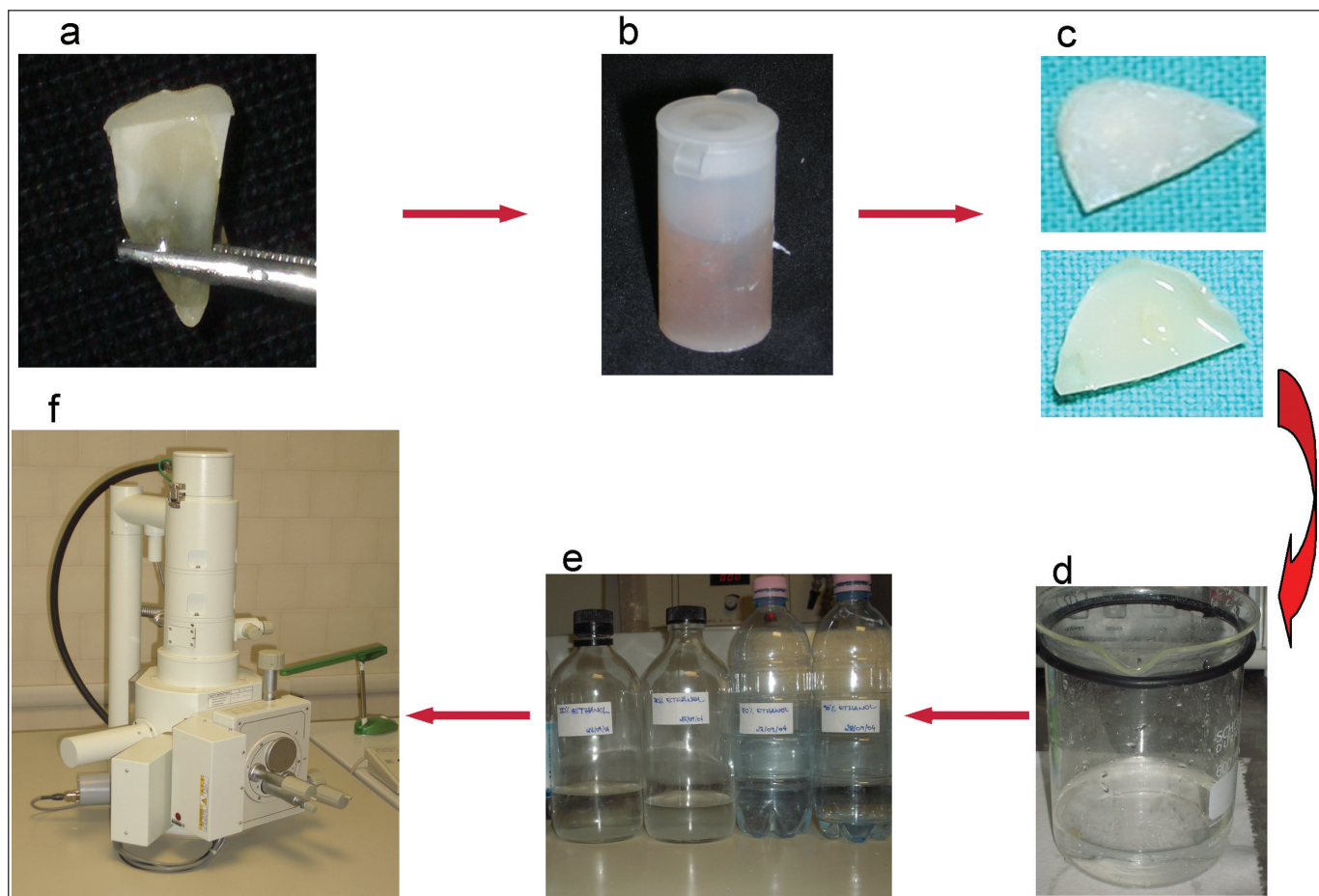


Fig. 3. Esquema de la preparación de la mitad del espécimen donde se van a observar los *tags* de resina primarios y secundarios. a) La parte seleccionada b) se almacena en ácido clorhídrico al 30%. c) La resina obtenida d) se introduce en hipoclorito sódico al 2% y e) se deshidrata incrementalmente con alcohol en concentraciones al 25, 50, 75, 80, 90, 95 y 100% sucesivamente. El espécimen se metaliza y f) se observa en un MEB.

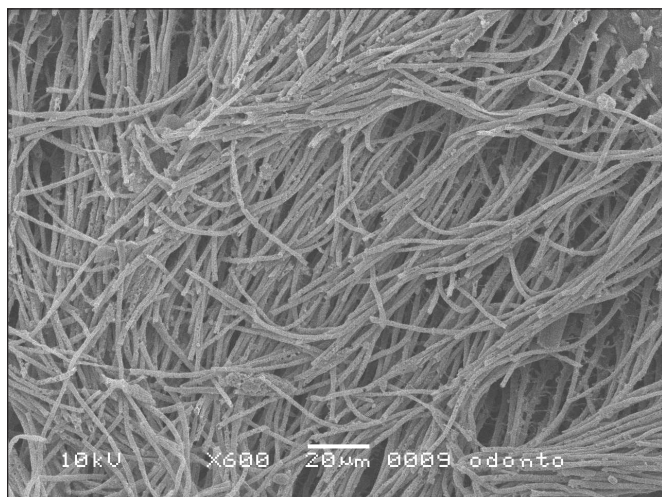


Fig. 4. Imagen de MEB de los tags de resina formados por un adhesivo de grabado total (X600).

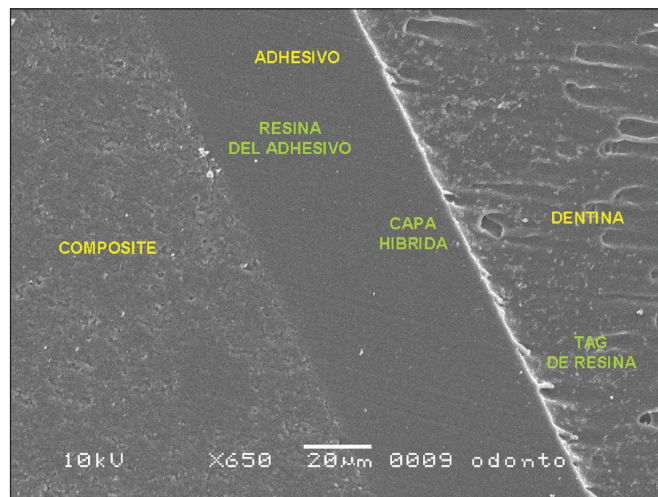


Fig. 5. Imagen realizada con un MEB (X650) a la interfase adhesiva de un sistema adhesivo autograbador, donde se pueden apreciar los dos sustratos a adherir (dentina y composite), así como la interfase adhesiva con sus diferentes partes (capa híbrida, tags de resina y resina del adhesivo).

para eliminar los componentes orgánicos de la capa más superficial (Fig. 6f). Después de enjuagarse y secarse (Figs. 6g, h), se expone a un incremento de concentraciones de alcohol de la misma manera que

se realizó con la otra parte seccionada del espécimen (Fig. 6i). Al espécimen preparado (Fig. 7a) se le toman impresiones con silicona fluida (Figs. 7b, c) y

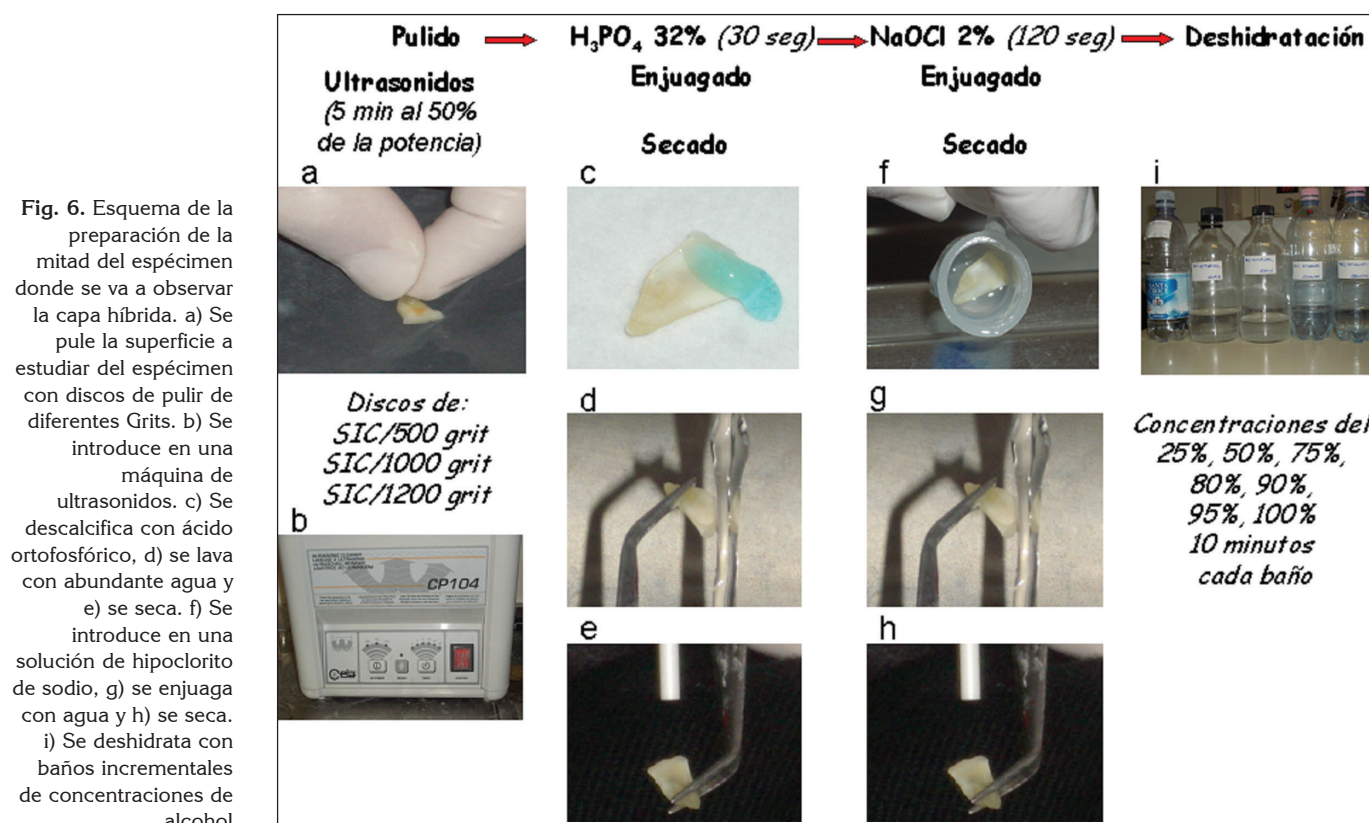


Fig. 6. Esquema de la preparación de la mitad del espécimen donde se va a observar la capa híbrida. a) Se pule la superficie a estudiar del espécimen con discos de pulir de diferentes Grits. b) Se introduce en una máquina de ultrasonidos. c) Se descalcifica con ácido ortofosfórico, d) se lava con abundante agua y e) se seca. f) Se introduce en una solución de hipoclorito de sodio, g) se enjuaga con agua y h) se seca. i) Se deshidrata con baños incrementales de concentraciones de alcohol

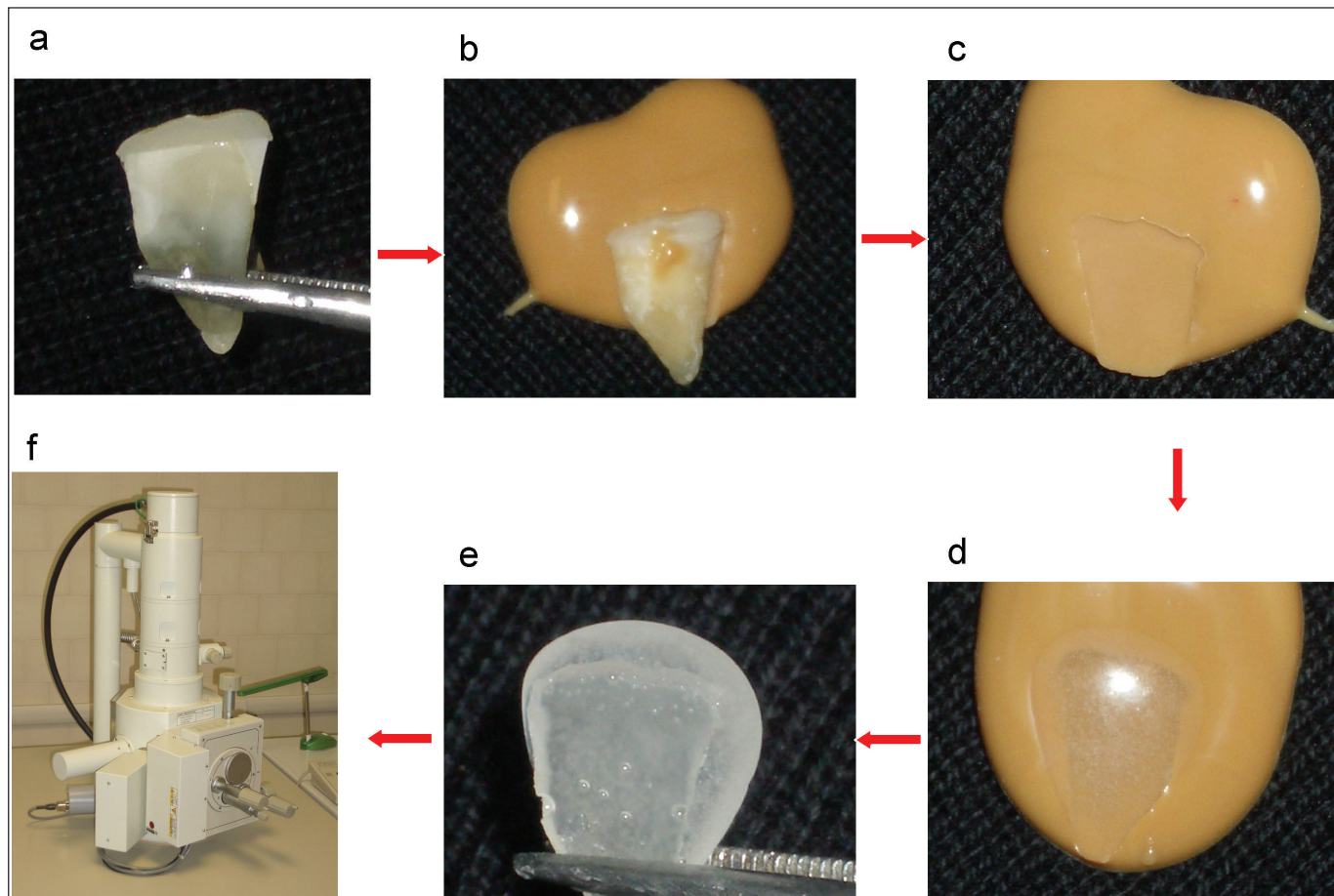


Fig. 7. Esquema de la realización de la réplica del espécimen preparado para observar la capa híbrida. a) Una vez que el espécimen está preparado para observarse, b) se hace una impresión con silicona fluida de la cara donde se encuentra la interfase. c) Cuando fragua la silicona se retira el espécimen, obteniéndose una impresión que, a continuación, d) se vacía con resina epoxi. e) La réplica obtenida se metaliza y f) se lleva al MEB.

se rellena con resina epoxy (Fig. 7d), obteniendo la muestra definitiva (Fig. 7e) que se metaliza con una capa de oro en una metalizadora y se observa con el MEB (Fig. 7f) a diferentes aumentos estandarizados de 650, 1.200 y 3.000 (Fig. 8).

DISCUSIÓN

La imagen tomada con un MEB de la capa híbrida nos permite realizar un estudio micromorfológico de la interfase adhesiva resina-dentina. Para que una imagen se pueda observar correctamente, ésta debe ser nítida, limpia y clara. El manejo del espécimen a lo largo del proceso que dura la preparación del mis-

mo debe ser muy meticulosa, de no ser así, se acumulará suciedad sobre la superficie a observar que alterará la obtención de la imagen (Fig. 9) impidiendo, por tanto, contemplar detalles y lugares que serían de gran interés. Por ello, el espécimen siempre debe manipularse con las pinzas, evitando que la zona a estudiar entre en contacto con cualquier tipo de superficie.

Como se ha descrito anteriormente, para observar la capa híbrida se debe desmineralizar la superficie a estudiar. Se aplica ácido ortofosfórico al 32% que a continuación se remueve con abundante agua. Sin embargo, para la preparación del espécimen no se debe usar el ácido ortofosfórico em-

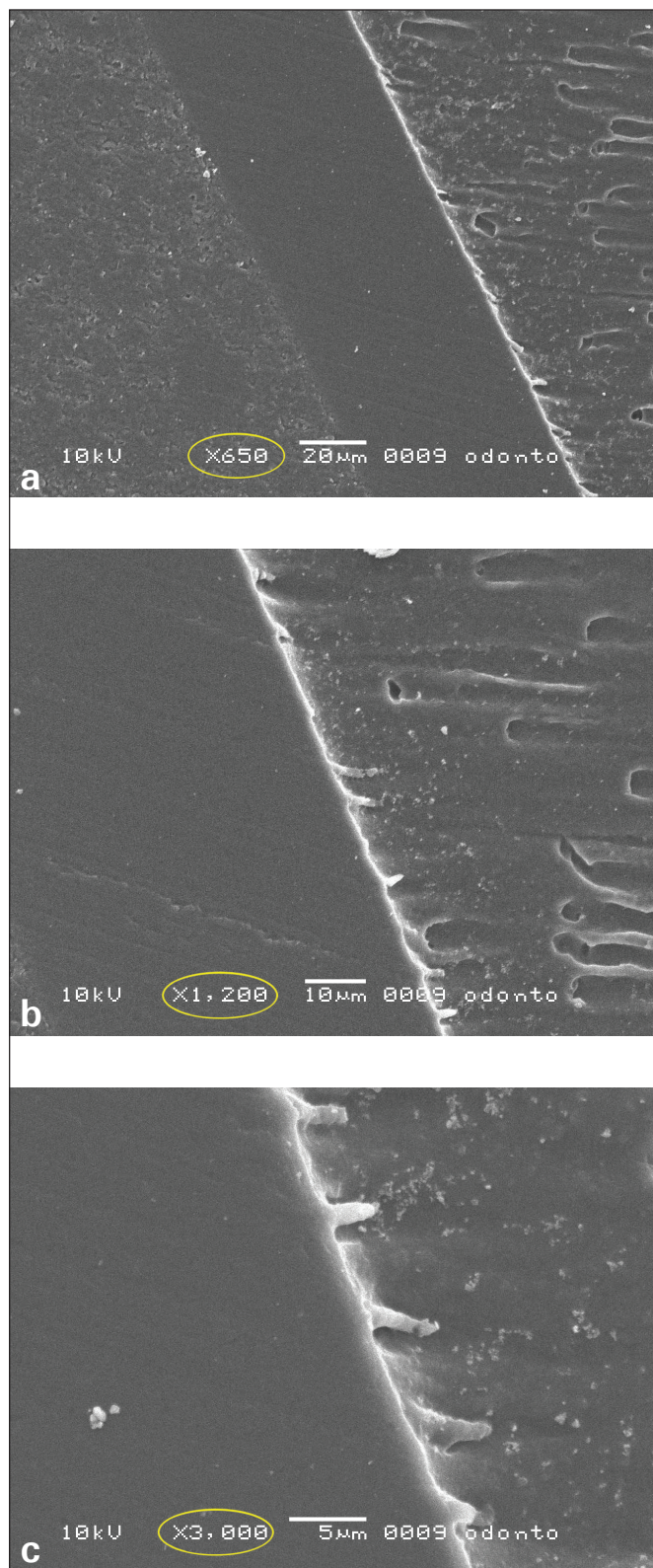


Fig. 8. Diferentes imágenes de MEB de la capa híbrida de un mismo espécimen tomadas con diferentes aumentos. a) 650, b) 1.200, c) 3.000.

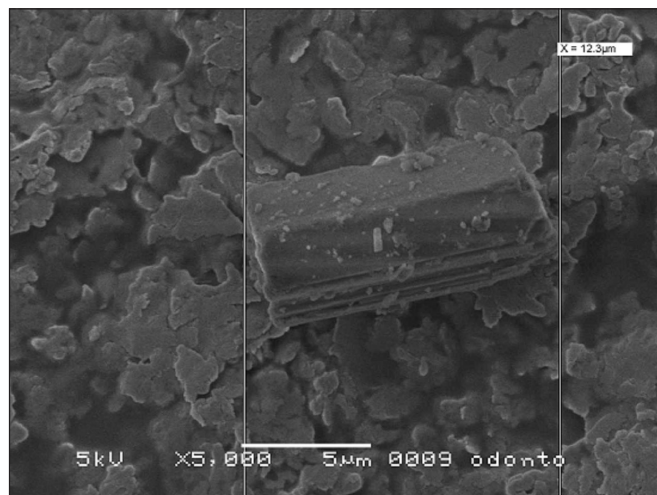


Fig. 9. Imagen tomada con un MEB de una zona de la interfase adhesiva sucia y con restos de partículas como consecuencia de una inadecuada manipulación.

pleado rutinariamente, pues contiene relleno de sílice que se mantiene sobre la superficie después del lavado con agua, el cual ensucia la imagen impidiendo un correcto estudio de la capa híbrida (Fig. 10). Para evitar esto, se utiliza un ácido especial sin relleno que proporcionará una imagen limpia.

Los especímenes preparados para obtener imágenes de la capa híbrida y de los *tags* de resina se deben metalizar e introducir en el MEB de la misma manera, independientemente de que hayan sido preparados de manera diferente. Antes de metalizar la superficie del espécimen a observar, se debe cerrar el dispositivo y realizar el vacío del interior. De manera similar, cuando se introduce en el MEB, también se realiza un vacío de la cámara interna. Ambos vacíos producen una gran fuerza de tracción sobre la interfase adhesiva resina-dentina que provoca en la mayoría de especímenes la ruptura de dicha interfase (Figs. 11 y 12). Por esta razón se realiza una réplica del espécimen preparado para observar la capa híbrida. Cuando se van a estudiar los *tags* de resina, como se ha disuelto con ácido clorhídrico todo el sustrato dental no hay peligro de una posible fractura entre resina-dentina causada por el vacío de la metalizadora o del MEB, pues no existe dicha interfase.

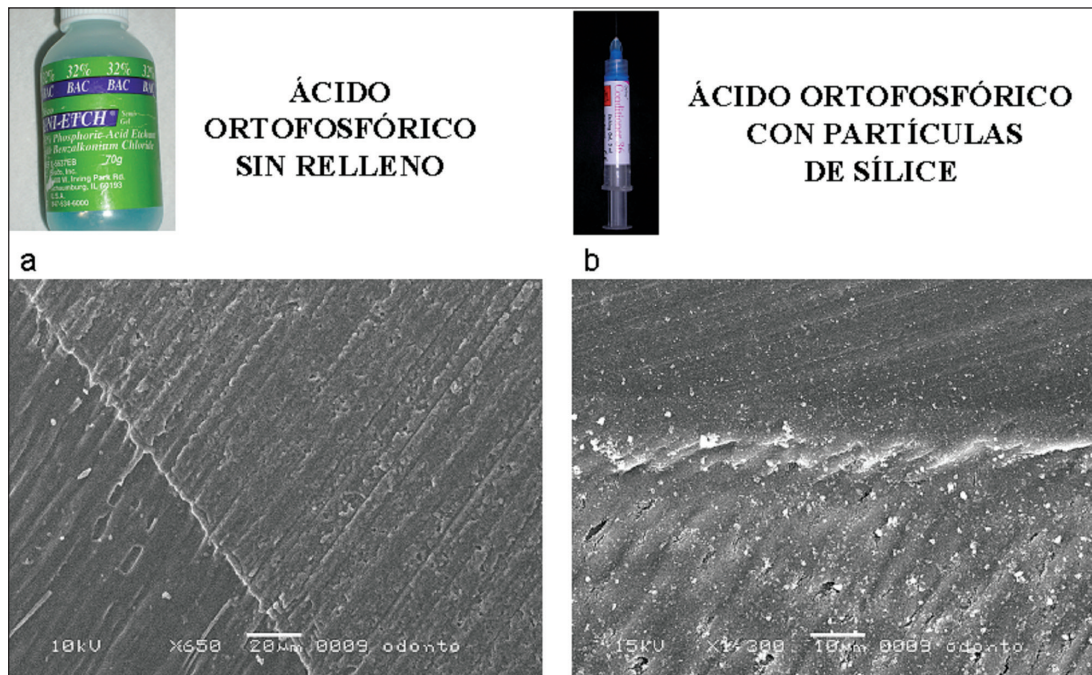


Fig. 10. Imágenes tomadas con un MEB con un patrón característico de la interfase adhesiva desmineralizada con diferentes ácidos ortofosfóricos. a) Imagen limpia al utilizar ácido ortofosfórico sin partículas de relleno. b) Se pueden observar partículas de sílice en toda la imagen, al utilizar el ácido ortofosfórico con relleno usado normalmente.

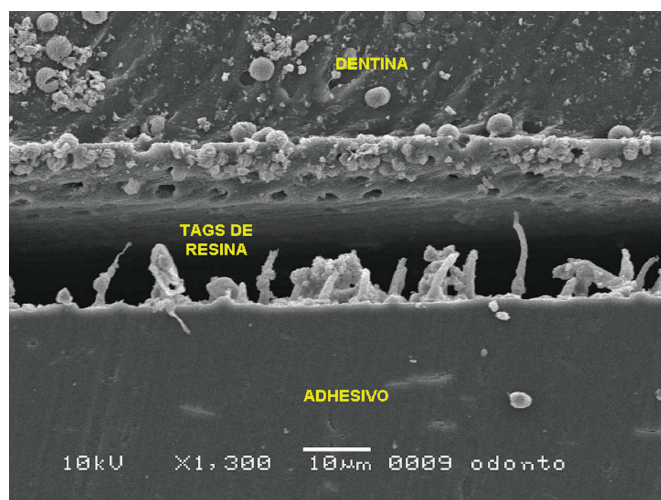


Fig. 11. Imagen realizada con un MEB ($\times 1.300$) a la interfase adhesiva de un sistema adhesivo de grabado total, al cual no se le ha realizado una réplica del espécimen preparado. Se puede apreciar la interfase adhesiva resina-dentina despegada como consecuencia de la tracción producida por el vacío realizado en el interior de la metalizadora o del MEB.

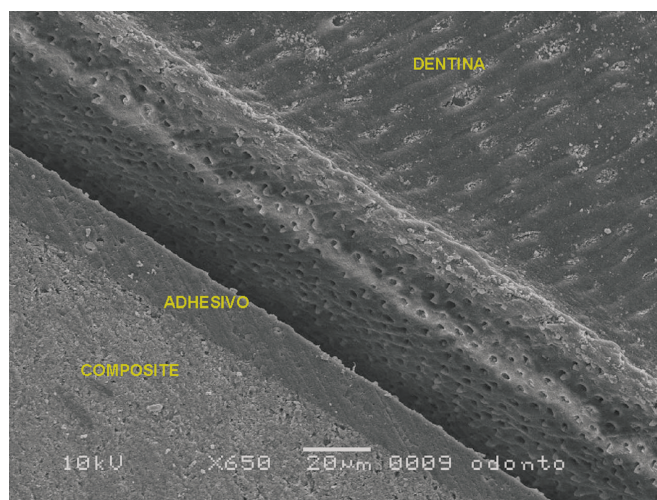


Fig. 12. Imagen realizada con un MEB ($\times 650$) a la interfase adhesiva obtenida con un sistema autograbador. Obsérvese la entrada de los túbulos expuestos al separarse la resina de la dentina, algunos de los cuales contienen dentro los tags fracturados.

Los diferentes sistemas adhesivos disponibles en el mercado hoy en día, forman una capa híbrida y unos *tags* de resina primarios y secundarios de unas características morfológicas diversas. Los adhesivos

autograbadores muestran un complejo híbrido muy delgado con respecto a los adhesivos convencionales de grabado total debido a que normalmente presentan un pH menor con respecto a éstos. Sin em-

bargo, se han obtenido unos valores de adhesión inmediatos bastantes altos (3, 9, 10). Esto quiere decir, que no existe una correlación entre el grosor de la capa híbrida y la eficacia adhesiva, sino que lo importante es obtener una capa híbrida uniforme, lo que significa, que la dentina intertubular descalcificada esté completamente infiltrada a lo largo de toda la superficie sin mostrar *gaps* (11-13).

De manera similar a lo que sucede con la capa híbrida, los *tags* de resina que muestran los adhesivos de grabado total son bastantes más largos que aquellos mostrados en los autograbadores (salvo en puntuales adhesivos autograbadores como por ejemplo el Clearfil SE Bond®) (14). En la interfaz resina-dentina, la contribución de los *tags* en las fuerzas de adhesión, varía dependiendo del sistema adhesivo usado, la orientación de los túbulos y la profundidad de la dentina a la que se encuentre (15). Se cree que la penetración de los *tags* dentro de los túbulos dentinarios, contribuye bastante poco a la fuerza de adhesión final alcanzada (5, 16). Sin embargo, los *tags* que muestran unas bases amplias, obtienen un buen sellado de la interfaz resina-dentina (17). También se pueden formar *tags* secundarios, o ramas laterales, los cuales son un signo de una adecuada infiltración y humectabilidad de la dentina descalcificada. Además, al contrario que para los *tags* principales, Mjör y cols. (18) demostraron que pueden suponer una retención suplementaria y por lo tanto influir directamente a la mejora de las fuerzas de adhesión. Esto *tags* secundarios suelen producirse en adhesivos de grabado total y en algunos adhesivos autograbadores como el Clearfil SE Bond® (14).

CONCLUSIÓN

El espécimen utilizado para evaluar la micromorfología de la interfase adhesiva resina-dentina con un microscopio electrónico de barrido se secciona en dos partes iguales, las cuales se prepararan de manera diferente. En una de ellas se estudia la capa híbrida y, en la otra, los *tags* de resina principales y secundarios.

Para que una imagen tomada con un MEB sea nítida, limpia y clara, el espécimen siempre debe manipularse con las pinzas, evitando que la zona a estudiar entre en contacto con cualquier tipo de superficie.

En la preparación de la parte seleccionada para observar la capa híbrida se debe utilizar un ácido ortofosfórico especial sin relleno que evitará el depósito de dichas partículas en la superficie a estudiar.

En los especímenes seleccionados para obtener imágenes de la capa híbrida se debe realizar una réplica del espécimen preparado para evitar la fractura de la interfase resina-dentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise N, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993;72:495-501.
2. Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthetic Dent* 1991;3:133-8.
3. Osorio R, Toledano M, De Leonardi G, Tay F. Microleakage and interfacial morphology of self-etching adhesives in class V resin composite restorations. *J Biomed Mat Res Part B: Appl Biomater* 2003;66B:399-409.
4. Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley D, Mazzotti G, Teti G, et al. Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: A FEISEM study. *Oper Dent* 2004;29:538-46.
5. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res* 1992;71:1530-40.
6. Fritz UB, Finger WJ. Bonding efficiency of single-bottle enamel/dentin adhesives. *Am J Dent* 1999;12:277-82.
7. Toledano M, Osorio R, Osorio E, Prati C, Carvalho R. Microhardness of acid-treated and resin infiltrated human dentine. *J Dent* 2004;33:349-54.

8. Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Perdigão J, Lambrechts P, et al. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent* 2000;13:3-18.
 9. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Tay FR, Ferrari M. Effect of cyclic loading on microtensile bond strengths of total-etch and self-etch adhesives. *Oper Dent* 2006;31:25-32.
 10. Toledano M, Osorio R, Albaladejo A, Aguilera FS, Osorio E. Differential effect of *in vitro* degradation on resin-dentin bonds produced by self-etch vs. total-etch adhesives. *J Biomed Mat Res Part A: Appl Biomater* 2006;77:128-35.
 11. Vargas MA, Cobb DS, Denehy GE. Interfacial micromorphology and shear bond strength of single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater* 1997;13:316-24.
 12. Inai N, Kannemura N, Tagami J, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall GW. Adhesion between collagen depleted dentin and dentin adhesives. *Am J Dent* 1998;11:123-7.
 13. Kenshima S, Reis A, Uceda-Gomez N, Tancredo de L, Filho LE, Nogueira FN, et al. Effect of smear layer thickness and pH of self-etching adhesive systems on the bond strength and gap formation to dentin. *J Adhes Dent* 2005;7:117-26.
 14. Albaladejo A. Estudio *in vitro* de factores que afectan la durabilidad de la adhesión a dentina. Tesis Doctoral. Granada, 2006.
 15. Tam LE, Pilliar RM. Fracture toughness of dentinal composite adhesive surfaces. *J Dent Res* 1994;73:607-19.
 16. Van Meerbeek B, Dhém A, Goret-Nicaise N, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993;72:495-501.
 17. Grégoire G, Millas A. Microscopic evaluation of dentin interface obtained with 10 contemporary self-etching systems: correlation with their pH. *Oper Dent* 2005;30:481-91.
 18. Mjör IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Arch Oral Biol* 1996;38:541-6.
- CORRESPONDENCIA**
- Alberto Albaladejo Martínez
Parque del Genil, Edificio Guadalquivir, 5º-B-2
18004 Granada
Correo electrónico: albertoalbaladejo@hotmail.com
Telf.: 637 278 495