

TÉCNICAS ATUAIS PARA O DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS VIRAIS NA MUCOSA BUCAL

NEW APPROACHES TO THE DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASE IN THE ORAL SOFT TISSUE

* ELIETE NEVES DA SILVA
 ** ADRIANA MARIA M. SILVEIRA
 *** LILIAN NEUVALD
 **** MARIA ALVES G. S. SILVA
 ***** MARIADO CARMO M. GUMARDES
 ***** MARLY KIMIE SONOHARA

RESUMO

O diagnóstico das doenças virais da mucosa bucal, através de técnicas laboratoriais, permite uma adequada abordagem terapêutica. Entre as atuais técnicas, destaca-se o PCR, um método de amplificação *in vitro* da seqüência específica de DNA, capaz de identificar com alta especificidade, sensibilidade e rapidez, os vírus Herpes Simples 1 e 2, HIV, HPV, Citomegalovírus, Epstein-Barr e outros.

UNITERMOS

Doenças virais, métodos de diagnóstico, PCR.

INTRODUÇÃO

Os vírus foram primeiramente identificados como agentes infecciosos pelo botânico russo D. IWANOWAK, em 1892, quando verificou a transmissão de uma doença numa planta, através do seu fluido, mesmo após a sua filtração com filtros especiais que excluíam bactérias. MARTINUS BEIGJRIK, cientista holandês, em 1898, empregou a palavra "vírus" (etimologia grega), que significa veneno, para designar a propriedade dos fluidos daquelas plantas doentes em transferir doença às plantas saudáveis¹.

O aparecimento da nova ciência, a Virologia, ocorreu por volta de 1890 e, posteriormente, os vírus foram confirmados como agentes etiológicos de algumas doenças conhecidas da época, não só em vegetais como em animais. Esta ciência teve um grande impulso a partir de 1940, com o advento da microscopia eletrônica e com a manutenção de culturas de células vivas em laboratório, favorecendo a visualização, isolamento e identificação dos vírus².

O exame laboratorial de uma virose humana, além de confirmar uma dada infecção e uma suspeita clínica, possibilita também a identificação do tipo de agente causal, contribuindo, de diversas maneiras com o clínico, o paciente e a comunidade em geral.

DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS

O diagnóstico laboratorial de uma virose deve ser solicitado para^{2,7}:

- 1- confirmação de uma infecção, devido às suas sérias implicações clínicas. Exemplo: rubéola na gravidez, AIDS, hepatite.
- 2- diferenciação entre quadros clínicos: mononucleose in-

fecciosa - citomegalovirose - rubéola; hepatite A - hepatite B - hepatite C.

3 - intervenção quimioterápica. Exemplo: infecções herpéticas, papovavírus, AIDS.

4 - casos de surtos epidêmicos, onde a população e a saúde pública possam buscar as precauções profiláticas e ou vacinais necessárias. Exemplo: dengue, poliomielite e raiva.

5 - busca de um agente etiológico para uma dada doença, favorecendo a pesquisa. Exemplo: vírus EB e HIV.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS

O diagnóstico laboratorial das viroses surgiu a partir da necessidade imediata de reconhecer o agente viral causal, possibilitando um tratamento adequado e precoce. Os vírus, ao contrário das bactérias, só se replicam em células vivas, sendo utilizados para o seu isolamento cultura de células, animais de laboratórios e ovos embrionados. Os métodos mais utilizados são^{2,7,9}:

a) microscopia óptica permite a observação do efeito viral nas células.

b) microscopia eletrônica possibilita a detecção e visualização das partículas virais. Através da microscopia eletrônica, podem ser identificados os vírus do herpes simples tipo 1 e 2, varicela zoster, hepatite A e B, molusco contagioso, varicela, citomegalovírus e outros.

O exame realizado através de secreções colhidas com coloração negativa, é obtido de um a dois minutos, sendo mais demorada para as biópsias. Um resultado negativo nem sempre

* Mestranda em Diagnóstico Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru - SP

** Residente em Endodontia do Hospital de Reabilitação de Bauru - USP

*** Mestranda em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

**** Doutoranda em Diagnóstico Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

***** Mestranda em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

indica a ausência do vírus e, neste caso, devem ser realizados outros procedimentos.

c) sorologia por imunofluorescência com utilização de anticorpos marcados com fluoresceína (corante fluorescente), permitindo a detecção de anti-*genos* virais presentes no interior das células infectadas.

d) sorologia por neutralização - detecção de anticorpos neutralizantes do vírus. A reação consiste em se misturar diluições do soro do paciente com o vírus previamente titulados. Após 30 minutos a 37°C, as misturas são inoculadas em culturas de células ou em camundongos. Se houver anticorpos, estes neutralizarão os vírus, caso contrário, as células e os animais sofrerão agressões causadas pelos vírus e morrerão.

e) sorologia: ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e RIA (Radioimunoensaio)

As técnicas de radioimunoensaio (RIA) e imunoenzimáticas (ELISA), têm sido utilizadas para detecção do antígeno viral presente na amostra clínica, pesquisa de anticorpos do tipo IgG e IgM, e detecção antigênica do vírus presentes nas fezes e no sangue (hepatite A, B, não A não B).

O marcador utilizado no exame ELISA é uma enzima (fosfatase alcalina, beta-galactosidase, peroxidase ou urease), cuja leitura se baseia na coloração obtida após a adição do substrato adequado à enzima.

RIA detecta o antígeno viral ou o anticorpo comumente em fezes, líquor, ou aspirado de nasofaríngeo, utilizando como marcador o radioisótopo I¹²⁵.

f) detecção de proteínas virais: eletroforese

g) imunohistoquímica

h) técnicas de biologia molecular:

Técnica de Western-blot - permite a detecção de antígenos virais ou anti-corpos produzidos contra estes. A técnica inclui o fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. As bandas separadas são transferidas a filtros de celulose ou náilon, e estes são incubados com anticorpos para um determinante antigênico específico do vírus. A visualização é obtida quando se adiciona um anti-anticorpo marcado com peroxidase.

Técnicas de hibridação - apresentam alta especificidade e sensibilidade, empregando a propriedade dos ácidos nucleicos de parear suas fitas complementares por afinidade nas bases nitrogenadas. A ocorrência da hibridação se dá pela separação das cadeias de fitas duplas do ácido nucleico da amostra e das cadeias de um ácido nucleico padronizado, denominado sonda.

A sonda é um fragmento de ácido nucleico com seqüência de genes específicos do vírus em estudo, representando o genoma viral parcial ou completo. A desnaturação das duplas fitas é obtida pelo calor ou pelo tratamento com álcalis. A reassociação destas cadeias formam um híbrido pela ligação de uma das cadeias a um sistema de detecção. O marcador geralmente utilizado na sonda é um isótopo radioativo ou uma enzima.

As técnicas de hibridação permitem detectar vírus latentes, viroses crônicas, vírus associados a complexos imunes e vírus isolados *in vitro*.

As sondas de vírus de DNA são preparadas a partir do próprio genoma viral. Os vírus RNA necessitam da construção de uma cópia de DNA complementar ao RNA (cDNA), empregando-se a enzima transcriptase reversa.

TIPOS DE TÉCNICAS DE HIBRIDAÇÃO

Hibridação *in situ* - o material a ser testado pode ser de esfregaço ou de biópsia. Estas técnicas permitem examinar a citopatologia e a presença de ácido nucleico teste em um mesmo corte, por não lesar as células analisadas. É uma técnica rápida e de baixo custo, embora, dentre as demais técnicas de hibridação, seja a de menor sensibilidade e especificidade. Esta técnica é utilizada como diagnóstico de rotina para papilomavirus humano.

Southern-Blot - o DNA a ser analisado é clivado por enzimas de restrição e os fragmentos resultantes são preparados por eletroforese em gel de agarose, de acordo com seu peso molecular. O gel é tratado com álcalis, para que o material seja desnaturado, e o DNA é transferido para um filtro de náilon ou de nitrocelulose. A sonda é aplicada à preparação e hibridada sob diferentes graus de temperatura de fusão. Após dois a quatro dias de hibridação a membrana é lavada, seca e exposta a auto radiografia por vários dias. Esta técnica é de grande sensibilidade e especificidade e permite verificar se o DNA viral está ou não integrado ao genoma celular, permitindo a detecção de antígenos virais ou anticorpos produzidos contra estes. A técnica inclui o fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. As bandas separadas são transferidas aos filtros de celulose ou náilon e estes filtros são inoculados com anticorpos para um determinante antigênico específico do vírus.

Dot-Blot - nesta técnica o DNA total é extraído da preparação, desnaturado e colocado diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose.

Northern-Blot - utilizada para verificar se um gene está sendo expresso, isto é, se o gene está sendo transcrito em RNA. A desnaturação do RNA mensageiro ocorre antes ou durante a eletroforese.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

A biologia molecular tem contribuído com importantes mudanças nas pesquisas médicas, resultando em níveis de entendimento de doenças genéticas, infecciosas e neoplásicas, inconcebíveis até poucos anos atrás. Um dos aspectos deste desenvolvimento compreende a capacidade dos cientistas em diagnosticar doenças a nível molecular. Muitas lesões dos tecidos moles resultam de infecções virais, algumas delas com implicações clínicas severas, como as infecções causadas pelo papilomavírus humano e o Epstein Barr. O diagnóstico de infecções virais, incluindo aquelas que afetam a região bucofacial, tem sido beneficiado significativamente com a detecção de DNA viral^{10,11}.

O sucesso da terapia antiviral requer um diagnóstico e intervenção precoce para melhor efeito, e, portanto há necessidade de detecção rápida, sensível e tecnicamente simples das infecções virais^{10,12}.

O PCR consiste de um método *in vitro* envolvendo a amplificação enzimática de seqüências de DNA específicas. As bases teóricas da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram primeiramente descritas por KLEEPE e colaboradores, em 1971^{13,14}, e o desenvolvimento foi concretizado na década de 80 por KARY MULLIS⁶. A primeira aplicação do PCR foi realizada pelo Departamento de Genética, em Cetus, objetivando a am-

plificação da beta-globina humana e diagnóstico pré-natal de anemia falciforme¹³.

No emprego inicial do PCR, o fragmento Klenow da polimerase I do DNA da *Escherichia coli* foi utilizado como enzima de restrição. Como o processo de amplificação requer ciclagem térmica em alta temperatura, observava-se a inativação desta enzima devido sua característica termolábil. Conseqüentemente, nova enzima necessitava ser adicionada a cada ciclo, dificultando o procedimento.

SAIKI e colaboradores em 1985 introduziram a DNA polimerase termoestável isolada da bactéria *Thermus aquaticus* (encontrado em lavas vulcânicas) transformando o PCR em uma reação eficaz. O uso da polimerase *Taq* não apenas simplificou o procedimento PCR, mas significativamente aumentou a especificidade e toda a produção da reação. O aumento na especificidade do PCR *Taq* resulta em uma produção melhorada do fragmento alvo amplificado, por reduzir a competição de produtos não alvos^{1,11}.

Uma importante propriedade do PCR é a sua capacidade de amplificar uma seqüência alvo de preparações de DNA puro, bem como modelos de DNA degradados. A amplificação das seqüências específicas das amostras de DNA puro tem implicações importantes em pesquisas diagnósticas. O PCR representa uma forma de clonagem *in vitro* podendo gerar e modificar fragmentos de DNA de extensão e seqüências definidas em uma única reação automatizada¹.

Em termos básicos, o PCR envolve a combinação de uma amostra de DNA com primers oligonucleotídeos, dinucleotídeos trifosfatos (ATP, TTP, CTP e GTP), cloreto de magnésio (MgCl₂), e *Taq* DNA polimerase termoestável em uma solução tampão adequada. Esta mistura submetida a repetidas ciclagens térmicas, através de um termociclador (figuras 1, 2, 3), promove, seqüencialmente, a ruptura do DNA, atuação da polimerase e dos primers (figura 3), amplificação dos sítios específicos e posterior extensão dos mesmos^{1,13,14}.

Etapas do processo^{1,13,14}

1ª) Elevação da temperatura a 94°C, num intervalo de 30 segundos a 1 minuto. Separação da dupla hélice do DNA, atuação da polimerase e dos primers.

2ª) Redução da temperatura a 55-60°C (temperamento). Período em que ocorre os vários ciclos para a amplificação.

3ª) Elevação da temperatura a 70-72°C para extensão das seqüências amplificadas.

A seleção de primers específicos e eficientes permanecem um tanto empírica. Não há um conjunto de regras assegurando a síntese de um par de primer efetivo¹⁴.

A extrema sensibilidade do PCR como um instrumento para

diagnóstico pode ser afetada por possíveis contaminações durante a reação. Para minimizá-las e evitar resultados falso-positivos, alguns cuidados devem ser tomados¹¹:

- isolamento físico das preparações e produtos do PCR;
- seleção adequada dos instrumentos
- esterilização adequada dos reagentes e instrumentos;
- utilização de reagentes em quantidades ideais;
- uso rotineiro de luvas;
- centrifugação;
- uso de pipetas;
- pré-misturas de reagentes;
- adição de amostra tardiamente, possivelmente, para minimizar manipulação;
- uso contínuo de controles positivo e negativo;

APLICAÇÕES DO PCR NO DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS VIRAIS DA MUCOSA BUCAL:

O PCR tem sido aplicado no diagnóstico de uma variedade de doenças com manifestações bucais, incluindo as causadas pelos vírus herpes simples tipos 1 e 2, HIV, HPV, citomegalovírus e Epstein-Barr. A detecção, em um nível molecular da presença do HIV em células epiteliais, observação precoce do Epstein-Barr Vírus e Herpes Vírus Humano na saliva de pacientes portadores de doença linfoproliferativa permite adequado monitoramento da terapêutica^{3,4,5,8,9,10,12,15}.

CONCLUSÕES

As técnicas atuais de diagnóstico utilizadas para os diferentes tipos de agentes infecciosos incluem os avanços da biotecnologia. Entre estes avanços, o PCR destaca-se por sua ampla aplicação em distintas áreas como: biologia molecular, mapeamento físico dos cromossomas, análise forense, detecção de doenças virais, bacterianas e fúngicas. Reflexos desta metodologia propiciam maiores especificidade e sensibilidade diagnóstica das doenças da mucosa bucal, permitindo uma terapêutica preventiva e adequada.

SUMMARY

The diagnosis of viral disease of the oral soft tissue, from the laboratory approaches, allows an appropriate therapy. Among these new approaches, is distinguished the PCR, one process of amplification *in vitro* of the DNA specific sequence, able to recognize with high specificity, sensitivity and quickness, herpes simplex virus I (HSV1) and II (HSV2), HIV, HPV, cytomegalovirus, Epstein-barr and others.



IDEAL PRÓTESE LTDA.

16 ANOS DE QUALIDADE

CARACTERIZAÇÃO NATURAL EM DENTES DE PORCELANA, REZINA E INLAY ONLAY, O DENTE NATURAL DE VOLTA AO PACIENTE

Gilmar Roberto da Silva - TPD 058 19 anos de experiência

Rua 94 nº 263 St. Sul - Fones: 224-0751 / 224-4075 Fax: 224-4627

Fresagem e
Attachement.
Prótese em
Geral
Prótese sobre
implantes

UNITERMS

Viral diseases - New approaches to the diagnosis - PCR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ERLICH, H. A. *PCR Technology principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York, 1989.
- 2- FALKE, D. *Virologia*. São Paulo, Ed. Pedagógica Universitária, 1979.
- 3- HARDY, D.A. et al. Use of poly-merase chain reaction for successful identification of asymptomatic genital infection with herpes simplex-virus in pregnant women at delivery. *J.Infect.Diseases*, v.162, n.5, p.1031-5, Nov. 1990.
- 4- KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, v.339, n.18, p.237-8, May 1989.
- 5- MABRUK, M.J.W.M.F. et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in tongue tissues from AIDS autopsies without clinical evidence of oral hairy leukoplakia. *J.oral Pathol.Med.*, 24, n.3, p.109-12, 1995.
- 6- MULLIS, K. B; FALLONA, E. *Meth. Enzimol.* v.155, p.335, 1987. apud ERLICH, p.1.
- 7- OLIVEIRA, L. H. S. *Virologia humana*. Rio de Janeiro, Ed. Cultura Médica, 1994.
- 8- PADAYACHEE, A.; SANDERS, C.M.; MAITLAND, N.J. A polymerase chain reaction (PCR) investigation of oral verrucae which contain HPV types 2 and 57 by in situ hybridization. *J. Oral Pathol. Med.*, v.24, n.7, p.329-34, Aug. 1995.
- 9- QURESHI, M.N. et al. Infection of oral mucosal cells by human immunodeficiency. Virus type 1 in seropositive persons. *J.Infect.Diseases*, v. 171, n.1, p.190-3, Jan. 1995.
- 10- ROBINSON, P.A.; HIGH, A.S.; HUME, W.J. Rapid detection of human herpes simplex virus type 1 in saliva. *Arch.oral Biol.*, v.37, n.10, p.797-806, 1992.
- 11- RODU, B. New approaches to the diagnoses of oral soft-tissue disease of viral origin. *Adv. dent. Res.*, v.7, n.2, p. 207-12, Aug. 1993.
- 12- ROGERS, B.B.; JOSEPHSON, S.L.; MAK, S.K. Detection of herpes simplex virus using the polymerase chain reaction followed by endonu-clease cleavage. *Amer.J.Pathol.* v.139, n.1., p.1-6, July 1991.
- 13- SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v.230, p.1350-4, 1985.
- 14- SAIKI, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v.239, n.29, p.487-91, Jan. 1988.
- 15 - SAITO, E. et al. Detection of Epstein-Barr virus and human herpes virus type 6 in saliva from patients with lymphoproliferative diseases by the polymerase chain reaction. *Archs oral Biol.*, v.36, n.11, p.779-84, 1991.



Figura 1 - Termociclador utilizado para a realização do PCR

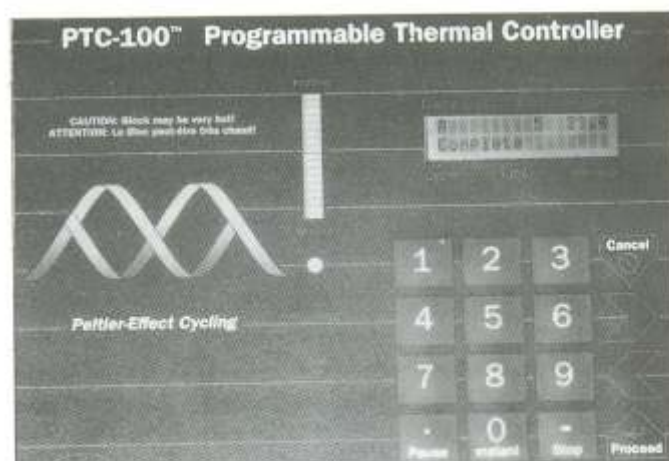


Figura 2 - Painel de controle do termociclador para ajuste da temperatura, tempo e quantidade de ciclos necessários para o exame

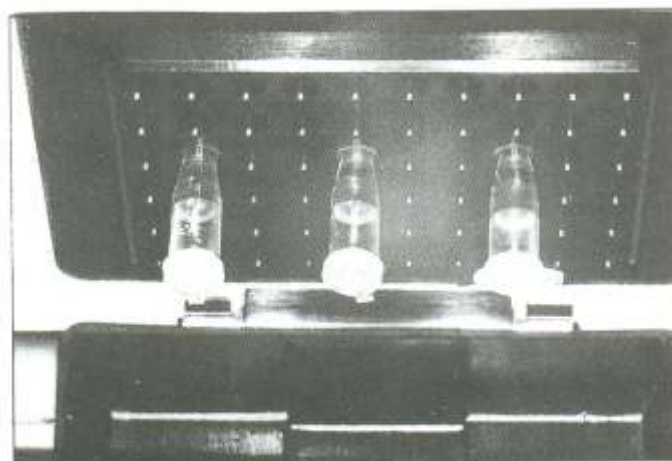


Figura 3 - Tubos para a realização das misturas a serem submetidas a repetidas ciclagens térmicas

ORTODONTIA
Charles Moraes
ORTOPEDIA
Mestrado Bauru
USP / CRO-GO ESP 265
FUNCCIONAL
Centro Comercial Sebba
Rua 94 esq. c/ 84 sala 206 - S. Sul
Fone: (062) 229-3105

IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS BRANEMARK

Elaine G. de Andrade Rosa
CRO-GO 1618/ ESP - 147
ESPECIALIZAÇÃO EM PERIODONTIA
Cirurgia em implantes osseointegrados

Fernanda Maria de Castro
CRO-GO 1635/ ESP - 146
• ESPECIALIZADA EM PRÓTESE DENTAL
E DENTÍSTICA RESTAURADORA
• PRÓTESE SOBRE IMPLANTES

TEMOS EQUIPE ESPECIALIZADA EM ACESSORIA NO PLANEJAMENTO CIRÚRGICO E PROTÉTICO
Rua 3 n° 560 - Setor Oeste - Goiânia - Go - Fone: (062) 224-7898 - Fax: (062) 229-4254