

El Mehdi Chenguit

Testes biológicos na detecção de doenças da cavidade oral: revisão narrativa

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2020

El Mehdi Chenguit

Testes biológicos na detecção de doenças da cavidade oral: revisão narrativa

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2020

El Mehdi Chenguit

Testes biológicos na detecção de doenças da cavidade oral: revisão narrativa

Dissertação apresentada à Universidade
Fernando Pessoa, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em
Medicina Dentária

El Mehdi CHENGUIT

RESUMO

Os avanços científicos permitiram: uma melhor compreensão das etiologias e dos mecanismos do desenvolvimento das doenças da cavidade oral; o desenvolvimento da noção de risco periodontal e predisposição para doenças periodontais; o aparecimento do conceito de medicina periodontal e repercussões sistémicas das doenças periodontais; o desenvolvimento de novos meios auxiliares de diagnóstico; desenvolvimento de um conceito de tratamento não cirúrgico como tratamento por si só e sua orientação para tratamentos médicos adjuvantes, e o desenvolvimento de um tratamento de manutenção.

Este trabalho pretende, com base numa revisão narrativa da literatura, descrever o conceito dos meios biológicos de diagnóstico e a sua participação na prática diária no consultório dentário. Vão ser apresentados os princípios dos meios de diagnóstico seguintes: testes microbiológicos aplicados à deteção de patógenos periodontais baseados em métodos bacteriológicos, imunológicos e moleculares.

Palavras chave: testes biológicos em medicina dentária; ELISA; doença da cavidade oral; periodontite

ABSTRACT

Scientific advances have led to: a better understanding of the etiologies and mechanisms of oral cavity diseases development; a development of the notion of periodontal risk and predisposition to periodontal diseases; an emergence of the concept of periodontal medicine and systemic repercussions of periodontal diseases; a development of new diagnostic aids; a development of a nonsurgical treatment concept as a treatment in itself and its orientation towards adjunctive medical treatments; and the development of maintenance treatment.

This work attempts, based on a narrative review of the literature, to describe the evolution in the concept of microbiological methods of diagnosis and how they contribute to daily practice in dental office. Different diagnosis tests will be presented: microbiological tests applied to the detection of periodontal pathogens based on bacteriological, immunological and molecular methods.

Keywords: biological tests in dental medicine; ELISA; oral cavity disease; periodontitis

DEDICATÓRIA

Pour ma mère, la femme qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

AGRADECIMENTOS

Je remercie tout d'abord ma mère. Merci pour le soutien, les conseils, pour la motivation que tu me donnes, pour la préoccupation que tu as pour moi dans les moments les plus difficiles, mais surtout pour croire en moi et être toujours positive dans toutes les circonstances et difficultés. Je te remercie pour tout cela et tant d'autres choses. J'ai l'honneur de pouvoir aujourd'hui te rendre d'autant plus fière de moi, et c'est la meilleure des réussites.

Je remercie ma sœur qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours soutenu. Qui a pu s'occuper de ma mère pendant mon absence, toutes ces années loin de la maison.

Je remercie ma professeur orientatrice, Inês Lopes Cardoso, pour sa disponibilité, sa réponse rapide. Merci pour le parfait travail d'orientatrice et pour l'aide que vous m'avez apporté.

Je remercie tous les profs pour la transmission de leur savoir, théorique et pratique, et leur disponibilité.

Je remercie mes amis et frères avec qui j'ai partagé ces années, Smail birrya, Smail Basla, et Massin la Masse. Merci pour tous les moments heureux et toutes les péripéties passées ensemble.

Je remercie Eve, avec qui j'ai partagé des moments de fou rire et de complot. Merci pour être ce que tu es, pour ton soutien, et pour la motivation que t'as pu susciter en moi.

Merci à mon père, d'avoir involontairement suscité en moi ce défi, le défi de te montrer ce que je vau.

ÍNDICE

RESUMO	V
Abstract	VI
Dedicatória	VII
Agradecimentos	VIII
Índice Geral	IX
Índice de Figuras	X
Índice das Tabelas	XI
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Materiais e Métodos	1
II. DESENVOLVIMENTO	2
2.1. Doença Periodontal	2
2.2. Generalidades sobre os testes biológicos	3
2.3. Testes Microbiológicos	3
2.3.1. Culturas bacterianas	4
2.3.2. Testes imunológicos	5
a) ELISA	5
b) Microscopia de imunofluorescência	5
2.4. Testes moleculares baseados na análise de ácidos nucleicos	6
2.4.1. Técnicas de hibridação	6
2.4.2. PCR	7
2.5. Testes sobre produtos do metabolismo bacteriano	7
2.5.1. Testes enzimáticos	8
2.5.2. Testes sob compostos sulfurosos voláteis	8
2.6. Microscopia ótica (fundo preto e contraste de fase)	9
2.7. Testes baseados na reação do hospedeiro	9
2.8. Testes genéticos e apreciação do risco	11
2.9. Exploração das funções biológicas	12
III. DISCUSSÃO	14
IV. CONCLUSÃO	15
V. Bibliografia	16

Lista de Abreviaturas

ANSM: *Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé*

AVK: anti-vitamina K

BANA: Benzoil DL-Arginina-Naftilamida

CFU: unidades formadoras de colónias (do inglês *Colony Forming Unit*)

ELISA: Ensaio enzimático (do inglês *Enzyme Linked Absorbent Assay*)

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

INR: Razão Normalizada Internacional (do inglês *International Normalized Ratio*)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

RT-PCR: PCR em tempo real (do inglês *Real Time PCR*)

Lista de Figuras

Figura 1. Os complexos microbianos (Socransky, 1998).

Figura 2. Exemplos de culturas bacterianas.

Figura 3. Colónias puras de *Porfiromonas gingivalis* e de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (Wolf, 2005).

Figura 4. Exemplo de antibiograma.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Amostragem com cone de papel estéril de uma bolsa periodontal, para análise bacteriana (Bouchard, 2015).

Tabela 2. Etapas de identificação e diferenciação das estirpes bacterianas (Bouchard, 2015).

Tabela 3. Resumo das características dos testes biológicos.

I. INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta inúmeras bactérias como fazendo parte do microbioma oral. Estas bactérias podem ter uma relação compatível com o hospedeiro, fazendo parte da microflora oral normal, ou pelo contrário ser oportunistas, tornando-se prejudiciais ao hospedeiro e provocando doenças na cavidade oral (Patil et al., 2013).

Um das doenças orais mais relevantes é a doença periodontal, que é definida como doença infecto-inflamatória que afeta os tecidos de suporte e sustentação do dente, com sintomas e sinais discretos, e com etiologia multifatorial (ANAES, 2002; American Academy of Periodontologie, 2001). Apresenta-se como uma inflamação visível ou não, com sangramento gengival espontâneo ou provocado, perda óssea e desenvolvimento de bolsa periodontal, mobilidade dentária ou mesmo perda de dentes (Bouchard, 2015). Sem acompanhamento clínico regular e rigoroso, e devido à complexa etiopatogenia, o diagnóstico desta patologia torna-se difícil e frequentemente tardia. É muito importante diagnosticar precocemente esta doença de modo a aplicar uma terapêutica adequada, particularmente nas formas mais agressivas. É importante determinar a natureza dos agentes infecciosos, o nível de gravidade da doença, o grau de risco de o indivíduo desenvolver doença periodontal e a sua evolução após tratamento, de maneira a permitir um prognóstico fiável. Por esta razão, existem vários métodos de diagnóstico que podem ser classificados como (Abdellaoui et al., 2007):

- Testes microbiológicos representados por testes bacterianos e micogénicos, que envolvem culturas bacterianas, testes imunológicos e microscopia ótica.
- Testes enzimáticos e técnicas moleculares.
- Testes baseados na resposta do hospedeiro.
- Testes genéticos que determinam a suscetibilidade do indivíduo para doença periodontal.

1.1. Materiais e Métodos

Recorreu-se a artigos científicos indexados em bases de dados como PubMed, Medline, Google Scholar, Science Direct para fazer uma revisão narrativa. As palavras chave utilizadas foram: “testes biológicos em medicina dentária”; “ELISA”; “doença da cavidade oral”, “periodontite”, adicionando-se filtros como “full text available”. Os critérios de inclusão foram os seguintes: consideraram-se os artigos escritos em francês, português, italiano ou inglês e de acesso livre. Os critérios de exclusão foram os seguintes: artigos com abordagens menos pertinentes para o trabalho. No final, foram selecionados 76 artigos, livros e páginas na internet com informação considerada relevante para o desenvolvimento da tese.

II. DESENVOLVIMENTO

2.1. Doença Periodontal

As doenças periodontais agrupam doenças de origem infecciosa localizadas no periodonto: as gengivites e as periodontites. As gengivites localizam-se na gengiva (periodonto superficial) e são reversíveis, as periodontites localizam-se à nível mais profundo (desmodonto, osso alveolar) e são irreversíveis (Caton, 2018; Socransky et al., 1998). A presença de bactérias na cavidade oral é afetada por fatores físicos variáveis. Dependendo do local onde estas se encontram e do intervalo de tempo em que estão nesse local estes fatores são a temperatura, pH, potencial oxido-redutor e pressão de CO₂. Deste modo, a cavidade torna-se um meio favorável à proliferação de bactérias que organizem se em biofilmes, aumentando a virulência. Assim sendo, de acordo com Loe et al. (1965) o principal fator etiológico é a placa bacteriana, que desencadeia um mecanismo de destruição periodontal, modulado pela resposta do hospedeiro, assim como por outros fatores de risco (Loe et al., 1965; Murakami et al., 2018). As bactérias são classificadas de acordo com diferentes parâmetros, como: morfologia ao microscópio, mobilidade, coloração de Gram, tipo de metabolismo, etc. Esta classificação também se baseia na taxonomia, na relação filogenética entre bactérias, que permite reagrupar as bactérias geneticamente próximas na mesma espécie, as espécies mais próximas em géneros, os géneros comuns na mesma família e as famílias comparáveis na mesma ordem (Brenner et al., 2005). Na cavidade oral, foram já identificadas 300 espécies bacterianas, mas também estão presentes vírus e fungos, dando uma infinidade de nichos ecológicos. Destas 300 espécies identificadas, só 40 são cultiváveis e podem ser estudadas e agrupadas em diferentes complexos classificados por cores de acordo com o grau de patogenicidade bacteriana (Charon e Mouton, 1999). As cores atribuídas foram: vermelho para as estirpes bacterianas encontradas em locais -com perda de inserção dentária, laranja, amarelo, verde e roxo, por ordem de patogenicidade (Brenner et al., 2005) (Figura 1). Isto ajuda a definir as interações bactéria/bactéria e bactéria/hospedeiro, e exclui a hipótese de que apenas uma bactéria seja o agente etiológico da patologia. Em vez disso, um conjunto de espécies bacterianas organizadas em complexos ao longo do tempo será responsável pelo desenvolvimento desta condição (Socransky et al., 1998). No entanto, algumas destas bactérias também estão presentes em locais sãos, por exemplo as dos complexos amarelo, verde e roxo. Os complexos vermelho e laranja englobam as bactérias periodontopáticas (Loomer, 2004).

Hoje em dia, é possível a quantificação destas bactérias e a determinação do perfil da flora subgingival, através de testes biológicos. Deste modo, será possível uma melhor escolha da estratégia de tratamento das doenças da cavidade oral.

2.2. Generalidades sobre os testes biológicos

Hoje em dia, existe uma grande variedade de testes, que com a evolução tecnológica das últimas décadas se têm tornado cada vez mais precisos. A utilização destes testes na área da Medicina Dentária pode ter grande importância na despistagem de indivíduos com risco de desenvolvimento de certas doenças, mas também ajudar na decisão terapêutica, na reavaliação e no acompanhamento após tratamento (Suchett-Kaye et al., 2001).

O teste ideal deve ser quantitativo, altamente sensível e específico, reproduzível, simples de executar, rápido, não invasivo, barato, simples em relação à técnica de pré-entrega, armazenamento e transporte. A sensibilidade de um teste corresponde à probabilidade deste ser positivo quando a doença está presente. Por outro lado, a especificidade corresponde à probabilidade do teste ser negativo quando não há doença. O valor preditivo do teste corresponde, respetivamente, ao número de vezes que o teste identificou corretamente a presença ou ausência da doença.

O *Gold Standard* representa o melhor teste disponível até ao momento (teste de *benchmark*). Portanto, esta classificação é relativa uma vez que, pelo desenvolvimento de novos testes, tende a ser substituído por um melhor (Loomer, 2004).

2.3. Testes microbiológicos

Os testes microbiológicos compreendem as técnicas de culturas bacterianas e técnicas imunológicas (Enzyme Linked Absorbent Assay, microscopia de imunofluorescência) (Listgarten, 1992).

2.3.1. Culturas bacterianas

Esta é a técnica de referência, considerada Gold Standard, para determinar a patogénese periodontal (Loomer, 2004; Zambon e Haraszhy, 1995). Permite deteção de um grande número de agentes patogénicos (Figura 2), a identificação e quantificação das bactérias, mas sobretudo

a determinação da suscetibilidade bacteriana a antibióticos pela realização de antibiogramas (Charon e Mouton, 1999; Slots e Tings, 1997).

O método baseia-se na colheita e cultura das bactérias e fungos num meio de cultura apropriado (Figura 3). A amostra é recolhida das bolsas periodontais com a técnica dos cones de papel estéreis, sendo este o método mais recomendado devido à sua capacidade de isolar bactérias anaeróbias (Bouchard, 2015). A amostra é transportada em tubos com meio de cultura o que permite preservar a vitalidade das bactérias (até 48 horas após a amostragem) (Tabela 1) (Poulet et al., 1996).

Após plaqueamento, existem várias etapas que irão permitir a identificação e diferenciação bacteriana (Tabela 2), uma vez que cada agente patogénico tem características próprias que o distingue de outros agentes (Charon e Mouton, 1999).

De modo a testar a sensibilidade das bactérias a diferentes antibióticos, é realizado o antibiograma que consiste na colocação de discos com diferentes antibióticos na superfície do meio de cultura contendo cultura bacteriana (Yoshida e Ansai, 2012) (Figura 4). Após 24-48 horas de incubação anaeróbica a 37°C, faz-se a medição da zona ou diâmetro de inibição em milímetros. Esta medida, de acordo com valores tabelados, permite classificar as bactérias com propriedade de resistência (R), de resistência intermédia (I), ou de sensibilidade (S) aos antibióticos testados, permitindo assim escolher o antibiótico específico para as bactérias estudadas (Charon e Mouton, 1999).

Apesar do facto de as culturas bacterianas serem consideradas o Gold Standard, esta técnica encontra-se em desuso devido ao tempo necessário para a sua realização, dos imperativos técnicos, do preço e da dificuldade de padronização. A sensibilidade deste teste, as variáveis ao longo da sua realização, e a impossibilidade de cultivo de algumas bactérias levam ao aparecimento de falsos negativos. Por esta razão, hoje em dia, outros testes, como técnicas imunológicas e moleculares começam a substituí-lo (Eick e Pfister, 2002).

2.3.2. Testes imunológicos

Os testes imunológicos são altamente específicos, permitindo detetar determinados antígenos baseando-se na reação antígeno-anticorpo, por detecção direta (através do uso de uma cultura bacteriana ou soro) ou detecção indireta (pela detecção da presença de IgG ou IgM, durante a reação humoral contra as bactérias) (Slots et al., 1985). Esta reação específica é observada pela utilização de anticorpos primários associados a marcadores fluorescentes que se ligam ao

antigénio, ou pelo uso de um anticorpo secundário marcado que irá reconhecer o anticorpo primário (Charon e Mouton, 1999).

a. ELISA (*Enzyme Linked Absorbent Assay*)

O teste de ELISA une a especificidade de uma ligação anticorpo-antigénio bacteriano, com a sensibilidade de uma reação enzimática, permitindo a deteção de quantidades mínimas de uma determinada substância com grande confiabilidade (Crowther, 2009).

Os anticorpos (correspondentes às bactérias procuradas) são colocados numa placa de ELISA e líquido ou soro gengival é colocado por cima, permitindo a ligação específica dos antigénios circulantes ao anticorpo. Após lavagem, é adicionado um anti-anticorpo (anticorpo secundário) acoplado a uma enzima (geralmente uma peroxidase ou fosfatase alcalina). Havendo formação de um complexo, ocorre uma reação colorimétrica, cuja intensidade é detetada por espectrofotometria, permitindo a semi-quantificação (determinação aproximada do número de bactérias presente) (Crowther, 2009).

b. Microscopia de imunofluorescência

Existem dois tipos de anticorpos: os anticorpos monoclonais, que identificam apenas uma única configuração molecular, neste caso a bactéria alvo, portanto, irá detetar apenas a espécie com antigénio específico; e anticorpos policlonais que reconhecem várias espécies reagindo com estruturas menos específicas. Assim, por marcação dos anticorpos com fluoresceína (fluorescência verde), estes irão ligar-se às bactérias. Após fixação, os anticorpos são detetados no microscópio sob luz UV (Sauvetre, 1994).

As principais vantagens dos testes imunológicos são a alta especificidade e sensibilidade para as bactérias, o tempo de execução, mas também a simplicidade e a possível padronização e o facto de não ser preciso usar microrganismos vivos (Netuschil et al., 1996). No entanto, a visualização dos resultados por microscopia de imunofluorescência implica custos aumentados (Suchett-Kaye et al., 2001). Ela não permite uma avaliação precisa da atividade da doença e não podemos prever a evolução desta (Greenstein, 1990).

Outra desvantagem é não permitir a descoberta de novos agentes patogénicos, uma vez que utiliza anticorpos específicos para os antigénios em estudo. Ademas não permite de estabelecer antibiogramas a diferença das culturas (Sixou, 2003).

2.4. Testes moleculares baseados na análise de ácidos nucleicos

2.4.1. Técnicas de hibridação

As técnicas de hibridação baseiam-se no uso de sondas, sequências de cerca de 20 nucleótidos, complementares a segmentos de DNA ou RNA do microrganismo em estudo (ANAES, 2002; INSERM, 1999). O princípio desta técnica é a detecção específica do microrganismo, através da hibridação da sonda com os genes complementares do antígeno (Charon e Mouton, 1999). A sonda é geralmente marcada com isótopos radioativos ou marcada por métodos não radioativos (químicos, enzimáticos ou imunológicos) permitindo assim a sua detecção (GUIRAUD, 1993). A utilização de sondas moleculares apresenta muitas vantagens, tal como a rapidez de obtenção dos resultados (1-7dias), mas também a alta especificidade e sensibilidade. A especificidade desta técnica resulta da capacidade de reconhecimento do DNA alvo, não havendo hibridações inespecíficas (com DNA de outras bactérias) que levariam a falsos positivos. A sensibilidade é condicionada pelo tipo de marcação da sonda usada na detecção do ácido nucleico alvo. Outra vantagem é não requerer a viabilidade dos microrganismos.

Tem, no entanto, algumas limitações, como só permitir a detecção das estirpes procuradas, mas também ser elevada em termos de custo.

2.4.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O PCR é uma técnica que se baseia na amplificação de determinadas sequências de um genoma por uma DNA polimerase, o que permite um limiar de detecção muito mais baixo do que as técnicas anteriores. Pode ser usado para detetar uma região específica de um gene da bactéria, determinando assim a sua presença numa flora complexa. Não há restrições de tempo na utilização das amostras uma vez que não é necessária a presença de bactérias vivas.

O ponto crítico desta técnica é a escolha adequada dos oligonucleótidos (*primers*) que irão ser usados na amplificação da região de interesse. O PCR envolve três etapas: desnaturação do DNA, emparelhamento dos *primers* e alongação ou síntese de DNA. Em cada ciclo de PCR o número de moléculas de DNA duplica, sendo, portanto, uma amplificação exponencial (Charon e Mouton, 1999).

Além do PCR convencional, também existe o PCR em tempo real, em que a libertação de um reagente fluorescente durante a síntese de DNA, permite a detecção dos produtos de PCR no decurso da reação. Ao contrário da PCR convencional, essa técnica permite a quantificação do

número de agentes patogénicos (o aumento do sinal de fluorescência é diretamente proporcional ao número de cópias de DNA geradas durante o PCR) (Guillot e Mouton, 1996). Estando o aparelho de PCR acoplado a um computador, é possível monitorizar e rastrear as curvas de amplificação e a quantificação precisa. É um método específico, preciso e sensível, com um limiar de deteção de 100 bactérias, mas é acima de tudo rápido (2-4 horas) e totalmente automatizado, daí a sua reprodutibilidade.

O teste Affirm DP® de Microprobe pode ser realizado no consultório em menos de 40 minutos. Este teste permite detetar as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus* e *Prevotella denticola*. Ocorre o desenvolvimento de cor azul quando as bactérias se encontram com concentração superior à taxa de deteção do teste (Yano et al., 1996). Como RT-PCR existe Meridol Perio Diagnostics® (GABA, Suisse) que deteta os seis microrganismos envolvidos no desenvolvimento da periodontite. Também mer micro-IDent® e micro-IDent®plus (HainLifeScience, Alemanha) podem detetar até 9 microrganismos (Jervoe-Storm et al., 2005; Verner et al., 2006).

2.5. Testes sobre produtos do metabolismo bacteriano

2.5.1. Testes enzimáticos

Este tipo de teste visa a pesquisa de uma enzima específica presente numa ou mais bactérias. A concentração de determinada enzima no fluído gengival e na saliva está diretamente relacionada com a presença de doença (Giannobile et al., 2009). Entre estes ensaios enzimáticos está o teste do BANA que identifica a presença de uma enzima semelhante à tripsina, que hidrolisa o substrato sintético BANA (benzoyl DL-arginina-naftilamida) cuja presença está significativamente relacionada com a profundidade das bolsas e perda de inserção superior a 4 mm. Esta enzima é produzida por três espécies bacterianas: *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* (que pertencem ao complexo vermelho). Um dos produtos de degradação deste composto é a β -naftilamida, que pode ser visualizada por uma reação colorimétrica. Deste modo, a presença de cor permite detetar indiretamente a presença dessas bactérias (Charon e Mouton, 1999). Trata-se de um teste com 90-96% de sensibilidade e 83-92% de especificidade. No entanto, a estirpe *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* não pode ser detetada através do teste do BANA. Verifica-se que o número de locais positivos para BANA observados em pacientes com periodontite diminui após uma destartarização rigorosa (Hemming et al., 1997).

2.5.2. Testes em compósitos sulfurosos voláteis

As bactérias anaeróbicas libertam moléculas provenientes da degradação de proteínas séricas. Estes produtos de degradação estão implicados na halitose, uma das características das doenças periodontais. Os captadores eletroquímicos biológicos captam estes produtos da expiração do paciente, fornecendo a composição final dos compósitos sulfurosos voláteis. Se a concentração dessas moléculas for inferior à 100 trata-se de um valor normal, entre 100 e 180 corresponde a baixa halitose, e um valor superior a 250 diagnostica uma halitose crónica (Rosenberg et al., 1991).

Os tratamentos não cirúrgicos de periodontia e a utilização de raspadores de língua limitam esta técnica, uma vez que reduzem os níveis dos compostos a detetar, levando a falsos negativos. Também podem surgir falsos positivos resultantes da presença de outros produtos voláteis como a acetona, o etanol e o metanol (Lemaitre et al., 1991).

2.6. Microscopia Ótica (fundo preto e contraste de fase)

Esta técnica permite o exame direto da flora subgengival, por análise ao microscópio das bactérias presentes num determinado local ou numa mistura de amostras, no prazo de uma hora. O microscópio de contraste de fase tem maior resolução do que o microscópio a fundo preto. Este método permite determinar os diferentes tipos de bactérias presentes e quantificá-las, quer sejam móveis (espiroquetas, bacilos móveis), ou imóveis (coccus, bacilos não móveis), e também determinar a densidade microbiana média e a mobilidade global. Os resultados observados em locais sãos e zonas com doença serão diferentes, permitindo distinguir dois tipos de flora: flora compatível e flora incompatível com a saúde periodontal. No primeiro caso, observa-se elevado número de cocci e de filamentos não móveis, com formação característica em espiga de milho. Na flora incompatível, encontram-se espiroquetas e bastonetes móveis (Charon e Mouton, 1999).

As vantagens desta técnica são de ser um exame direto, simples, rápido, não invasivo, barato e sem necessidade de coloração. No entanto, não existe correlação entre as espécies bacterianas detetadas, e a profundidade das bolsas periodontais, e a quantificação das bactérias não permite avaliar o grau da doença (Wolf et al., 2005).

As principais desvantagens deste teste, são não permitir a distinção entre espécies bacterianas que apresentem a mesma morfologia (observação subjetiva), e não determinar a presença de

bactérias do complexo vermelho (*P. gingivalis* e *T. forthysia*) (Byrne et al., 2009). Mais ainda, não permite a quantificação direta (pouca especificidade). Devido às limitações descritas, este teste não pode ser considerado como um meio de diagnóstico fiável, não ajudando na escolha da antibioterapia adequada (Wolf et al., 2005).

2.7. Testes baseados na reação do hospedeiro

Embora a periodontite e a gengivite sejam de origem infecciosa, a resposta do hospedeiro tem um papel importante na gênese destas doenças, envolvendo um grande número de intervenientes da inflamação e da imunidade, presentes, na maioria, no fluido gengival e na saliva. A resposta do hospedeiro é principalmente protetora. No entanto, uma resposta descontrolada (forte ou fraca demais) pode levar à destruição do periodonto. Isto é regulado por um grande número de mediadores químicos, como citocinas e os seus recetores, derivados do ácido araquidónico e metaloproteinases da matriz (MMP) (Pihlstrom et al., 2005; Sorsa et al., 2010). Os linfócitos T, os monócitos, e também as células endoteliais, os fibroblastos e os queratócitos, segregam citocinas pró-inflamatórias: a interleucina-1, interleucina-6, interleucina-8, e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Ouhara et al., 2006).

A interleucina-1 participa na destruição do tecido (perda óssea e inibição da formação óssea) e consequente perda de inserção (Okada e Murakami, 1998). A sua expressão é induzida por bactérias do complexo laranja de Socransky, por produtos bacterianos como lipopolissacarídeos, pela *P. gingivalis fimbriae*, pelo TNF- α e por si próprio (Bolstad et al., 1996).

O TNF- α está envolvido em muitas doenças inflamatórias crónicas e na destruição dos tecidos que as acompanham, estimulando a produção de colagenases pelos fibroblastos que degradam o colagénio tipo 1 das células, ativa os osteoclastos, e apesar de partilhar ações com a interleucina-1, é ainda mais agressivo para os tecidos (Charon, 2009).

A- interleucina-6 influencia a resposta imune e inflamatória, estando envolvida na secreção de anticorpos. Participa da homeostase óssea, estimulando os osteoclastos. Esta interleucina foi encontrada em grandes quantidades na periodontite. O fluido gengival de locais ativos contém mais interleucina-6 do que os locais em repouso (Trindade et al., 2013).

A interleucina-10 desempenha um papel protetor durante a periodontite, inibindo a síntese de metaloproteinases da matriz por fibroblastos e macrófagos e acelerando a síntese de inibidores das metaloproteinases. Estimula a produção de elementos antagonistas da interleucina-1 β , e diminui a produção de interleucina-1 e de TNF- α (Charon, 2009).

O ácido araquidônico é o precursor essencial de várias classes de moléculas de sinalização: prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. As prostaglandinas estimulam a inflamação, regulam o fluxo sanguíneo para certos órgãos, controlam o transporte de íons através das membranas, modulam a transmissão sináptica e induzem o sono (Sigal, 1991; Lands, 1991).

A prostaglandina E2 está envolvida na reabsorção óssea e na destruição dos tecidos. Além disso, ela inibe a produção de certas citocinas como o TNF- α . Para evitar inflamação excessiva, pode levar a alveólise e estimular a cicatrização. Esta prostaglandina é induzida por IL-1 e TNF- α (Okada e Murakami, 1998).

Biomarcadores de fluídos orais que foram estudados para diagnóstico periodontal incluem proteínas do hospedeiro (por exemplo, imunoglobulinas), marcadores fenotípicos, células hospedeiras (por exemplo PMN), hormonas, bactérias e produtos bacterianos, íons e compostos voláteis. Os testes baseados na resposta do hospedeiro, permitem uma avaliação através da dosagem destes produtos libertados durante a agressão bacteriana, e encontrados no fluido gengival ou mesmo na saliva. O fluido gengival é um exsudado inflamatório sérico presente no sulco ou nas bolsas, originário da inflamação das estruturas periodontais, sendo que a sua composição depende de fatores locais e gerais relacionados com o estado de saúde periodontal do indivíduo (Deneshmann e Wade, 1976; Champagne, 2003).

Os testes têm como objetivo contribuir para o estabelecimento de um diagnóstico e ajudar no prognóstico, graças a substâncias do fluido gengival que detêm um grande potencial para servir como indicadores de doença periodontal e cicatrização pós-terapia. Idealmente, estas substâncias devem complementar as análises microbiológicas e permitir a identificação de pacientes em risco de doença ativa, ou permitir uma avaliação do efeito terapêutico. Estão comercializados testes para a medição da temperatura das bolsas periodontais, da aspartato aminotransferase e de proteases neutras. No entanto, o interesse clínico destes testes ainda não está enraizado (Etienne et al., 2003).

Periotron® é um teste baseado na medição do volume do fluido gengival, o que reflete o estado de inflamação (Tsuchida e Hara, 1981; Pellat, 1991).

Há ainda uma sonda térmica automática (Periotemp®, Abiodent, EUA), que, quando inserida nas bolsas periodontais, permite medir a temperatura subgengival média. A temperatura nas bolsas periodontais é superior a temperatura de um sulco sã (Haffajee et al., 1992). No entanto, apesar de poder detetar locais ativos, especialmente durante a fase de manutenção, este teste é muito pouco sensível (muitos falsos negativos), mas altamente específico, o que implica um baixo valor diagnóstico.

2.8. Testes genéticos e apreciação do risco

Existem síndromes genéticas associados a certas formas de periodontite severa como as síndromes de Chdiak-Higashi, de Papillon-LeFevre, e d'Ehlers-Danlos (Hans e Mehta, 2011). Uma única mutação genética num único *locus* pode alterar a sensibilidade a doença periodontal (De Carvalho et al., 2009). Também existem outros fatores de risco a ter em consideração (Pihlstrom et al., 2005), como a interação do gene com o ambiente, uma vez que são fatores importantes na avaliação do risco familiar (Kinane e Hart, 2003).

Face a um agente agressor, a resposta inter-individual é diferente, devido a polimorfismos genéticos de certos fatores do hospedeiro (Kornman et al., 1997). Boughman et al. (1992) estimam que crianças com periodontite agressiva localizada têm em 40-50% dos casos irmãos com presença da doença.

Parkhill et al. investigaram a frequência do polimorfismo para IL-1 β -3953 na população caucasiana com periodontite agressiva em comparação com um grupo controle. Este estudo mostra que a frequência desse alelo é significativamente maior em pacientes com periodontite agressiva

O teste PST, permite identificar estes polimorfismos, por exemplo no gene que codifica a síntese da Interleucina 1 β (Charon, 2009). Estudos de Parkhill et al. (2005) mostram que pacientes com periodontite agressiva apresentam de maneira significativa, maior frequência do alelo polimórfico do gene da interleucina-1 β , quando comparados com um grupo saudável. Doentes com interleucina-1 positivo apresentam mais sangramento à sondagem que o grupo com Interleucina-1 negativo. Isto indica uma predisposição de certos indivíduos para uma resposta hiper-inflamatória dos tecidos periodontais (Lang et al., 2000). Este teste permite a detecção precoce do aparecimento de doença periodontal, permitindo aconselhar meios de prevenção e gerir os fatores de risco identificados. A desvantagem deste teste é a sua sensibilidade e especificidade limitada (Kornman et al., 1997). Para além deste, outros polimorfismos genéticos podem representar risco para doença periodontal (Nibali et al., 2010; Shao et al., 2009).

A *Interleukin Genetics*, Waltham, Massachusetts, produz testes de suscetibilidade genética para periodontite crónica grave. Indivíduos identificados como "genótipo positivo" são mais suscetíveis a ter o fenótipo de sobre-expressão desse gene. Isto mostra que a genómica pode ser aplicada na previsão de predisposição a periodontite em certas populações de pacientes.

2.9. Exploração das funções biológicas

Em pacientes com doenças sistêmicas, a medicação pode interferir com os atos de tratamento dentários e vice-versa. Pode então ser necessária uma exploração das principais funções fisiológicas (prescrição de um exame biológico). Uma anamnese rigorosa e precisa é indispensável.

Nos doentes que tomam anticoagulantes, antiagregantes, hemofílicos ou com antecedentes familiares de hemofilia, ou em pacientes com sangramento importante ou prolongado, a exploração da hemóstase é importante para evitar riscos de hemorragia. Esta engloba a hemóstase primária, que consiste na quantificação das plaquetas, na determinação do tempo de sangramento e na exploração biológica da coagulação.

Esta exploração biológica visa as vias envolvidas na cascata de coagulação. A via endógena pode ser avaliada por teste baseado na medição do tempo de coagulação de um plasma sanguíneo na presença de um substituto de plaquetas (cefalina) e um ativador de partículas (sílica, caulino). O teste baseia-se na avaliação, em percentagem, do tempo de coagulação do sangue a 37°C, chamado taxa de protrombina (TP), medindo a eficácia de vários fatores envolvidos na coagulação (fatores VII, V, X e protrombina). Em pessoas sob tratamento com anticoagulantes como anti-vitamina K (AVK), o resultado é expresso em INR (International Normalized Ratio) (Chris et al., 2009).

Estes testes são importantes pois auxiliando a anamnese, permitem dar informações sobre o doente e a sua doença sistémica e adaptar o tratamento dentário em função dela (Pascal, 2015). Testes bioquímicos também podem auxiliar a anamnese, como por exemplo a exploração do metabolismo glicídico nos diabéticos ou em doentes com fatores de risco pelo diabetes. Estes podem fazer-se com a medição da glicemia em jejum, ou dosagem da hemoglobina glicada, permitindo avaliar a qualidade do equilíbrio de um paciente diabético tratado. Os diabéticos, por serem doentes de afeção sistémica, precisam de cuidados particulares (Mealey e Oates, 2006).

Também o metabolismo hepático deve ser levado em consideração, quando são prescritos determinados medicamentos potencialmente hepatotóxicos ou com excreção/desintoxicação hepática, uma vez que um grande número de fatores da coagulação, é sintetizado a nível hepático (Anagnostou et al., 2011).

O metabolismo renal, com exames sanguíneos e urinários, permite a dosagem da creatina, dando o débito da filtração renal, que nos permite ajustar o tratamento e adaptar a posologia, em caso de insuficiência renal (Rerhrhayel et al., 2010).

Todos estes testes biológicos são essenciais para o atendimento do paciente, ajudando num tratamento personalizado e diminuindo o risco de erros e de complicações (Anagnostou et al., 2011).

III. DISCUSSÃO

A capacidade de monitorizar o estado de saúde, o início e a progressão da doença e o resultado do tratamento por meios não invasivos é um objetivo muito desejável na promoção e prestação de serviços de saúde. Os testes biológicos na área da medicina dentária podem ser utilizados na fase de diagnóstico, de prognóstico, de tratamento em si e na fase de controlo da doença e de manutenção. Como a periodontite é uma doença multifatorial que inclui o aparecimento de bactérias e a interação com o hospedeiro, é improvável que um único biomarcador seja capaz de prever a atividade da doença periodontal.

Na fase de diagnóstico, os biomarcadores permitem identificar os diferentes perfis microbianos das diferentes infeções periodontais. Isso permite identificar os indivíduos em risco de desenvolver doença periodontal, antecipando o aparecimento e a evolução das lesões periodontais (Baehni et al., 1996). Permitem também evitar complicações, explorando as funções biológicas nos pacientes com doença sistémica e/ou medicação, que possa interferir na boa prática dos tratamentos dentários.

Na fase de prognóstico, estes testes permitem avaliar os resultados da terapia. Na fase de tratamento permitem a personalização do tratamento, por possibilitar a deteção bacteriana precisa (Socransky e Haffajee, 1994). O estudo de Verner (2007) permitiu demonstrar uma forte diferença entre a antibioterapia baseada nos testes de sensibilidade aos antibióticos e as recomendações da ANSM (*Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé*) (Verner, 2007).

Na fase da manutenção, permitem verificar a eficácia dos tratamentos mecânicos e a estabilidade da doença, avaliando a ausência dos patógenos acima do limiar de deteção (Van Winkelhoff e Winkel, 2005; Wolf et al., 2005).

As limitações apontam para o uso quotidiano destes testes. Estes meios de diagnóstico bacteriológico têm certos limites relacionados à própria conceção de doenças periodontais como envolver infeções polimicrobianas mistas, presença de associações bacterianas, envolvimento de microrganismos oportunistas, evolução cíclica, e variação da flora dependendo do local. Dificuldades técnicas também podem surgir como o tamanho da amostra, o meio de transporte e a fiabilidade dos testes (Listgarten, 1992).

A escolha do biomarcador mais apropriado ainda pode ser difícil no estado atual do conhecimento. Há dificuldade em determinar os locais a serem amostrados e quando deverá ser feita a amostragem.

Assim, pode-se concluir que, embora vários testes mostrem benefícios potenciais (Tabela 3), fornecendo pistas sobre os componentes do tecido em risco, a maioria dos testes ou biomarcadores fornece pouca ou nenhuma informação adicional, com alto custo. Também está claro que nenhum marcador isolado foi capaz de atender a todos os critérios necessários para a avaliação do estado clínico do periodonto.

IV. CONCLUSÃO

A periodontite é considerada uma doença infecciosa multifatorial, em que as bactérias desempenham um papel essencial. Atualmente, a infecção periodontal aparece cada vez mais como fator de perturbação do equilíbrio homeostático, podendo causar manifestações patológicas distantes do foco original. A fisiopatologia destas doenças segue o mesmo fio comum: um estado inflamatório.

Entre os diversos testes descritos, a cultura bacteriana continua a ser o método de referência *Gold Standard*, graças à identificação precisa de bactérias, à possibilidade de avaliar a sensibilidade aos antibióticos e à possibilidade de antibiogramas. No entanto, o RT-PCR é considerado por muitos autores como o novo *Gold Standard* devido à facilidade de uso, alta sensibilidade e especificidade. A melhor abordagem parece ser o uso destas duas técnicas: a cultura para o diagnóstico e o estabelecimento de uma antibioterapia adaptada uma vez que permite antibiogramas, e o RT-PCR durante as fases de manutenção e reavaliação.

A identificação bacteriana confirma o diagnóstico de periodontite estabelecido por exames clínicos e radiográficos. O objetivo desta identificação também pode ser avaliar a carga bacteriana, a composição da placa subgingival em microrganismos patogénicos, estabelecer um antibiograma e verificar a erradicação desses microrganismos antes do tratamento corretivo complexo, regeneração, implantologia e ortodontia.

Esta revisão narrativa permite afirmar que o potencial dos testes biológicos não se encontra totalmente explorado no consultório e em laboratório, devido à existência de múltiplas limitações. Em teoria, são muitas as vantagens, no entanto, na prática, o uso destes testes no

consultório de Medicina Dentária ainda não é aplicável. O presente período de pandemia de Sars-Cov 2 demonstra claramente a importância do desenvolvimento desses testes.

Nas epidemias de saúde geral, como a epidemia de Sars-cov 2, face a um agente agressor desconhecido e na ausência de tratamento possível, a utilização destes testes é o meio principal de gerir a epidemia. De facto, uma das limitações na gestão de epidemias é a falta de testes eficazes e a sua produção em larga escala. Neste caso, a amostragem é feita na cavidade oronasal, sendo o risco de contaminação pelos médicos dentistas o mais elevado quando comparado com outras profissões.

Esta epidemia levanta ainda mais a questão do papel e da importância dos testes na prática diária da medicina. A questão de desenvolver estes testes e aperfeiçoar a sua utilização no futuro deve ser tratada. Vários esforços estão a ser realizados com o intuito de desenvolver um teste ideal, mas a sua utilização real como um diagnóstico ao lado da cadeira do médico dentista ainda é ilusória. Portanto, o desenvolvimento de um amplo espectro de marcadores é o objetivo principal da pesquisa periodontal como afirma Shantipriya et al. (2011).

V. Bibliografia

- Abdellaoui, L. et al. (2007). Evolution of diagnosis and treatment strategies for periodontal diseases. *Revue d'Odonto-Stomatologie*, 36, pp. 143-159.
- American Academy of Periodontologie. (2001). Glossary of periodontic terms. *Journal of Periodontology*, 3, pp. 57.
- ANAES (Agence nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé). (2002). Parodontopathies: diagnostic et traitement. *Service des recommandations et références professionnelles*.
- Anagnostou, F. et al. (2011). Maladies parodontales et état de santé général. *EMC Traité de médecine AKOS*, 6, pp. 1-6.
- Baehni, P. et al. (1996). Clusters of selected pathogens in a population with severe periodontitis, 75, pp. 241.
- Barsotti, O. et al. (2007). Tests biologiques en odontologie. *Dossier Association dentaire française Edit Canal*, pp. 6-60.
- Bolstad, A. I. et al. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(1), pp. 55-71.
- Bouchard, P. (2015). Parodontologie & Dentisterie Implantaire Volume 01. *Médecine parodontale*, pp. 417.
- Boughman, J. A., Astemborski, J. A., Suzuki, J. B. (1992). Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *Journal of Clinical Periodontology*, 19(4), pp. 233-239.
- Brenner, D.J et al. (2005). Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Byrne, S. et al. (2009). Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(6), pp. 469-477.
- Caton, J. G. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89(Suppl 1), pp. S1-S8.
- Champagne, C. M. (2003). Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 31, pp. 167-180.
- Charon, J. et al. (1999). Aspects novateurs en parodontie et pratique quotidienne, 1^o partie. *Inform dent*, 32(81), pp. 2293-2305.
- Charon, J. et al. (1999). Aspects novateurs en parodontie et pratique quotidienne 2^o partie. *Inform dent*, 33(81), pp. 2385-2394.
- Charon, J. Mouton, C. (2003). Parodontologie médicale. *CdP*, 186, pp. 193-195.
- Charon, A. (2009). Parodontie médicale innovations cliniques. *CdP*, 2, pp. 471.
- Chris, Georgina, Mark. (2009). L'Essentiel de la médecine générale pour le chirurgien dentiste. *Elsevier Masson*, pp. 304.
- Crowther, J. R. (2009). The elisa guidebook. *Humana Press*.
- De Carvalho, F. M. et al. (2009). Aggressive periodontitis is likely influenced by a few small effect genes. *Journal Clinical Periodontology*, 36(6), pp. 468-473.
- Deneshmann, H. e Wade, A. B. (1976). Correlation between gingival fluid measurements and macroscopic and microscopic characteristics of gingival tissue. *Journal of Periodontal Research*, 11, pp. 35.

Testes biológicos na detecção de doenças da cavidade oral: revisão narrativa

- Eick, S., Pfister, W. (2002). Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples, *Journal of Clinical Periodontology*, 29(7), pp. 638-644.
- Etienne, D. et al. (2003). Tests biologiques et décisions thérapeutiques. Mattout, P., Mattout, C. Les thérapeutiques parodontales et implantaires. *Quintessence Internat Paris*.
- Giannobile, Beikler, Kinney, et al. (2009). Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontology 2000*, 50, pp. 52-64.
- Guillot, E. e Mouton C. (1996). A PCR-DNA probe assay specific for *Bacteroides forsythus*. *Molecular Cell Probes*, 10, pp. 413-421.
- Guiraud, J. P. (1997). Génétique Microbienne. Bases théoriques et introduction aux applications pratiques, *Paris Lavoisier*.
- Haffajee, A. D. (1992). Subgingival Temperature (I) Relation to Baseline Clinical Parameters, *Journal Clinic of Periodontology*, 19(6), pp. 401-8.
- Hans, V. M. e Mehta, D. S. (2011). Genetic polymorphism of Fcγ-receptors IIa, IIIa and IIIb in South Indian patients with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Oral Science*, 53(4), pp. 467-474.
- Hemming, K. W., Griffiths, G. S., Bulman, J. S. (1997). Detection of neutral protease (Periocheck) and BANA hydrolase (Perioscan) compared with traditional clinical methods of diagnosis and monitoring of chronic inflammatory periodontal disease, *Journal Clinic of Periodontology*, 24, pp. 110-114.
- Jervoe-Storm, P. M. et al. (2005). Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), pp. 778-783.
- Kinane, D. F. e Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(6), pp. 430-449.
- Kornman, K. S. et al. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 24, pp. 72-77.
- Lands, W. E. (1991). Biosynthesis of prostaglandins. *Annual Review of Nutrition*. 11, pp. 41-60.
- Lang, N. P. et al. (2000). Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *Journal Periodontal Research*, 35(2), pp. 102-107.
- Lemaitre, P. et al. (1991). Interactions hôtes bactéries: la réponse des tests proposés. *Association Dentaire Francaise*, 5, pp. 28-35.
- Listgarten, M. A. (1992). Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 63, pp. 332-337.
- Loe, et al. (1965). Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology*, 36, pp. 117-187.
- Loomer, P. M. (2004). Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 34, pp. 49-56.
- McDevitt, M. J. et al. (2000). Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *Journal of Periodontology*, 71(2), pp. 156-163.
- Mealey, B. L. Oates, T. W. (2006). Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 77(8), pp. 1289-303.

Testes biológicos na detecção de doenças da cavidade oral: revisão narrativa

- Murakami, S. et al. (2018). Dental plaque-induced gingival condition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(Suppl 20), pp. S17-S27.
- Netuschil, et al. (1996). Vital fluorescence to assess in vitro and in vivo the antibacterial effects of amalgams. *Acta Stomatologica Belgica*, 93(3), pp. 129-134.
- Nibali, L. et al. (2010). Association between interleukin-6 -174 polymorphism and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 81(12), pp. 1814-1819.
- Okada, H. e Murakami, S. (1998). Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(3), pp. 248-266.
- Ouhara, K. et al. (2006). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. *Infection and Immunity*, 74(9), pp. 5211-5220.
- Parkhill, J. M. et al. (2000). Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(9), pp. 682-689.
- Pascal, D. (2015). Guide pratique des analyses médicales. *Editions Maloine*.
- Patil, S. et al. (2013). Oral microbial flora in health. *World Journal of Dentistry*, 4(4), pp. 262-266.
- Pellat, B. (1991). Marqueurs biologiques de la maladie parodontale. *Journal of Periodontology*, 52, pp. 33-41.
- Pihlstrom, B. L. Michalowicz, B. S., Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366(9499), pp. 1809-1820.
- Poulet, P. P. et al. (1996). Etude comparative entre trois techniques de prélèvement de fluide gingival. *Journal of Parodontology*, 15, pp.69-75.
- Rerhrhayel, M. et al. (2010). Bilan biologique en odontostomatologie : intérêt et interprétation. *Édition Diffusion Presse Sciences*, 250, pp.117-135.
- Riggio, M. P. et al. (1996). Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Periodontology Research*, 31(7), pp. 496-501.
- Rosenberg, et al. (1991). Halitosis measurement by an industrial sulphide monitor. *Journal of Periodontology*, 62(8), pp. 487-489.
- Sauvetre, E. (1994). Tests microbiologiques dans le diagnostic de la maladie parodontale. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 2, pp. 18-25.
- Shantipriya, R. et al. (2011). Biomarkers in Periodontal Diagnosis: “What The Future Holds...”. *International Journal of Clinical Dental Science*, 2(1), pp.76-82.
- Shao, M. (2009). Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(12), pp. 920-927.
- Shinya, M. et al. (2018). Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of Periodontology*, 89(Suppl 1), pp. S17-S27.
- Sigal, E. (1991). The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *American Journal of Physiology*, 260(2 Pt 1), pp. 13-28.
- Sixou, M. (2003). Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Diseases*, 9(suppl. 1), pp. 54-62.

Testes biológicos na detecção de doenças da cavidade oral: revisão narrativa

- Slots J. e Ting, M. (1977). Microbiological diagnostics in periodontics. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 18, pp. 861-876.
- Slots, J. et al. (1985). Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. *Journal of Periodontal Research*, 20, pp. 613-620.
- Socransky, S. S. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Clinical Periodontology*, 2, pp. 140.
- Socransky, S. S. e Haffajee, A. D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000*, 5(1), pp. 7-25.
- Sorsa, T. et al. (2010). Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chairside methods. *Oral Diseases*, 16, pp. 39-45.
- Suchett-kaye, G. et al. (2001). Clinical usefulness of microbiological diagnostic tools in the management of periodontal disease. *Research in Microbiology*, 152, pp. 631-639.
- Trindade, S. C. et al. (2013). *Porphyromonas gingivalis* HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 84(5), pp. 650-655.
- Tsuchida, K. Hara, K. (1981). Clinical significance of gingival fluid measurement by Periotron. *Journal of Periodontology*, 52, pp. 599.
- Van Winkelhoff (2003). Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *International Journal of Dental Hygiene*, 1, pp. 131-137.
- Van Winkelhoff, A. J. e Winkel, E. G. (2005). Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontology 2000*, 39(1), pp. 40-52.
- Wolf, H. F. et al. (2005). Parodontologie. *Masson*.
- Yano, K. et al. (1996). Evaluation of nonradioactive DNA Probe (Affirm DP) for detecting periodontopathic bacteria. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 63(3), pp. 482-488.
- Zambon, J. J. e Haraszthy (1995). The laboratory diagnosis of periodontal infection. *Periodontology 2000*, 7, pp. 69-82.
- Verner C. (2007). Utilisations des prélèvements bactériens lors de la prise en charge des maladies parodontales: *Nantes*.
- Verner, C. et al. (2006). Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiology Immunology*, 21, pp. 341-346.
- Yoshida, A. e Ansai, T. (2012). Microbiological diagnosis for periodontal diseases. *Periodontal Diseases-A Clinician's Guide*.

ANEXOS:

Figura 1. Os complexos bacterianos (Socransky, 1998)



Figura 2. Exemplos de culturas bacterianas.

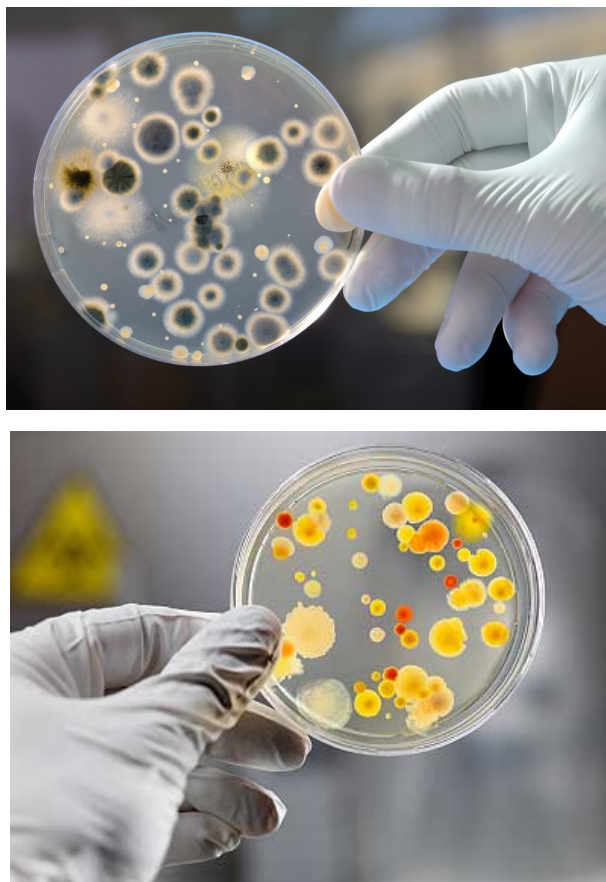


Figura 3.
colónias puras de *Porfiromonas*
gingivalis (Wolf, 2005).

Colónias puras
de *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans (Wolf, 2005).

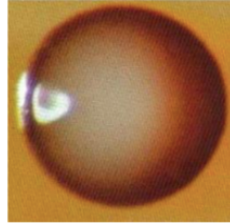


Figura 4. Exemplo de antibiograma.

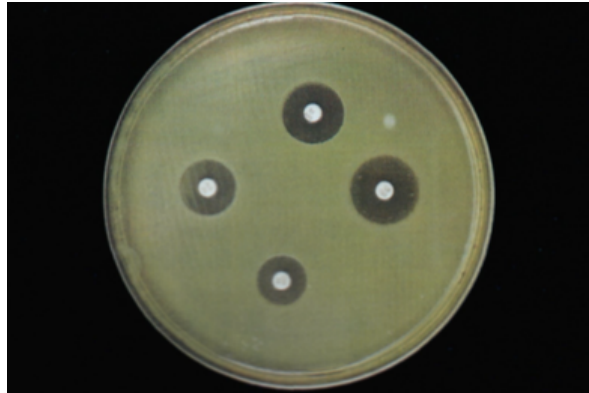


Tabela 1. Amostragem com cone de papel estéril de uma bolsa periodontal, para análise bacteriana (Bouchard, 2015).




Isolamento	ausência de contato com saliva e secagem do local da amostragem; isolamento com rolos de algodão; secagem com ar	
Amostragem	inserção dos cones de papel até a base da bolsa periodontal e sem fazer muita pressão recolhendo as bactérias anaeróbicas (do complexo vermelho).	
Transporte	transporte em menos de 15 segundos para não desnaturar as propriedades para a cultura bacteriana. Dois tipos de tubos: um tubo seco (verde) para análise por técnicas moleculares, um tubo contendo um meio que permita a conservação de bactérias para culturas (amarelo).	

Tabela 2. Etapas de identificação e diferenciação das estirpes bacterianas (Bouchard, 2015).

Identificação	Diferenciação
<p>- Dispersão da amostra: importante guardar a viabilidade bacteriana.</p> <p>- Diluição: permite realização de culturas primarias com densidade menos importantes de patógenos, facilitando a analise.</p> <p>- Cultura: inseminação de 100µl em meios com ágar não específicos (não seletivos) ou específicos (seletivos) a uma espécie em particular.</p> <p>- Incubação: em meios anaeróbicos, controlados com bandas de azul de metileno que coram de branco na presença de O₂.</p> <p>- Repicagem das bactérias: seleção de bactérias isoladas para fazer culturas puras (Figura 3, Figura 4)</p> <p>- Identificação própria: as bactérias formam CFU que permite as diferenciar pelo aspeto. `</p>	<p>- Por morfologia: forma, Surface, consistência, cor.</p> <p>- Transmissão da luz: visível macroscopicamente, com lupa binocular, sob luz UV ou com Microscópio de imersão para ver a mobilidade de certas espécies.</p> <p>- Coloração com corantes: de Gram ou blue de metileno por exemplo.</p> <p>- Reação aos testes enzimáticos: oxidase, catalase</p> <p>- Caractere antigênico: procurando Antígenos específicos à Anticorpos específicos conseguimos destacar alguns patógenos.</p>

Tabela 3. Resumo das características dos testes biológicos.

TESTES	Vantagens	Desvantagens	Limiar de detecção	Viabilidade	Tempo para resultados
Culturas	<ul style="list-style-type: none"> > Técnica de referência «Gold Standard» >Antibiograma > Técnica não direcionada 	<ul style="list-style-type: none"> >Custo >Complexidade do protocolo >Não padronizável. >Não aplicável às bactérias não cultiváveis 	Em meio não seletivo: 10^4 - 10^5 Em meio seletivo: 10^3	Não	1 a 5 semanas
Imunológicos	<ul style="list-style-type: none"> >Velocidade >Padronização possível >Amostras não vitais 	<ul style="list-style-type: none"> >Técnica direcionada >Hibridizações cruzadas Sem antibiograma 	10^3 - 10^4	Sim	Alguns minutos a algumas horas
Sondas	<ul style="list-style-type: none"> >Velocidade >Padronização >Barato >Detecção de bactérias não cultiváveis 	<ul style="list-style-type: none"> >Técnica direcionada >Hibridizações cruzadas >Sem antibiograma 	10^2 a 10^6 (dependendo do tipo de sonda)	Sim	1 a 30 horas
PCR	<ul style="list-style-type: none"> >Muito rápido e sensível, específico (proposto como novo "GS"). >Padronização possível. >Detecção barata de bactérias não cultiváveis. 	<ul style="list-style-type: none"> >Instrumentação dispendiosa. >Técnica direcionada >Sem antibiograma >Quantificação precisa (PCR RT) 	10	Sim	2 a 4 horas
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> >Rápido > Padronização possível. > Barata 	<ul style="list-style-type: none"> >A técnica visa um único grupo de espécies (sem as distinguir) >Sem antibiograma 	10^4	Não	Cerca de 15 minutos
Microscópico	<ul style="list-style-type: none"> >Detecção de tipos de bactérias e sua mobilidade. >Detecção do tipo de flora. >Barato. >Motivação do paciente 	<ul style="list-style-type: none"> > Nenhuma distinção entre diferentes espécies bacterianas 	-	-	Imediato