

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES ESPECTRAIS
RELACIONADOS AO DIAGNÓSTICO DE ASMA

Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos

MESTRADO ACADÊMICO

2018

TATIANE MARTINS DE LIMA CROSARA BASTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES ESPECTRAIS
RELACIONADOS AO DIAGNÓSTICO DE ASMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha

UBERLÂNDIA - MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B327c Bastos, Tatiane Martins de Lima Crosara, 1976
2018 Caracterização de biomarcadores espectrais relacionados ao diagnóstico de asma [recurso eletrônico] / Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos. - 2018.

Orientador: Thúlio Marquez Cunha.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.869>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Asma. 3. Saliva. 4. Diagnóstico. I. Cunha, Thúlio Marquez, 1979, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos

Caracterização de Biomarcadores Espectrais Relacionados ao Diagnóstico de Asma

Presidente da banca (orientador): Prof. Dr. Thúlio Marques Cunha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. José Roberto de Brito Jardim

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Titular: Prof. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Suplente: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Obs: Esta dissertação de mestrado intitulava-se : *Desenvolvimento e caracterização de biomarcadores relacionados ao diagnóstico e tratamento das doenças pulmonares* e foi alterado após defesa, por sugestão da banca examinadora para: *Caracterização de biomarcadores espectrais relacionados ao diagnóstico de asma*.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PGCS

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico N° 039/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde Linha de Pesquisa 3: Fisiopatologia das doenças e dos agravos à saúde. Projeto de Pesquisa de vinculação: Aspectos funcionais e relacionados à fisiologia clínica do exercício e suas relações nas doenças pulmonares.

Discente: **Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos** – Matrícula n° **11612CSD050**

Título do Trabalho: "**Desenvolvimento e Caracterização de Biomarcadores Relacionados ao Diagnóstico e Tratamento das Doenças Pulmonares.**" Às 10:30 horas do dia 30 de outubro do ano de 2018, no anfiteatro do bloco 2H – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: José Roberto de Brito Jardim (UNIFESP), Yara Cristina de Paiva Maia (UFU), e Thúlio Marquez Cunha (UFU)- orientador da discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa o Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha (UFU) apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a argüir a candidata. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata (X) aprovada () reprovada. Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 14:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha Thúlio Marquez Cunha

Prof. Dr. José Roberto de Brito Jardim José Roberto de Brito Jardim

Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia Yara Cristina de Paiva Maia

DEDICATÓRIA

*`A meu marido e filhos, pelo amor,
que sempre foi o suporte para meu
crescimento pessoal e profissional.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha, pela orientação, pelo apoio e pela motivação em todos os momentos, meus sinceros agradecimentos. Agradeço também ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e ao Prof. Dr. Robinson Sabino pelos ensinamentos e também aos demais colaboradores do Laboratório de Nanobiotecnologia e do Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPBio), em especial `a Léia Cardoso e Douglas Caixeta que compartilharam seus conhecimentos de forma tão generosa.

Aos meus colegas de pós-graduação Michele, Flaviana e Vinícius pelo companheirismo e disponibilidade em cooperar sempre, meu muito obrigada. Agradeço muito aos amigos que participaram doando seu tempo de forma a tornar possível este projeto. Meus sinceros agradecimentos também aos pacientes que aceitaram fazer parte deste projeto.

E por último, mas muito importante, meus agradecimentos a minha família, que sempre foi suporte para meu crescimento profissional. Meu muito obrigada em especial, `a minha mãe Tânia, Hilde e meu marido, Sérgio. Agradeço também aos meus filhos, Eduarda, Sérgio, Lucas e Rafael, pela compreensão e por serem obedientes e facilitadores deste processo.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

“Não que por nós mesmos sejamos capazes de alguma coisa, como se partisse de nós; pelo contrário, a nossa suficiência vem de Deus”(1Co 3:5)

RESUMO

Introdução: A asma é um problema comum e com importante prejuízo para a saúde em todo o mundo. O diagnóstico de asma depende, na verdade, de uma combinação de fatores clínicos, responsividade ao broncodilatador na função pulmonar e inflamação das vias aéreas. Conseqüentemente, a busca por uma plataforma não invasiva, livre de reagentes e específica para o diagnóstico de asma é necessária na prática clínica. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) fornece uma análise sensível de amostras biológicas complexas e demonstrou ser uma ferramenta robusta para a detecção precisa de doenças. **Objetivo:** Este estudo explora se FTIR pode produzir perfis espectrais distintos na saliva de pacientes asmáticos em comparação com indivíduos saudáveis. **Material e métodos:** Dez pacientes com asma e dez saudáveis foram selecionados para coletar saliva. O perfil salivar foi analisado por espectroscopia ATR-FTIR e os modos vibracionais foram avaliados quanto à capacidade diagnóstica pela curva ROC. **Resultados:** A intensidade de oito modos vibracionais (dois dos espectro original e seis do espectro de segunda derivada) mostrou diferenças significativas entre pacientes com asma e indivíduos saudáveis. Nas bandas 2344 cm^{-1} e 1341 cm^{-1} do espectro original, a áreas de absorbância foram aumentadas ($p < 0,05$) nos pacientes com asma, comparados aos controles pareados. A análise ROC para estes modos vibracionais mostrou: 2344 cm^{-1} : AUC 0,80, sensibilidade 70%, especificidade 90%; 1341 cm^{-1} : AUC 0,77 sensibilidade 70%, especificidade 80%. No espectro da segunda derivada, a intensidade do pico de seis modos vibracionais da saliva (1629, 1156, 1119, 1076, 745 e 619 cm^{-1}) estavam reduzidos ($p < 0,05$) na asma em comparação ao grupo controle e a análise ROC para eles mostrou: 1629 cm^{-1} : AUC 0,83, sensibilidade 80%, especificidade 70%; 1156 e 1119 cm^{-1} : AUC 0,80, sensibilidade de 70%, especificidade 80%; 1076 cm^{-1} : AUC 0,85, sensibilidade 70%, especificidade 90%; 745 cm^{-1} : AUC 0,88, sensibilidade

70%, especificidade 90% e 619 cm^{-1} : AUC 0,87, sensibilidade 70%, especificidade 100%. **Conclusão:** De modo geral, a espectroscopia ATR-FTIR por reflexão total atenuada pode fornecer uma ferramenta útil para complementar a análise na rotina clínica do diagnóstico de asma.

Palavras- chave: Asma, saliva, ATR-FTIR, biomarcadores e diagnóstico.

ABSTRACT

Introduction: Asthma is a common and a major health burden worldwide. Asthma diagnosis actually relies on a combination of clinical factors, bronchodilator responsiveness in lung function, and airway inflammation. Consequently, the search for a non-invasive, reagent-free, and specific platform to asthma diagnosis is needed for clinical practice. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy provides for sensitive analysis of complex biological samples and demonstrated to be a robust tool for accurate detection of disease.

Objective: This study explores whether FTIR can produce distinct spectral profiles in saliva of asthmatic patients comparing to healthy subjects.

Material and methods: Ten asthma patients and ten healthy subjects were selected to collect saliva. The salivary profile was analyzed by ATR-FTIR spectroscopy and the vibrational modes were evaluated for diagnostic ability by ROC curve. **Results:** The intensity of eight vibrational modes (two of original spectra and six of second derivative spectra) showed significant changes between asthma patients and health subjects. In original spectra bands 2344 cm^{-1} and 1341 cm^{-1} , area absorbance were increased ($p < 0.05$) in asthma patients compared to matched-controls. ROC analysis for these vibrational modes showed: 2344 cm^{-1} : AUC 0.80, sensitivity 70%, specificity 90%; 1341 cm^{-1} : AUC 0.77 sensitivity 70%, specificity 80%. At second derivative spectra, intensity of peak in six vibrational modes of saliva (1629 , 1156 , 1119 , 1076 , 745 and 619 cm^{-1}) were reduced ($p < 0.05$) in asthma compared to control group and ROC analysis for them showed: 1629 cm^{-1} : AUC 0.83, sensitivity 80%, specificity 70%; 1156 and 1119 cm^{-1} : AUC 0.80, sensitivity of 70%, specificity 80%; 1076 cm^{-1} : AUC 0.85, sensitivity 70%, specificity 90%; 745 cm^{-1} : AUC 0.88, sensitivity 70%, specificity 90% and 619 cm^{-1} : AUC 0.87, sensitivity 70%, specificity 100%. **Conclusion:** Altogether, attenuated total reflection ATR-FTIR

spectroscopy may provide a useful tool to complement analysis in the clinical routine for the diagnosis of asthma.

Keywords: Asthma, saliva, ATR-FTIR, biomarkers and diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espectro Eletromagnético	23
Figura 2- Interferômetro de Michelson	24
Figura 3- Métodos de Amostragem na Espectroscopia FTIR	26

ARTIGO

Figure 1- Average ATR-FTIR spectra for asthma patients and control subjects group.	49
Figure 2- Area under peak of ATR-FTIR wavenumber bands and ROC curve	50
Figure 3- Peak intensity of vibrational modes at second derivative spectra ATR-FTIR	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Parâmetros confirmatórios da variabilidade da limitação ao fluxo de ar expiratório em adultos 19

ARTIGO

Table 1. Clinical, demographic characteristics and spirometric data of patients with asthma and healthy subjects. 47

Table 2. ATR-FTIR vibrational mode assignments and identification of the respective component of stimulated saliva. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Português

BD	Broncodilatador
CVF	Capacidade Vital Forçada
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
FENO	Fração Expirada de Óxido Nítrico
HC-UFU	Clinical Hospital of Federal University of Uberlandia
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Immunoglobulin E
IL-5	Interleucina 5
IV	Infra-vermelho
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFE	Pico de fluxo expiratório
VEF₁	Volume Expiratório Forçado do Primeiro Segundo

Inglês

ATR	Attenuated total reflection
ATS	American Thoracic Society
AUC	Area under curve
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
FIR	Far infrared
FTIR	Fourier - transform infrared
GINA	Global Initiative for Asthma
ICS	Inhaled corticosteroids
IQR	Interquartile range
IR	Infrared
IRE	Internal reflection element

LABA	Long-acting β 2 agonist
MIR	Medium infrared
NIR	Near infrared
ROC	Receiver Operating Characteristic
SABA	Short-acting β 2 agonist
ΔFEV1	Variation in FEV1
WHO	World Health Organization
ΔVEF1	Variation in Forced Expiratory Volume in first second
v	Stretching vibrations
v(PO2-)	Phosphate stretching vibrations

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 DIAGNÓSTICO DE ASMA	18
2.2 ESPECTROSCOPIA FTIR	22
2.3 UTILIZAÇÃO DA SALIVA PARA DIAGNÓSTICO	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. ARTIGO	31
4.1 Abstract	32
4.2 Introduction	33
4.3 Patients and methods	35
4.3.1 Participants.....	35
4.3.2 Collection of Saliva.....	36
4.3.3 Spectra ATR-FTIR acquisition and data processing.....	36
4.3.4 Statistical analysis.....	37
4.4 Results	37
4.4.1 Patients characteristics.....	37
4.4.2 ATR-FTIR Spectroscopy	38
4.5 Discussion	39
4.6 Conclusion	41
4.7 Conflicts of interest statement	41
4.8 Acknowledgements	41
4.9 Abbreviations	42
References	43
REFERÊNCIAS	52
ANEXO 1	60
ANEXO 2	65
ANEXO 3	69
ANEXO 4	71

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas, comum em todas as idades, que afeta de 5 a 10% da população de países desenvolvidos (WENZEL, 2012). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), 235 milhões de pessoas sofrem de asma no mundo, sendo que a doença é ainda sub-diagnosticada e sub-tratada (WHO, 2018).

A asma é um problema de saúde pública global, independentemente do nível de desenvolvimento dos países, entretanto, mais de 80% das mortes ocorrem em países de baixa e média-baixa renda (WHO, 2018). Muitas destas mortes são evitáveis e decorrem da precariedade dos serviços de saúde em diagnosticar, monitorar o tratamento e prevenir exacerbações (BOUSQUET et al., 2005).

O diagnóstico de asma pode ser confirmado quando o paciente apresenta sintomas respiratórios episódicos, como: tosse, sibilos, falta de ar (dispneia) e aperto no peito, e também uma excessiva variabilidade na função pulmonar, com limitação ao fluxo expiratório de ar documentada, pelo menos em uma ocasião (GINA, 2018). A espirometria é o método mais indicado para medir a limitação ao fluxo expiratório de ar e a reversibilidade da obstrução após uso de broncodilatador (MILLER, 2005). Outros testes como os de bronco-provocação com exercícios ou fármacos podem ser necessários, associados à espirometria, para confirmar o diagnóstico em alguns casos.

A asma é uma doença heterogênea, apresentando vários grupos de pacientes com características demográficas, clínicas e fisiopatológicas distintas, conhecidos como fenótipos da asma (GINA, 2018). Alguns fenótipos, como a asma alérgica, que tem início na infância e associação com história pregressa ou familiar de alergia, são mais facilmente reconhecíveis, mas em outros casos, aonde o início da doença é tardio ou há limitação fixa ao fluxo de ar, o

diagnóstico diferencial com outras doenças pulmonares crônicas é necessário. Na prática clínica pode ser difícil distinguir a asma da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), principalmente em pacientes mais velhos, fumantes e ex-fumantes, e estas duas condições podem também coexistir no mesmo paciente (GINA, 2017).

Para auxiliar o diagnóstico de asma e caracterizar de forma molecular seus fenótipos, várias pesquisas tem sido realizadas no intuito de se identificar os biomarcadores da doença (WENZEL, 2012). Os biomarcadores são qualquer substância quantificável em tecido ou fluidos de pacientes que refletem os mecanismos biológicos subjacentes da doença investigada. A busca de biomarcadores pode ser determinada por duas estratégias principais: avaliar moléculas de uma via metabólica conhecida, que fisiopatologicamente se relacione com a doença, ou utilizar métodos biológicos sistêmicos gerais como proteômica, transcriptômica e metabolômica (LEY; BROWN; COLLARD, 2014).

A Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR-FTIR) é um método que analisa o metabolismo biológico (metabolômica). A radiação no espectro do infravermelho ativa a vibração das ligações moleculares presentes na amostra, e estes modos vibracionais são mensuráveis pela ATR-FTIR, permitindo estudar a composição molecular da amostra (BAKER et al., 2014). A técnica também informa sobre alterações bioquímicas patológicas resultantes de doenças. Do ponto de vista diagnóstico, as impressões digitais por espectroscopia FTIR constituem-se biomarcadores espectrais e podem ser usadas para discriminar entre diferentes tipos de células, tecidos e fluidos corporais, bem como para detectar doenças (BEEKES; LASCH; NAUMANN, 2007).

Na campo do diagnóstico de doenças, ATR-FTIR tem sido principalmente explorada na oncologia (FUJIOKA et al., 2004)(GAJJAR et al., 2013)(LEWIS

et al., 2010), mas várias outras áreas já utilizaram a técnica como ferramenta potencial (SCAGLIA et al., 2011)(STAIB et al., 2001).

A saliva é um fluido corporal de fácil obtenção, que sofre interferências em sua composição em consequência de processos patológicos no organismo (RATHNAYAKE et al., 2013), o que a torna apropriada para ATR-FTIR com objetivo de diagnosticar doenças.

Desta forma, realizamos este estudo para testar a hipótese de que os modos vibracionais expressos na saliva de pacientes asmáticos são diferenciais e servem como biomarcadores da doença. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar quais os modos vibratórios são adequados para diagnóstico da asma. Para isso, o perfil salivar de pacientes com asma e participantes do grupo controle não-asmáticos foram avaliados quantitativamente, assim como a capacidade de diagnóstico destes modos vibracionais adquiridos pela técnica de ATR-FTIR da saliva.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DIAGNÓSTICO DE ASMA

A asma é uma doença pulmonar crônica caracterizada por sintomas respiratórios como tosse, sibilos, dispneia e desconforto torácico, que variam muito no tempo e em intensidade, somado à limitação ao fluxo expiratório de ar variável, usualmente devido a inflamação das vias aéreas (GINA, 2018).

Os sintomas respiratórios na asma seguem um padrão característico de acentuada variabilidade no tempo, sendo comum piora noturna e ao amanhecer, resolução espontânea ou com uso de medicação, e ainda, ausência desses sintomas por semanas ou meses. Um padrão de agudização destes sintomas, conhecido como exacerbação, pode surgir por mau controle basal da doença ou por infecções virais, exercícios físicos, exposição a alérgenos, mudanças no tempo ou exposição a irritantes, como fumaça e fortes odores. (GINA, 2018).

Da mesma forma, a limitação ao fluxo expiratório de ar também apresenta grande variabilidade temporal e em intensidade. A relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) e a capacidade vital forçada (CVF), obtidos na espirometria, é um bom parâmetro para indicar esta limitação. Depois de confirmada a obstrução ao fluxo de ar, a variação desta limitação pode ser clinicamente avaliada pela medida do VEF_1 ou pico de fluxo expiratório (PFE) (GINA, 2018).

O diagnóstico da asma é clínico e não há, até o momento, um teste padrão ouro. Por isso, a presença da variabilidade da limitação ao fluxo expiratório de ar deve ser documentada, sempre que possível (GINA, 2018). Um mesmo paciente pode variar de completamente normal a intensamente obstruído, principalmente por influência do tratamento (REDDEL et al., 1999).

Se a reversibilidade ao broncodilatador não for confirmada na apresentação inicial da doença, o próximo passo depende da disponibilidade de outros testes, da urgência e da necessidade de tratamento. Numa situação de

urgência clínica, o tratamento da asma deve ser iniciado e o diagnóstico confirmado o mais cedo possível (GOLD, 2018).

No Quadro 1 encontram-se os valores dos testes de reversibilidade que auxiliam na diferenciação entre asma e a variação esperada na população saudável.

Quadro 1- Parâmetros confirmatórios da variabilidade da limitação ao fluxo expiratório de ar em adultos

Documentar a excessiva variabilidade na função pulmonar (um ou mais testes abaixo) E documentar limitação ao fluxo de ar	Pelo menos uma vez no processo de diagnóstico quando VEF ₁ está baixo, confirmar relação VEF ₁ /CVF reduzida (normalmente > 0.75-0.80 em adultos)
Teste de reversibilidade a broncodilatador (BD) positivo	aumento do VEF ₁ > 12% e > 200 ml da linha de base, 10 a 15 minutos após 400 µg de salbutamol ou equivalente (maior confiança se o aumento for > 15% e > 400 ml)
Variabilidade excessiva no PFE duas vezes ao dia durante duas semanas	variabilidade média diária do PFE diurno > 10%
Aumento significativo da função pulmonar após quatro semanas de tratamento anti-inflamatório	aumento do VEF ₁ em > 12% e > 200 ml (ou PEF em > 20%) após quatro semanas de tratamento, na ausência de infecções respiratórias
Teste de provocação com exercício positivo	queda no VEF ₁ > 10% e > 200 ml da linha de base
Teste de bronco-provocação positivo	Queda no VEF ₁ em relação ao valor basal ≥ 20% com doses padrão de metacolina ou histamina, ou ≥ 15% com hiperventilação padronizada, solução salina hipertônica ou provocação com manitol
Variação excessiva da função pulmonar entre as visitas (menos confiável)	Variação do VEF ₁ > 12% e > 200 ml entre as visitas, fora das infecções respiratórias

Fonte: modificado de GOLD, 2018, p.17

Pacientes que já fazem tratamento com β_2 agonistas de curta ação (SABA) ou β_2 agonistas de longa ação (LABA) devem ter usado última dose há 4 e 15 horas, respectivamente, antes do teste de reversibilidade com uso de medicação broncodilatadora. É importante também citar que a reversibilidade ao

broncodilatador (BD) pode ser perdida durante exacerbações graves ou infecções virais (GOLD, 2018). A variabilidade diária do PFE é calculada a partir da medida do PFE duas vezes ao dia e média da semana, usando o mesmo medidor a cada vez, pois seu valor pode variar em até 20% entre diferentes medidores (REDDEL et al., 1999).

Estudos que compararam a prevalência de sintomas da asma e diagnóstico da doença em países de baixa e média renda per capita sugerem uma grande taxa de subdiagnóstico, como na amostra estudada por Barreto e col. (2014). A doença que não é diagnosticada e conseqüentemente não é tratada adequadamente, onera mais o Sistema de Saúde por visitas frequentes aos serviços de urgência, inclusive com aumento das internações e risco de vida por “crises” graves. Os países com maiores taxas de mortalidade são aqueles em que a terapia de controle não está disponível (MASOLI et al., 2004).

Outro desafio no diagnóstico e tratamento da doença é sua heterogeneidade. A asma é cada vez mais, considerada uma síndrome, com diversos fenótipos que se sobrepõem. Apesar da maioria dos pacientes apresentar asma leve a moderada e com a presença de inflamação eosinofílica, existem grupos que apresentam características clínico-laboratoriais muito distintas, como asma de início tardio e não associada a alergia. (MOORE et al., 2010)(WENZEL, 2012). Uma parcela bem menor de pacientes apresentam asma grave (aproximadamente 5% a 10% da população de asmáticos), mas consomem cerca de 50% dos recursos de tratamento (ADCOCK; ITO, 2004).

Os pacientes com asma são classificados, com relação à gravidade, considerando-se o nível de tratamento medicamentoso necessário para controle dos sintomas da doença. Desta forma, pacientes que controlam os sintomas com baixas doses de corticoide inalatório (ICS) ou antagonistas de receptor de leucotrieno, ou ainda, usam apenas medicação de resgate conforme necessidade (β_2 agonista de curta ação) são classificados como asma leve. Para aqueles que

utilizam dose baixa da associação ICS/LABA e controlam bem os sintomas, a classificação é asma moderada. Os pacientes que para controle dos sintomas necessitam de altas doses da associação ICS/LABA ou ainda assim, necessitam de medicação adjuvante (Tiotrópio, anti IgE, anti IL-5) são pacientes com asma grave.(GINA, 2018)

Os testes espirométricos são incapazes de expor os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ou fenótipos de um indivíduo com asma (WADSWORTH; SIN; DORSCHIED, 2011) o que impulsionou pesquisas sobre biomarcadores, que pudessem apontar para um mecanismo fisiopatológico comum dentro dos subgrupos fenotípicos (BARTMINSKI; CROSSLEY; TURCANU, 2015).

O método mais acurado para avaliar a inflamação pulmonar é o histopatológico, mas o processo de fazer biópsias por broncoscopia é invasivo e requer patologistas experientes (WADSWORTH; SIN; DORSCHIED, 2011). Alguns outros métodos foram estudados para medir inflamação.

A fração expirada de óxido nítrico no ar exalado (FENO) sugere inflamação eosinofílica das vias aéreas (KOREVAAR et al., 2015). Entretanto, o FENO pode estar aumentado também em condições alérgicas associadas à asma, e por outro lado, não está presente em alguns fenótipos, como na asma neutrofílica. O estudo das proteínas presentes no condensado de ar exalado mostrou-se promissor para encontro de biomarcadores na Asma (WADSWORTH; SIN; DORSCHIED, 2011).

Corroborando a natureza inflamatória sistêmica da asma, a proteína catiônica eosinofílica aumentou no plasma de pacientes após contato com alérgenos e diminuiu com tratamento, e também quando se evitou o contato com alérgenos (REDDEL et al., 2009).

Foi evidenciado também, a liberação de quimiocinas inflamatórias e proteinases pelo epitélio da via aérea inflamada, que podem servir como

biomarcadores da presença e do tipo de processo inflamatório no paciente com asma (WADSWORTH; SIN; DORSCHIED, 2011).

Entretanto, novas pesquisas são necessárias para conhecer a importância destes biomarcadores na asma. É importante também avaliar a presença de novos biomarcadores com técnicas mais rápidas e simples, usando amostras de fácil obtenção e que tenham bom nível de acurácia diagnóstica.

2.2 ESPECTROSCOPIA FTIR

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é um método de análise de amostras orgânicas ou inorgânicas pela medida da interação entre a radiação eletromagnética no infravermelho (IV) e as moléculas presentes na amostra analisada.

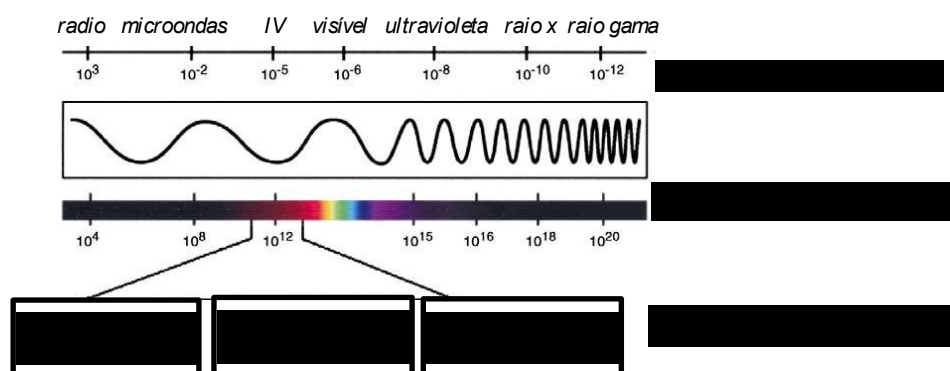
A radiação infravermelha é absorvida pela matéria e promove mudanças nos dipolos das ligações entre os átomos, por meio de vibrações e rotações, que originam picos e determinam o espectro de frequência da amostra. Desta forma, apenas moléculas com momento dipolo entre suas ligações atômicas podem se tornar ativas no IV (STUART, 2005).

Assim, uma molécula pode ser vista como um sistema de massas, unidas por ligações, com propriedades semelhantes a uma mola, que sofrem alterações no comprimento (alongamento) ou no ângulo da ligação (flexão). Algumas ligações podem se estender em fase (alongamento simétrico) ou fora de fase (alongamento assimétrico). Se uma molécula possui átomos terminais diferentes terão proporções variáveis do movimento de alongamento de cada grupo. Desta forma, cada molécula tem uma frequência de vibração única, que a diferencia de todas as outras, criando uma “impressão digital” da amostra (STUART, 2005).

As ondas eletromagnéticas no IV caracterizam-se por maior comprimento de onda e conseqüentemente, menor número de ondas, frequência e energia que a luz visível. O número de ondas é mais utilizado como grandeza no espectro IV, que corresponde à faixa entre 10 a 13000 cm^{-1} . Esta região é subdividida

em três faixas com relação à proximidade do espectro da luz visível: IV próximo ou NIR ($13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), IV médio ou MIR ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) e o IV distante ou FIR ($< 400 \text{ cm}^{-1}$). A análise qualitativa e quantitativa de amostras biológicas é realizada na faixa do IV médio (MIR) aonde ocorrem as vibrações das principais espécies moleculares que compõe tais amostras. Nesta faixa do IV médio ainda temos quatro regiões principais: estiramento das ligações simples ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$); tripla ligação das nitrilas e carbonilas ($2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$); duplas ligações entre carbono, oxigênio e nitrogênio ($2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) e a região conhecida como “fingerprint” por obter informações mais próprias de cada amostra ($1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$) (STUART, 2005).

Figura1- Espectro Eletromagnético



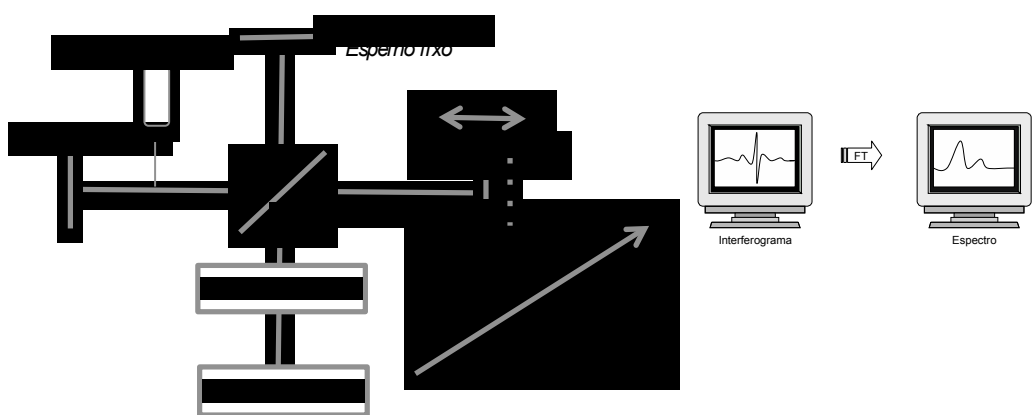
Fonte: modificado de NOREEN et al, 2012

Os espectrofotômetros atuais, usados na análise de amostras biológicas, emitem radiação IV na faixa do MIR e possuem o interferômetro de Michelson, que substituiu a grade de difração dos antigos espectrofotômetros dispersivos. O interferômetro de *Michelson* é constituído de um divisor de feixes (“*beamsplitter*”), um espelho fixo e um espelho móvel. No divisor, o feixe IV contínuo é dividido em duas partes. A fração transmitida atinge o espelho fixo, enquanto a refletida é direcionada para o espelho móvel e quando recombina-

se ocorrem interferências construtivas e destrutivas, dependendo da posição do espelho móvel em relação ao espelho fixo. O feixe resultante passa através da amostra, onde ocorrem as absorções, e prossegue até o detector (AL-SAEED; KHALIL, 2009).

O interferômetro permitiu um aumento no limite de detecção das vibrações, melhora da relação sinal/ruído e aumento na quantidade e velocidade das análises (várias leituras sucessivas do espectro com registro do valor médio). A transformada de Fourier é o cálculo matemático que faz um somatório de ondas sinusoidais de frequências diferentes, como acontece com o uso do interferômetro. Os componentes básicos para uso de FTIR são fonte de radiação IV, laser de referência, interferômetro, detector (dependem da região do espectro IV do aparelho) e processador (computador). (STUART, 2005)

Figura 2- Interferômetro de Michelson



Esquema ilustrativo para Interferômetro de Michelson e espectro resultante da Transformada de Fourier (FT). Fonte: Modificado de MCCLELLAND; MANKIN, 2018 e HELFER et al., 2006

A escolha do método de análise na espectroscopia FTIR depende principalmente da natureza física da amostra (estado físico, espessura, solubilidade) e da informação a ser coletada, se quantitativa ou qualitativa. Os três principais métodos de amostragem são transmissão, transfleção e reflexão

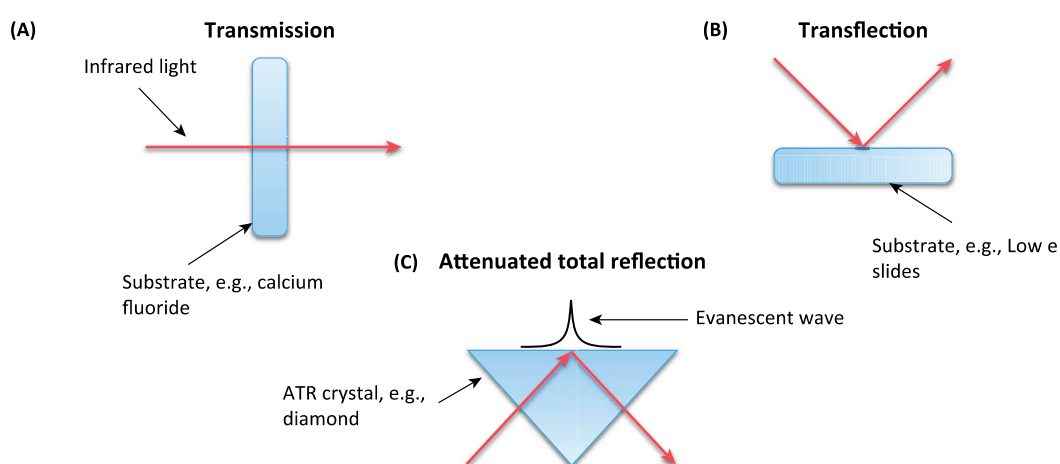
total atenuada. (STUART, 2005) Cada modo oferece conveniência para algumas amostras e desafios para outras. No modo de transmissão, a luz IV passa uma única vez pelo substrato e pela amostra. A radiação infravermelha não é transmitida através de vidro, o que torna o processo caro pelas janelas alternativas que devem ser usadas. Por este motivo, o modo de transflecção tornou-se popular. Neste método a amostra, (tecido, células ou biofluido) é colocada numa superfície altamente refletiva. O raio infravermelho passa pela amostra, reflete a superfície da lâmina e passa de volta através da amostra para o detector. Há nesta técnica uma vantagem de aumento da sensibilidade, pelo fato do feixe de infravermelho passar através da amostra duas vezes. Os substratos de reflexão são baratos, compostos por uma lâmina de microscópio de vidro revestida com uma cobertura metálica fina, conhecida como slide de baixa emissividade (low-e slide). Uma desvantagem deste método é que a superfície refletiva dá origem a um campo elétrico. Isso resulta em uma modulação dependente do número de campos elétricos acima desta superfície, podendo levar a intensidades de absorção que variam não linearmente com a espessura, e realizando certas interpretações espectrais não confiáveis (BASSAN et al., 2013).

No ATR, o feixe infravermelho passa por um cristal transparente de alto índice de refração (conhecido como elemento de reflexão interno - IRE). A luz entra no cristal do lado esquerdo e se propaga através da reflexão total em toda extensão do cristal. Em cada reflexão total, uma onda evanescente é gerada e penetra a amostra na superfície do cristal. A luz de saída do lado direito é então atenuada de acordo com a absorbância da amostra sob análise (HANS; MÜLLER; SIGRIST, 2012).

O método ATR-FTIR não requer substratos especiais e exige pouca ou nenhuma preparação da amostra. Também tem a vantagem de analisar biofluidos que podem ser colocados e secados diretamente no cristal de ATR, antes que os espectros sejam medidos (DIESSEL et al., 2004). As análises por

este método são rápidas e simples, sendo apropriado para processos diagnósticos. Já se mostrou uma ferramenta robusta para detecção acurada de insuficiência renal (KHANMOHAMMADI et al., 2013), cânceres de ovário e endometrial (GAJJAR et al., 2013) e carcinoma basocelular (KHANMOHAMMADI et al., 2007), pela análise do soro sanguíneo.

Figura 3- Métodos de Amostragem na Espectroscopia FTIR



Representação esquemática dos três principais modos de amostragem para espectroscopia FTIR. A) transmissão; B) reflexão e C) reflexão total atenuada

Fonte: DORLING; BAKER, 2013, p. 328

Existem várias técnicas nos espectrofotômetros atuais que auxiliam na avaliação dos espectros gerados. A correção da linha de base, por exemplo, une os pontos de menor absorvância num nível plano, destacando assim os picos da amostra. Em seguida, avalia-se a área de absorvância entre o pico da faixa e a linha de base. Outro tratamento no espectro original que acentua os picos, ou ainda desdobram picos sobrepostos de uma faixa espectral ampla, são as derivações. Especialmente a segunda derivada aumenta a precisão da análise, reduzindo a interferência do “background” (ar) e aumentando a especificidade para os picos de absorção, permitindo a seleção de um pico adequado, que

aparece como um pico negativo.(STUART, 2005) Um dos métodos utilizados para suavização de ruídos (do background) nas derivações é o conhecido Savitzky-Golay. Este método executa uma regressão polinomial ao redor de cada ponto. É possível escolher a faixa do espectro a receber o tratamento, assim como número de pontos (usados na regressão) e a ordem polinomial (RIEPPPO et al., 2012).

Um número expressivo de estudos já utilizaram o método FTIR para diagnóstico de doenças como artrite (STAIB et al., 2001), hepatite C crônica (SCAGLIA et al., 2011), dentre várias outras. Na área da Pneumologia também já foi utilizado para diagnóstico do câncer pulmonar (LEWIS et al., 2010)(SUN et al., 2013)(WANG et al., 2014), e também como marcador de diagnóstico do DPOC (WHITEMAN et al., 2008)

Até o momento, não há estudos utilizando espectroscopia ATR-FTIR para diagnóstico salivar de asma.

2.3 UTILIZAÇÃO DA SALIVA PARA DIAGNÓSTICO

A saliva humana é composta de 98% de água e 2% de outros compostos, como células epiteliais orais descamadas, microrganismos, compostos inorgânicos (eletrólitos), compostos orgânicos proteicos e não-proteicos (NAVAZESH; KUMAR, 2008)

Os componentes não proteicos da saliva são ácido úrico, bilirrubina, creatinina, glicose, lipídios (colesterol e ácidos graxos), aminoácidos, aminos, lactato e outros. As proteínas presentes na saliva incluem proteínas ricas em prolina, amilase, mucina, lisozima, IgA, lactoferrina, peroxidase, estatinas, metaloproteinases, glicoproteínas e lipoproteínas, entre outras. Outros componentes proteicos incluem enzimas e inibidores enzimáticos, citocinas e hormônios (CUEVAS-CÓRDOBA; SANTIAGO-GARCÍA, 2014)

A saliva apresenta uma concentração de proteínas 10 a 15 vezes menor que o plasma, entretanto, cerca de 27% das proteínas encontradas na saliva também estão presentes no plasma, sugerindo que a saliva pode ser usada como uma alternativa ao sangue para testes diagnósticos. Por outro lado, o restante das proteínas presentes na saliva e ausentes no plasma, também são um sinal promissor da identificação de novos marcadores moleculares na saliva (LOO et al., 2010).

A coleta da saliva é tecnicamente fácil, não invasiva e indolor, podendo ser realizada com mais frequência, além de ser possível em praticamente todos os tipos de doenças e qualquer faixa etária (PFAFFE et al., 2011). Muitas condições sistêmicas promovem alterações na quantidade, composição ou estrutura das biomoléculas salivares e por isso, nas últimas décadas, a saliva também tem sido considerada como um elemento auxiliar importante para o diagnóstico e monitoramento de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, endócrinas, imunes, e mentais, com grande contribuição das ciências “ômicas” (ZIMMERMANN; PARK; WONG, 2007) .

Uma dificuldade na utilização da saliva são as variações sofridas na sua composição por fatores como ritmo circadiano, dieta, idade, sexo estimulação da secreção salivar, dentre outros (PFAFFE et al., 2011). Entretanto, diante das inúmeras vantagens do seu uso como ferramenta diagnóstica é necessário padronizar os procedimentos de coleta e condições de manuseio e armazenamento (AL-TARAWNEH et al., 2011).

A coleta pode ser realizada de forma passiva ou estimulada. Na forma passiva, a maioria dos analitos podem ser quantificados, mas o volume de saliva coletado por este método por vezes é muito baixo (CHIAPPIN et al., 2007). Algumas horas antes da coleta da amostra deve-se orientar a não ingestão de líquidos ou alimentos e a não realizar escovação, que podem variar a taxa de secreção de saliva (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2015).

A estimulação da saliva pode ser feita pela mastigação ou uso de ácido cítrico, sendo que a escolha do sistema de coleta deve ser cuidadosamente avaliada, se houver algum analito específico de interesse. O uso do ácido cítrico, por exemplo, interfere nas concentrações de testosterona e cortisol em imunoenaios (GRANGER et al., 2004)(HANSEN; GARDE; PERSSON, 2008).

Existem alguns dispositivos comerciais que facilitam a coleta de saliva. A maioria deles contém uma base sólida, geralmente um pequeno pedaço de algodão ou poliéster para absorção de saliva e um tubo cônico para centrifugação e recuperação da saliva coletada (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2015)

As amostras de saliva devem ser refrigeradas e transportadas em temperatura controlada (a 4°C) para evitar a contaminação bacteriana (GRÖSCHL et al., 2008). Se o processamento de saliva não for realizado dentro de 3 a 6 horas após a coleta, recomenda-se armazenar a amostra entre -20°C a -80°C (HANSEN; GARDE; PERSSON, 2008).

As amostras tradicionais utilizadas no estudo e acompanhamento de doenças respiratórias são fluidos da expectoração induzida e lavado broncoalveolar (LBA). No entanto, a coleta das amostras envolve procedimentos invasivos, que são desconfortáveis e impossibilitam a amostragem frequente no mesmo indivíduo. Recentemente, uma plataforma com microarranjos de proteínas (multiplex) mostrou-se capaz de diferenciar saliva humana coletadas de pacientes com doença pulmonar (asma e fibrose cística) daquelas de indivíduos saudáveis (NIE et al., 2013).

Tendo em vista que diversos tipos de biomarcadores inflamatórios associados a doenças sistêmicas, assim como um crescente número de marcadores moleculares específicos para diferentes doenças, têm sido detectados na saliva (RATHNAYAKE et al., 2013b), a avaliação de

biomarcadores na saliva, para doenças pulmonares prevalentes como a asma, tornou-se promissor.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo foi investigar a utilidade da espectroscopia ATR-FTIR como uma ferramenta diagnóstica para asma, usando saliva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No grupo de pacientes asmáticos e no grupo controle:

- ✓ Determinar o perfil salivar por espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR);
- ✓ Identificar modos vibracionais sejam potenciais biomarcadores salivares por espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR);
- ✓ Avaliar o potencial diagnóstico destes possíveis biomarcadores espectrais da saliva por meio da Curva ROC (*Receiver Operator Characteristic curve*);

4. ARTIGO

Differential Spectral Signature of Human Saliva Using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for Asthma Diagnosis

Tatiane M.L.C. Bastos^a, Douglas C. Caixeta^b, Leia Cardoso-Sousa^b, Emilia Maria Gomes Aguiar^b, Quintiliano S.S. Nomelini^c, Luiz Ricardo Goulart^d, Robinson Sabino-Silva^b, Thulio Marquez Cunha^{a,e*}

^{a.} *Department of Internal Medicine, Pulmonary Function and Clinical Exercise Physiology Laboratory, Clinical Hospital of Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.*

^{b.} *Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.*

^{c.} *Department of Mathematics and Statistics, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.*

^{d.} *Institute of Genetic and Biochemistry and Nanobiotechnology Laboratory, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.*

^{e.} ** Corresponding Author: Federal University of Uberlandia (UFU), Pulmonary Function and Clinical Exercise Physiology Laboratory. E-mail: thulio.cunha@ufu.br*

4.1 Abstract

Asthma is a common and a major respiratory health burden worldwide. Asthma diagnosis actually relies on a combination of clinical factors, bronchodilator responsiveness in lung function and airway inflammation. Consequently, the search for a non-invasive, reagent-free, and specific platform to asthma diagnosis is needed for clinical practice. Fourier - transform infrared (FTIR) spectroscopy demonstrated to be a robust tool for accurate detection of several diseases. This study explores whether FTIR can produce distinct spectral profiles in saliva of asthmatic patients comparing to healthy subjects to identify asthma spectral biomarkers. Ten asthma patients and ten healthy subjects were selected to collect saliva for attenuated total reflection (ATR)-FTIR spectroscopy analysis. The intensity of eight vibrational modes (two of original spectra and six of second derivative spectra) showed significant changes between asthma patients and health subjects. Compared to healthy subjects, these vibrational modes demonstrated a sensitivity and specificity >70% ($p < 0.05$). Altogether, attenuated total reflection ATR-FTIR spectroscopy may provide a useful tool to complement analysis in the clinical routine for the diagnosis of asthma.

4.2 Introduction

Asthma is a chronic airways disease characterized by recurrent attacks, inflammation, and airflow limitation that affects 5 to 10% of the population in many developed countries.¹ According to the latest World Health Organization (WHO) estimatives, asthma was responsible for 383.000 deaths worldwide, in 2015.² Most of these deaths could have been avoided and occurred due to a lack of medical care in diagnosing, in monitoring the treatment and in preventing exacerbations.^{2,3} Studies comparing symptoms prevalence and disease diagnosis in low and middle-income countries suggest a high underdiagnosis rate⁴, which is responsible for higher burden in the health system, rising visits in emergence care and hospitalizations, and rising death risk.⁵

Difficulty with asthma diagnosis is due to poor access to health system, limited diagnostic tools and multiple phenotypes of disease. Pulmonary function tests are most commonly used to confirm the diagnosis, in clinical practice. However, airflow obstruction is variable and thus can be missed in spirometry, being necessary to make other tests, such as bronchial provocation, in order to indicate diagnosis.⁶ Asthma is a heterogeneous disease with several different phenotypes. It is common in all ages including elderly, and sometimes presents many aspects of confusion, such as comorbidities and smoking.⁶ Thus, biomarkers are promising and may be useful in diagnosing asthma.¹ However, most of them have expensive and difficult techniques to standardize or clinical effectiveness is unproven.⁷

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is a sensitive technique that analyses biological metabolism and reports pathological biochemical changes resulting from diseases.⁸ The method uses interaction between infrared (IR) electromagnetic radiation and sample, by analysis of molecular vibration and modification of dipolo moment between chemical bonds.⁹ Each molecule have a different spectrum, making a fingerprint of the sample, which can be used

to discriminate between different types of cells¹⁰, tissues¹¹ and body fluids¹², as well to detect diseases.¹³ For metabolic fingerprint in disease diagnosis, researchers have concentrated on the MIR (Medium Infrared) part of the spectrum (from 4000–400 cm^{-1}) where main molecular species vibration of biological samples occur⁸.

Attenuated total reflection (ATR) is a method of FTIR acquisition method in which infrared beam passes into an infrared transparent crystal of high refractive index, known as internal reflection element (IRE). Measures by attenuated total reflection (ATR-FTIR) are quick, simple, cheap and appropriate for diagnostic processes. This method showed to be a robust tool for accurate detection of renal insufficiency¹⁴, ovarian and endometrial cancers¹⁵ and basal cell carcinoma.¹⁶ Furthermore, it is also ideal for the analysis of various biofluids¹⁷, including saliva that can be placed and dried directly on the ATR crystal before the spectra are measured.¹⁸

Systemic conditions can alter the composition and structure of salivary biomolecules and, in the last decades, saliva analysis showed efficiency to be explored as an alternative method to help diagnosing and monitoring diseases.^{19,20} Some reports showed that it is possible to find biomolecules in human saliva that characterize asthma.^{21,22} Thus, here we hypothesize that unique spectral salivary biomarkers may be differentially expressed in saliva of asthmatic patients. The aim of this study was to identify salivary ATR-FTIR spectral biomarkers to discriminate asthmatic from healthy subjects, which will lead to clinical spectral biomarkers for asthma screening.

4.3 Patients and methods

4.3.1 Participants

The present study was conducted at the Clinical Hospital of Federal University of Uberlandia – (HC-UFU, Minas Gerais, Brazil) after having been approved by local Ethics Committee in Research with Humans (protocol number 61266816.1.0000.5152) and following the principles of Helsinki Declaration. All participants signed an informed consent form. This study included 10 patients (five men and five women) diagnosed with Asthma and 10 age and gender-matched healthy control subjects (five men and five women) with a negative history of pulmonary and systemic or oral disease. The general inclusion criteria were age over 18 years who never smoked and general criteria for exclusion were any serious systemic disease such as heart failure, chronic renal dysfunction, hepatic dysfunction, Diabetes mellitus, other pulmonary disease diagnosis and current or previous malignancy diagnosis.

According to Global Initiative for Asthma (GINA)⁶ recommendations, asthmatic patients recruited, at diagnostic time, had characteristic symptoms and positive reversibility test recorded (forced expiratory volume in first second - FEV₁ - improved by at least 12% and at least 200 mL after bronchodilator administration) and were being followed at UFU-pulmonology outpatient clinic. They were invited consecutively on scheduled visits. Participants of control group were volunteers who met inclusion criterias.

All participants of study were evaluated on two different occasions. At first appointment they performed spirometry, before and after bronchodilator, according to American Thoracic Society (ATS) standards²³ and were submitted to thorax x-ray. In the next day, the participants collected saliva and venous blood sample. Laboratory tests performed were blood count and total immunoglobulin E (IgE).

4.3.2 Collection of Saliva

Saliva samples were collected using Salivette® and performed in the morning (between 8:00 and 10:00) after 12 hours of fasting. All participants were asked to abstain from using oral cleansers for at least 1 h prior to sample collection and to not take any medications until saliva collection. Asthma patients used their morning aerosol only after the saliva sample was collected (having spent at least 12h without their asthma medication). The tubes with saliva were centrifuged at 3000g for 10 min and then stored at -80° C for further processing and analysis.

4.3.3 Spectra ATR-FTIR acquisition and data processing

After saliva thawing, each salivary spectrum were recorded in the wavenumber range from 4000cm⁻¹ to 400 cm⁻¹, using a spectrophotometer Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) coupled to a attenuated total reflectance (ATR) component. The crystal material in ATR unit was a diamond disc. Sample was homogenized and two microliters of saliva was directly inserted on ATR-crystal. After that, salivary spectra were recorded at a resolution of 4 cm⁻¹ and averaged 32 scans. Spectra were obtained using the data acquisition Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). Background absorption spectra (atmospheric air) were taken and ATR diamond crystal was cleaned with isopropyl alcohol, prior first spectra sample was acquired and between each new sample. Normalization by vector and baseline correction was done, to minimize errors on spectra analyses. Absorbance of area under spectral regions, that may cooperate to differentiate groups, was calculated.

The region between 400 cm⁻¹ to 1800 cm⁻¹ was carried out using Savitzky-Golay method in Origin 9.1 software in order to accentuate bands and increase analysis accuracy. This Second differentiation spectra were set with polynomial order 5 and 20 window points.

4.3.4 Statistical analysis

The original and derivatives values of area absorbance at some specific wavenumbers were submitted to Shapiro-Wilk normality test, for each group. According to results, Un-paired t test or Mann-Whitney test (for parametric and non-parametric data, respectively) was used to compare groups. It was assumed p values less than 0.05 as statistically significant and confidence intervals (CI) of 0.95. Clinical, demographics and biological parameters were submitted at same statistical analysis.

For all vibrational modes that were capable differentiating groups, the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve were constructed and area under curve (AUC), sensitivity and specificity were computed. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, USA).

4.4 Results

4.4.1 Patients characteristics

Asthma patients and control subjects were well matched for age and gender. Demographic, clinical characteristics and spirometric data are summarized in table 1. Blood analysis showed significantly greater eosinophil cell counts (both, cells/mm³ and % of white cells) and serum total immunoglobulin E (IgE) in asthma patients possibly in accordance with expressive allergy history in participants of asthma group (rhinitis mostly).

Spirometric data had shown marked decrease in VEF₁ and VEF₁/CVF ratio of asthma patients compared to control subjects at both, pre and post bronchodilator. Significant reversible obstruction to expiratory airflow after uses of bronchodilator was seen at spirometry (Δ VEF₁) in asthma group comparing to control.

4.4.2 ATR-FTIR Spectroscopy

The mean of infrared spectra was obtained from saliva samples of patients with asthma and control subjects (figure1). Second derivative spectra were also analyzed (B), since provide more detailed with additional vibrational modes.

Vibrational modes at 2344 cm^{-1} (Figure 2A) and 1341 cm^{-1} (Figure 2B) were increased ($p < 0.05$) in asthma patients compared to matched-controls. ROC analysis was used to ascertain the potential diagnostic of these bands. Area under curve (AUC) of 2344 cm^{-1} salivary vibrational mode was 0.80 ($p = 0.021$), with sensitivity 70% and specificity 90% to a cutoff value of 0.0525 a.u (Figure 2C). At band 1341 cm^{-1} (D), AUC was 0.77 ($p = 0.041$), with sensitivity 70% and specificity 80% to a cutoff value of 0.0505 a.u.

At second derivative spectra, six vibrational modes of saliva (1629 , 1156 , 1119 , 1076 , 745 and 619 cm^{-1}) were reduced ($p < 0.05$) in asthma compared to control group (figure 3-A-F).

The ROC curve analysis showed that AUC of 1629 cm^{-1} vibrational mode was 0.83 ($p = 0.012$) with a sensitivity of 80% and specificity 70% to a cutoff value of 0.1040 a.u (figure 3G). Vibrational modes 1156 and 1119 cm^{-1} showed AUC of 0.80 ($p=0.023$) with sensitivity of 70% and specificity 80% for cutoff value of 0.0259 and 0.0377, respectively (figure 3H, 3I). Vibrational mode 1076 cm^{-1} presented ROC curve analyzing with AUC of 0.85 ($p = 0.0082$) with sensitivity of 70% and specificity of 90% for cutoff value of 0.0866 (figure 3J). In the same way, at 745 cm^{-1} , AUC was 0.88 ($p= 0.0036$), showed sensitivity of 70% and specificity 90% for cutoff value of 0.0078 (figure 3K). The ROC curve analysis showed that AUC of 619 cm^{-1} vibrational mode was 0.87 ($p = 0.005$) with a sensitivity of 70% and specificity 100% to a cutoff value of 0.0050 a.u (figure 3G). For all vibrational modes that were studied on second derivative curve, intensity of cited peaks was greater in matched-control comparing with asthma patients.

ATR-FTIR vibrational modes assignments of saliva are represented in

Table 2.

4.5 Discussion

This study demonstrated infrared salivary spectra from asthma patients comparing to health subjects to propose spectral biomarkers as disease differentiators. In this way, we found several vibrational modes in saliva of asthmatic patients group that discriminated them from health subjects group. To the best of our knowledge, this is the first study in the literature evaluating differences in asthma patients versus health control using FTIR spectroscopy of saliva. We found a total of eight bands with capacity in discriminate asthma patients and healthy subjects with moderate sensitivity and high specificity. Specially three wavenumbers at second derivative spectra (1076 , 745 and 619 cm^{-1}) presented very high specificity values for differentiation between groups ($\text{AUC} > 0.85$). The majority of vibrational modes altered in one of the groups were found in MIR region between $1500 - 600\text{cm}^{-1}$ ($1341, 1156, 1119, 1076, 745$ and 619cm^{-1}). This region is known as “fingerprint” because of large variety of specific molecules presence.^{24, 25, 26}

MIR ($4000 - 600\text{cm}^{-1}$) is basically separated in four sub-regions. At higher wavenumber region ($4000 - 2500 \text{cm}^{-1}$) occurs various single bonds stretching (C – H, N – H and O – H), including fatty acid and stretching vibrations CH_2 and CH_3 ($3500 - 2800 \text{cm}^{-1}$). The following region ($2500 - 2000\text{cm}^{-1}$) shows IR absorption by triple bonds of nitriles and carbonyls, where we found a discriminative peak between asthma patients and health control at 2344cm^{-1} band. Third MIR region is marked by stretching in double band involving carbon, nitrogen and oxygen ($2000 - 1500 \text{cm}^{-1}$). Amide I and amide II are well-known regions with infrared spectra bands around 1650 and 1550cm^{-1} (respectively) and that reflect the presence of proteins and polypeptides. We registered two peaks ($1662, 1630 \text{cm}^{-1}$) that discriminate patients and controls at Amide I region. Some authors reported the presence of this infrared bands as

changes in collagen, proteoglycans and elastin.²⁷ The fourth MIR sub-region is “fingerprint” , between $1500 - 600\text{cm}^{-1}$, as cited above. The identification of components by functional group analysis is useful to evaluate pure molecules but IR spectra of biofluids contains a large number of bands, many of which will be impossible to confidently assign to vibration of a particular group because the vibrations of different molecular components of saliva may overlap and the spectrum may reflect only the average biochemical composition.²⁴

At research scenery, FTIR has been widely used as diagnostic method for several diseases such as arthritis²⁸, hepatic fibrosis²⁹, depressive disorders³⁰, pulmonary hypertension³¹ and mainly at cancer studies.^{32, 33} The method uses several body fluids like urine, sputum, saliva and blood, which is the most broadly studied. But saliva has many advantages for FTIR spectroscopy, from the collection, that is easy, quick and painless, to the simple processing. Also demonstrates lower risk of contamination and does not coagulate, requiring fewer analysis.^{34, 35}

Spectroscopy FTIR in pulmonary diseases, was able to differentiate patients with lung cancer³⁶. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) was also evaluated for sputum FTIR and showed potential application for qualitative and quantitative pattern differences between health and COPD.³⁷

Some reports have raised concerns about both under-diagnosis^{2,4} and over-diagnosis^{38,39} of asthma. Tests of expiratory airflow is a necessary condition^{6,40} For asthma diagnose, but fewer than half patients submitting to spirometry test and a great number of them are treated empirically.³⁹ Furthermore, spirometry has limitations for detecting asthma with very low sensitivity values (23%) in some reports⁴¹ with specificity around 90%.^{41,42} This study showed many vibrational modes ATR-FTIR capable of differentiating between patients with asthma and healthy subjects with moderated sensitivity (70%) and high specificity (80-100%) demonstrating the possibility of further

evaluating of FTIR spectroscopy in practice of asthma diagnosis cooperating with current diagnostic methods.

We collected our data from patients of a tertiary care hospital and this guarantees a well-defined asthma patients sample but on the other hand it limited the participation of a wide range of asthma phenotypes. To improve our results further evaluation a larger number of participants in widely range of age will be selected to perform multivariate statistical analysis.

4.6 Conclusion

In present study we demonstrated that asthma patients can be discriminated from healthy subjects using saliva samples by ATR-FTIR analysis. Eight vibrational modes demonstrated to be potential spectral salivary biomarkers and showed that salivary ATR-FTIR is a promising technique for asthma screening. Further validations of this approach must be carried out in larger asthmatic populations and with larger range of phenotypes of disease. The use of salivary spectroscopy for asthma diagnosis together with clinical characteristics will improve quality in asthma diagnosis, with all the implications that this may have on public health and asthma control.

4.7 Conflicts of interest statement

The authors declare they have no conflicts of interest.

4.8 Acknowledgements

We wish to thank our funders. This research was supported by National Institute of Science and Technology in Theranostic and Nanobiotechnology (CAPES/CNPq#465669/2014-0; FAPEMIG #APQ-03613-17) and Chiesi Foundation Onlus (research grant in 2017

4.9 Abbreviations

ATR	Attenuated total reflection
ATS	American Thoracic Society
AUC	Area under curve
CI	Confidence interval
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CVF	Forced Vital Capacity
FTIR	Fourier - transform infrared
GINA	Global Initiative for Asthma
HC-UFU	Clinical Hospital of Federal University of Uberlandia
Ig-E	Immunoglobulin E
IQR	Interquartile range
IR	Infrared
IRE	Internal reflection element
MIR	Medium Infrared
ROC	Receiver Operating Characteristic
WHO	World Health Organization
Δ FEV ₁	Variation in Forced Expiratory Volume in first second
ν	Stretching vibrations
ν (PO ₂ -)	Phosphate stretching vibrations

References

1. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):716–25.
2. WHO (World Health Organization), 2016 [Internet]. World Health Organization. [cited 2018 Oct 18]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
3. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures J-P. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ*. 2005 Jul;83(7):548–54.
4. Barreto ML, Ribeiro-Silva R de C, Malta DC, Oliveira-Campos M, Andreazzi MA, Cruz AA. Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012). *Rev Bras Epidemiol*. 2014;17 Suppl 1:106–15.
5. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469–78.
6. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Internet :cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
7. Wadsworth S, Sin D, Dorscheid D. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. *J Asthma Allergy*. 2011;4:77–86.
8. Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *The Analyst*. 2006 Aug;131(8):875–85.
9. Stuart BH. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. [Internet]. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd.; 2005 [cited 2018 Sep 22]. Available from: <http://www.SLQ.ebib.com.au/patron/FullRecord.aspx?p=194354>
10. Clemens G, Hands JR, Dorling KM, Baker MJ. Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. *The Analyst*. 2014 Sep 21;139(18):4411–44.

11. Andrew Chan KL, Kazarian SG. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chem Soc Rev*. 2016;45(7):1850–64.
12. Bassan P, Sachdeva A, Lee J, Gardner P. Substrate contributions in micro-ATR of thin samples: implications for analysis of cells, tissue and biological fluids. *The Analyst*. 2013;138(14):4139.
13. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Crit Rev Anal Chem*. 2015 Apr 3;45(2):156–65.
14. Khanmohammadi M, Garmarudi AB, Ramin M, Ghasemi K. Diagnosis of renal failure by infrared spectrometric analysis of human serum samples and soft independent modeling of class analogy. *Microchem J*. 2013 Jan;106:67–72.
15. Gajjar K, Trevisan J, Owens G, Keating PJ, Wood NJ, Stringfellow HF, et al. Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer. *The Analyst*. 2013;138(14):3917.
16. Khanmohammadi M, Nasiri R, Ghasemi K, Samani S, Bagheri Garmarudi A. Diagnosis of basal cell carcinoma by infrared spectroscopy of whole blood samples applying soft independent modeling class analogy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Oct 9;133(12):1023–1023.
17. Orphanou C-M. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Sci Int*. 2015 Jul;252:e10–6.
18. Diessel E, Willmann S, Kamphaus P, Kurte R, Damm U, Heise HM. Glucose Quantification in Dried-down Nanoliter Samples Using Mid-Infrared Attenuated Total Reflection Spectroscopy. *Appl Spectrosc*. 2004 Apr;58(4):442–50.
19. Zimmermann BG, Park NJ, Wong DT. Genomic targets in saliva. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar;1098:184–91.
20. Wang Q, Yu Q, Lin Q, Duan Y. Emerging salivary biomarkers by mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2015 Jan 1;438:214–21.
21. Nie S, Benito-Peña E, Zhang H, Wu Y, Walt DR. Multiplexed Salivary Protein Profiling for Patients with Respiratory Diseases Using Fiber-Optic Bundles and Fluorescent Antibody-Based Microarrays. *Anal Chem*. 2013 Oct;85(19):9272–80.

22. Nie S, Henley WH, Miller SE, Zhang H, Mayer KM, Dennis PJ, et al. An automated integrated platform for rapid and sensitive multiplexed protein profiling using human saliva samples. *Lab Chip*. 2014 Mar 21;14(6):1087–98.
23. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005 Aug 1;26(2):319–38.
24. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res*. 2012;2(1):1–21.
25. Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman DI. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev*. 2008 Feb;43(2):134–79.
26. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc*. 2014 Aug;9(8):1771–91.
27. de Campos Vidal B, Mello MLS. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*. 2011 Apr;42(3):283–9.
28. Staib A, Dolenko B, Fink DJ, Früh J, Nikulin AE, Otto M, et al. Disease pattern recognition testing for rheumatoid arthritis using infrared spectra of human serum. *Clin Chim Acta*. 2001 Jun;308(1–2):79–89.
29. Scaglia E, Sockalingum GD, Schmitt J, Gobinet C, Schneider N, Manfait M, et al. Noninvasive assessment of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C using serum Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Nov;401(9):2919–25.
30. Depciuch J, Sowa-Kućma M, Nowak G, Dudek D, Siwek M, Styczeń K, et al. Phospholipid-protein balance in affective disorders: Analysis of human blood serum using Raman and FTIR spectroscopy. A pilot study. *J Pharm Biomed Anal*. 2016 Nov 30;131:287–96.
31. Staniszevska-Slezak E, Fedorowicz A, Kramkowski K, Leszczynska A, Chlopicki S, Baranska M, et al. Plasma biomarkers of pulmonary hypertension identified by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *The Analyst*. 2015 Apr 7;140(7):2273–9.
32. Wang X, Shen X, Sheng D, Chen X, Liu X. FTIR spectroscopic comparison of serum from lung cancer patients and healthy persons. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014 Mar;122:193–7.

33. Sun X, Xu Y, Wu J, Zhang Y, Sun K. Detection of lung cancer tissue by attenuated total reflection–Fourier transform infrared spectroscopy—a pilot study of 60 samples. *J Surg Res*. 2013 Jan;179(1):33–8.
34. Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, Tran SD. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *J Oral Biol Craniofacial Res*. 2016 Jan;6(1):67–76.
35. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2007 Aug;4(4):531–8.
36. Lewis PD, Lewis KE, Ghosal R, Bayliss S, Lloyd AJ, Wills J, et al. Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. *BMC Cancer*. 2010 Nov 23;10:640.
37. Whiteman SC, Yang Y, Jones JM, Spiteri MA. FTIR spectroscopic analysis of sputum: preliminary findings on a potential novel diagnostic marker for COPD. *Thorax*. 2008 Feb;2(1):23–31.
38. José BP de S, Camargos PAM, Cruz Filho ÁAS da, Corrêa R de A. Diagnostic accuracy of respiratory diseases in primary health units. *Rev Assoc Medica Bras* 1992. 2014 Dec;60(6):599–612.
39. Aaron SD, Vandemheen KL, FitzGerald JM, Ainslie M, Gupta S, Lemière C, et al. Reevaluation of Diagnosis in Adults With Physician-Diagnosed Asthma. *JAMA*. 2017 Jan; 317(3):269-79.
40. Loughheed MD, Lemiere C, Ducharme FM, Licskai C, Dell SD, Rowe BH, et al. Canadian Thoracic Society 2012 guideline update: diagnosis and management of asthma in preschoolers, children and adults. *Can Respir J*. 2012 Apr;19(2):127–64.
41. Meneghini AC, Paulino ACB, Pereira LP, Vianna EO. Accuracy of spirometry for detection of asthma: a cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*. 2017 Oct;135(5):428–33.
42. Schneider A, Gindner L, Tilemann L, Schermer T, Dinant G-J, Meyer FJ, et al. Diagnostic accuracy of spirometry in primary care. *BMC Pulm Med*. 2009 Jul 10;9:31.

Table 1- Clinical, demographic characteristics and spirometric data of patients with asthma and healthy subjects.

	Asthma <i>n</i> =10	Control <i>n</i> =10	<i>p</i> value ^a
Age (years)	48.5 (35.3 – 61.5)	47.0 (39.8 – 60.3)	0.956
Gender (M/W)	5/5	5/5	
Allergy history (Y/N)	9/1	1/9	
<i>Blood tests</i>			
Eosinophils(cells/mm ³)	299 (188 – 325)	127 (104 – 175)	0.022*
Eosinophils%	5 (4 – 6)	2 (2 – 3)	0,002*
IgE total (KU/l)	119 (68 – 357)	29 (11 – 59)	<0.001*
<i>Spirometric data – Prebronchodilator</i>			
FVC (L)	3.50 (2.27 – 3.83)	3.85 (3.00 – 4.42)	0.183
FVC (%Pred)	85.0 (72.2 – 94.7)	98.0 (86.5 – 106.5)	0.027*
FEV ₁ (L)	2.47 (1.66 – 2.89)	3.24 (2.58 – 3.79)	0.019*
FEV ₁ % predicted	77.5 (55.7 – 83.5)	100.5 (90.5 – 111.3)	<0.001*
FEV ₁ /FVC%	75.5 (54.2 – 82.0)	85.0 (81.7 – 87.2)	<0.001*
FEV ₁ /FVC (%Pred)	88.5 (69.0 – 96.2)	103.0 (101.5 – 108.3)	<0.001*
<i>Post-bronchodilator</i>			
FVC (L)	3.55 (2.30 – 3.99)	3.83 (2.75 – 4.58)	0.352
FVC (%Pred)	89.5 (78.7 – 99.7)	94.0 (86.2 – 106.3)	0.254
FEV ₁ (L)	2.84 (1.59 – 3.08)	3.38 (2.52 – 3.97)	0.148
FEV ₁ % predicted	84.5 (66.2 – 96.0)	101.0 (91.0 – 114.8)	0.008*
FEV ₁ /FVC%	78.5 (59.5 – 84.5)	88.0 (85.0 – 91.2)	0.003*
FEV ₁ /FVC (%Pred)	95.5 (75.5 – 101.8)	109.0 (105.0 – 111.5)	<0.001*
Δ VEF ₁ (mL)	250.0 (107.5 – 467.5)	82.5 (37.5 – 210.0)	0.028*

IgE- serum immunoglobulin E; FVC- Forced Vital Capacity; FEV₁ – Forced Expiratory Volume in first second; Δ VEF₁- Variation in FEV₁ before and after 400 µcg salbutamoln: number of participants; Data are expressed as median and interquartile range (IQR); ^a Mann-Whitney U Test; * *p* value< 0.05

Table 2 - ATR-FTIR vibrational mode assignments and identification of the respective component of stimulated saliva.

Peak frequency	Assignments
2344 cm ⁻¹	Triple bonds of nitriles and carbonyls
1662 cm ⁻¹	Amide I band; (C=C) cis, lipids, fatty acids
1629 cm ⁻¹	Amide I region
1341 cm ⁻¹	CH ₂ wagging ; Collagen
1156 cm ⁻¹	C-O stretching vibration
1119 cm ⁻¹	Symmetric stretching P-O-C and C-O stretching mode
1076 cm ⁻¹	Symmetric phosphate stretching modes or (PO ₂ ⁻). Symmetric stretching of phosphodiester ν(PO ₂ ⁻)
745 cm ⁻¹	Guanine in a C ₃ ' <i>endo/syn</i> conformation in the Z conformation of DNA
619 cm ⁻¹	OH out-of-plane bend (associated)

Assignments based on different references.^{9,17, 25}

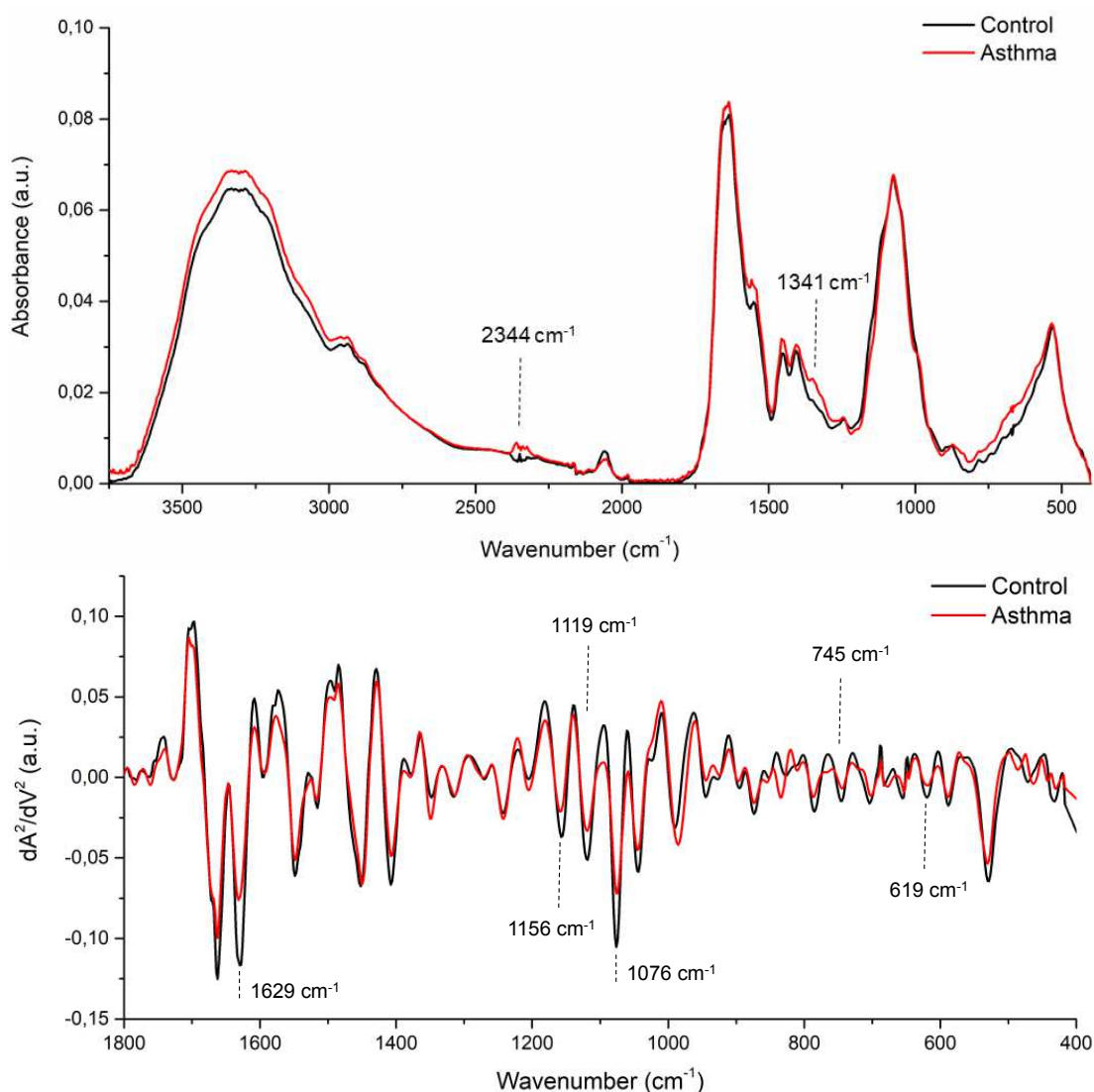


Figure 1- Average ATR-FTIR spectra for asthma patients and control subjects group. (A) original spectra (4000 – 400 cm⁻¹). (B) Second-derivative spectra (1800 – 400 cm⁻¹). Peaks with significant difference ($p < 0.05$) between asthma patients and health subjects group were identified with their wavenumber.

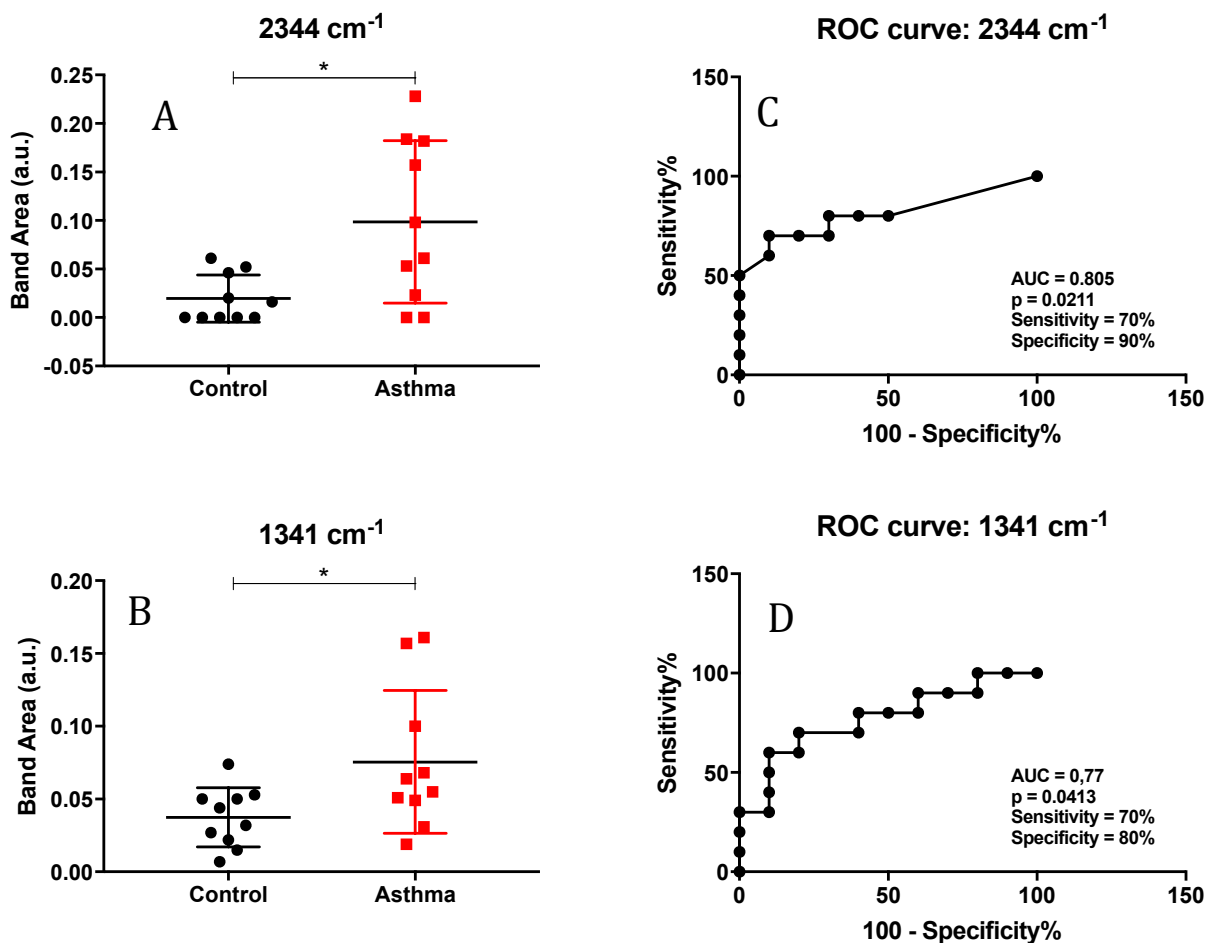
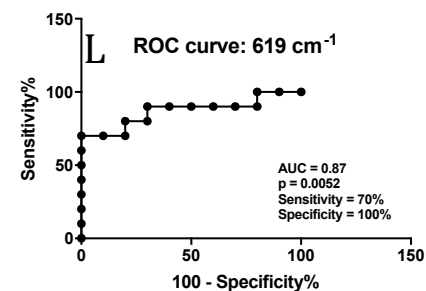
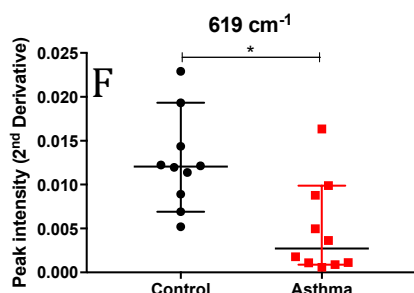
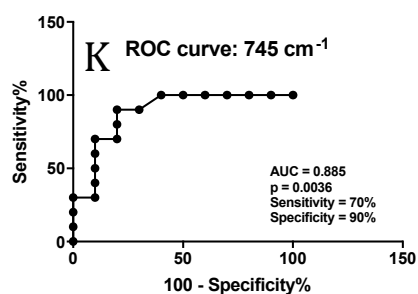
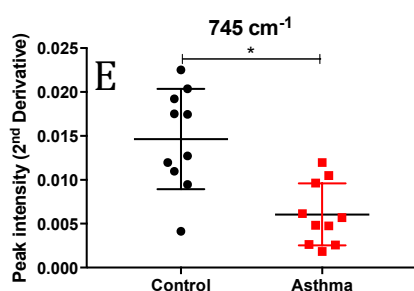
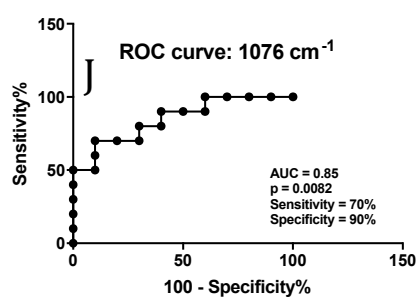
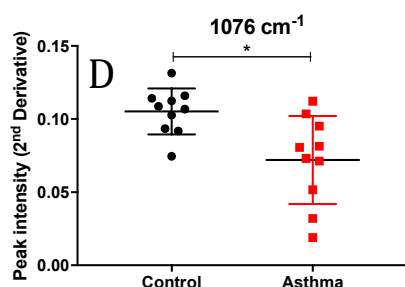
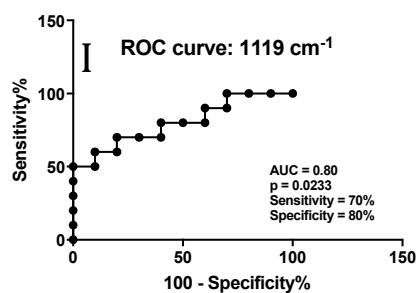
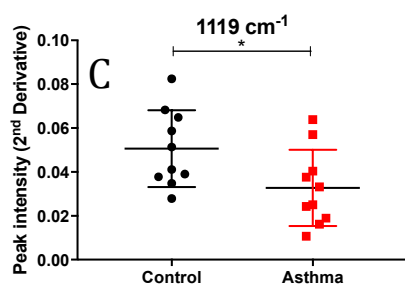
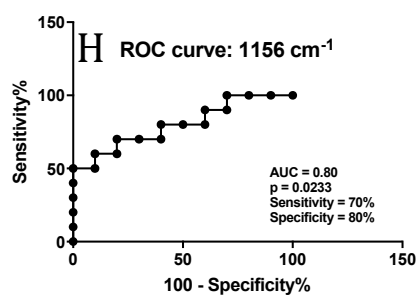
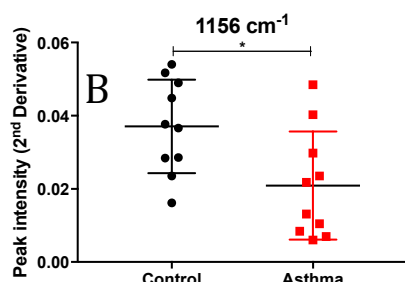
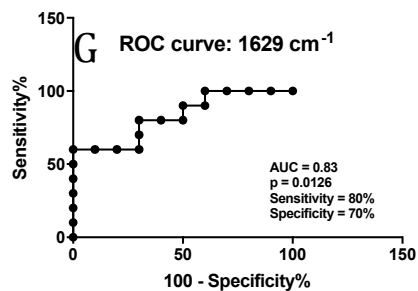
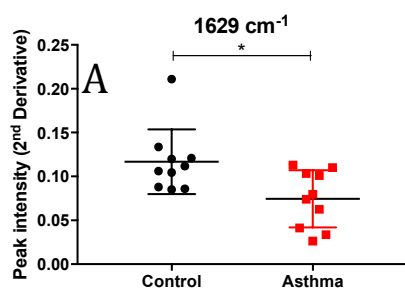


Figure 2- Area under peak of ATR-FTIR wavenumber bands of 2344 cm⁻¹ (A) and 1341 cm⁻¹ (B) $p=0.017$; $p=0.041$ respectively; values are expressed as mean \pm SD. ROC curve design for 2344 and 1341 cm⁻¹ and calculated sensitivity and specificity: (C) cut-off point: 0.0525a.u.; (D) cut-off point: 0.0505a.u.

Figure 3 - Peak intensity of vibrational modes that discriminating asthma patients and control at second derivative spectra ATR-FTIR (1800-400 cm⁻¹). (A) $p=0.011$; (B) $p=0.017$; (C) $p=0.034$; (D) $p=0.006$; (E) $p<0.001$; (F) $p=0.003$. ROC curve design for same wavenumbers and calculated sensitivity and specificity: (G) cut-off point: 0.1040 a.u.; (H) cut-off point: 0.0259 a.u.; (I) cut-off point: 0.0377a.u.; (J) cut-off point: 0.0866 a.u.; (K) cut-off point: 0.0078 a.u.; (L) cut-off point: 0.0051a.u. Values are expressed as mean \pm SD



REFERÊNCIAS

AARON, S.D.; et al. Reevaluation of Diagnosis in Adults With Physician-Diagnosed Asthma. **JAMA**, Chicago, v. 317, n. 3, p. 269 - 79, jan. 2017.

<https://doi.org/10.1001/jama.2016.19627>

ADCOCK, I. M.; ITO, K. Steroid resistance in asthma: a major problem requiring novel solutions or a non-issue? **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 257–262, jun. 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.02.001>

AL-SAEED, T. A.; KHALIL, D. A. Dispersion compensation in moving-optical-wedge Fourier transform spectrometer. **Applied Optics**, Washington, v. 48, n. 20, p. 3979, 10 jul. 2009.

<https://doi.org/10.1364/AO.48.003979>

AL-TARAWNEH, S. K. et al. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. **Omics**, Larchmont, v. 15, n. 6, p. 353–361, jun. 2011.

<https://doi.org/10.1089/omi.2010.0134>

ANDREW CHAN, K.L, KAZARIAN, S.G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. **Chemical Society Reviews**, London, 2016;45(7):1850–64.

<https://doi.org/10.1039/C5CS00515A>

BAKER, M. J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature protocols**, London, v. 9, n. 8, p. 1771–1791, ago. 2014.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>

BARRETO, M. L. et al. Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012). **Revista Brasileira De Epidemiologia**, São Paulo, v. 17 Suppl 1, p. 106–115, 2014.

<https://doi.org/10.1590/1809-4503201400050009>

BARTMINSKI, G.; CROSSLEY, M.; TURCANU, V. Novel biomarkers for asthma stratification and personalized therapy. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London, v. 15, n. 3, p. 415–430, mar. 2015.

<https://doi.org/10.1586/14737159.2015.988613>

BASSAN, P. et al. Substrate contributions in micro-ATR of thin samples: implications for analysis of cells, tissue and biological fluids. **The Analyst**, Cambridge, v. 138, n. 14, p. 4139, 2013.

<https://doi.org/10.1039/c3an00363a>

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 305–319, 31 ago. 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.010>

BELLISOLA, G.; SORIO, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. **American Journal of Cancer Research**, s/l, v. 2, n.1, p. 1-21, 2012.

BOUSQUET, J. et al. The public health implications of asthma. **Bulletin of the World Health Organization**, s/l, v. 83, n. 7, p. 548–554, jul. 2005.

BUNACIU, A. A.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Applications of FTIR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, s/l, v. 45, n. 2, p. 156-65, abril 2015.

<https://doi.org/10.1080/10408347.2014.904733>

CHIAPPIN, S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 383, n. 1–2, p. 30–40, ago. 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>

CLEMENS, G.; HANDS, J.R.; DORLING, K.M.; BAKER, M.J. Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. **The Analyst**, Cambridge, v. 139, n.18, p. 4411-44, set 2014.

<https://doi.org/10.1039/C4AN00636D>

CUEVAS-CÓRDOBA, B.; SANTIAGO-GARCÍA, J. Saliva: A Fluid of Study for OMICS. **Omics**, Larchmont, v. 18, n. 2, p. 87–97, fev. 2014.

<https://doi.org/10.1089/omi.2013.0064>

DE CAMPOS VIDAL, B.; MELLO, M.L.S. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. **Micron**, Oxford, v.42, n.3, p. 283-9, abr. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.010>

DEPCIUCH, J.; SOWA-KUCMA, M.; NOWAK, G.; et al. Phospholipid-protein balance in affective disorders: Analysis of human blood serum using Raman and

FTIR spectroscopy. A pilot study. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, Oxford, v.131, p.287-96, nov. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.037>

DIESSEL, E. et al. Glucose Quantification in Dried-down Nanoliter Samples Using Mid-Infrared Attenuated Total Reflection Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, Vancouver, v. 58, n. 4, p. 442–450, abr. 2004.
<https://doi.org/10.1366/000370204773580293>

DORLING, K. M.; BAKER, M. J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, n. 6, p. 327–328, jun. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.010>

ELLIS, D.I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. **The Analyst**, Cambridge, v.131, n.8, p.875-85, ago.2006.
<https://doi.org/10.1039/b602376m>

FUJIOKA, N. et al. Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cancer Detection and Prevention**, New York, v. 28, n. 1, p. 32–36, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.cdp.2003.11.004>

GAJJAR, K. et al. Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer. **The Analyst**, Cambridge, v. 138, n. 14, p. 3917, 2013.
<https://doi.org/10.1039/c3an36654e>

Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Disponível em: <<https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em: 27 set. 2018

GRANGER, D. A. et al. The “trouble” with salivary testosterone. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1229–1240, nov. 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.02.005>

GRÖSCHL, M. et al. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 478–486, 15 jul. 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.01.033>

HANS, K.M.C.; MÜLLER, S.; SIGRIST, M. W. Infrared attenuated total reflection (IR-ATR) spectroscopy for detecting drugs in human saliva. **Drug Testing and Analysis**, New York, v. 4, n. 6, p. 420–429, jun. 2012.
<https://doi.org/10.1002/dta.346>

HANSEN, A. M.; GARDE, A. H.; PERSSON, R. Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and their impact on measurement among healthy adults: a review. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 68, n. 6, p. 448–458, 2008.
<https://doi.org/10.1080/00365510701819127>

HELPER, G. et al. Using multivariate analysis methods in quality control of food essence by mid-infrared spectroscopy. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n. 4, p. 779-786, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400011>

HU, S.; LOO, J.A.; WONG, D.T. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. **Expert Rev Proteomics**, Abingdon, v.4, p. 531-8, ago. 2007.
<https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.531>

JAVOID, M.A. et al. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, s/l, v.6, n.1, p.67-76, jan.2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>

KHANMOHAMMADI, M. et al. Diagnosis of basal cell carcinoma by infrared spectroscopy of whole blood samples applying soft independent modeling class analogy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 133, n. 12, p. 1023–1023, 9 out. 2007.
<https://doi.org/10.1007/s00432-007-0300-3>

KHANMOHAMMADI, M. et al. Diagnosis of renal failure by infrared spectrometric analysis of human serum samples and soft independent modeling of class analogy. **Microchemical Journal**, New York, v. 106, p. 67–72, jan. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.006>

KOREVAAR, D. A. et al. Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Respiratory Medicine**, London, v.3, n.4, p. 290–300, abr. 2015.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00050-8)

LEWIS, P. D. et al. Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. **BMC cancer**, London, v. 10, p. 640, 23 nov. 2010.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-640>

LEY, B.; BROWN, K. K.; COLLARD, H. R. Molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 307, n. 9, p. L681–L691, 1 nov. 2014.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00014.2014>

LOO, J. A. et al. Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 89, n. 10, p. 1016–1023, out. 2010.
<https://doi.org/10.1177/0022034510380414>

LOUGHEED, M. D. et al. Canadian Thoracic Society 2012 guideline update: diagnosis and management of asthma in preschoolers, children and adults. **Canadian Respiratory Journal**, Oakville, v.19, n.2, p. 127-64, abr. 2012.
<http://dx.doi.org/10.1155/2012/635624>

MASOLI, M. et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, Copenhagen, v. 59, n. 5, p. 469–478, maio 2004.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x>

MCCLELLAND, A.; MANKIN, M. Optical Measurements for Scientists and Engineers: **In Optical Measurements for Scientists and Engineers: A Practical Guide**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2018.
<https://doi.org/10.1017/9781316779613>

MENEGHINI, A. C. et al. Accuracy of spirometry for detection of asthma: a cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, São Paulo, v.135, n.5, p. 428–33, out. 2017.
<https://doi.org/10.1590/1516-3180.2017.0041250517>

MILLER, M. R. et al. Standardisation of spirometry. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 26, n. 2, p. 319–338, 1 ago. 2005.

MOORE, W. C. et al. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 181, n. 4, p. 315–323, 15 fev. 2010.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200906-0896OC>

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; UR REHMAN, D.I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, s/l, v.43, n.2, p. 134–79, fev.2008.
<https://doi.org/10.1080/05704920701829043>

NAVAZESH, M.; KUMAR, S. K. S.; Measuring salivary flow: challenges and opportunities. **Journal of the American Dental Association (1939)**, Chicago, v. 139 Suppl, p. 35S-40S, maio 2008.

NIE, S. et al. Multiplexed salivary protein profiling for patients with respiratory diseases using fiber-optic bundles and fluorescent antibody-based microarrays. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 85, n. 19, p. 9272–9280, 1 out. 2013.
<https://doi.org/10.1021/ac4019523>

NIE, S.; et al. An automated integrated platform for rapid and sensitive multiplexed protein profiling using human saliva samples. **Lab on a Chip**, Cambridge, v.14, n.6, p. 1087–98, mar. 2014.
<https://doi.org/10.1039/c3lc51303c>

NUNES, L. A. S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. **Biochemia Medica**, Zagreb, v. 25, n. 2, p. 177–192, 2015.
<https://doi.org/10.11613/BM.2015.018>

ORPHANOU, C-M. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. **Forensic Science International**, Lausanne, v.252, p. e10-e16, jul. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.020>

PEREIRA, C. A. C. Espirometria. Diretrizes para Testes de Função Pulmonar da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 28, p. S1–S82, 1 jan. 2002.

PFAFFE, T. et al. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. **Clinical Chemistry**, New York, v. 57, n. 5, p. 675–687, maio 2011.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>

RATHNAYAKE, N. et al. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, 24 abr. 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061356>

REDDEL, H. et al. Differences between asthma exacerbations and poor asthma control. **Lancet**, London, v. 353, n. 9150, p. 364–369, 30 jan. 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)06128-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)06128-5)

REDDEL, H. K. et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 180, n. 1, p. 59–99, 1 jul. 2009.

<https://doi.org/10.1164/rccm.200801-060ST>

RIEPPPO, L. et al. Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 20, n. 5, p. 451–459, maio 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.01.010>

SCAGLIA, E. et al. Noninvasive assessment of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C using serum Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 401, n. 9, p. 2919–2925, nov. 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5402-8>

SCHNEIDER, A.; et al. Diagnostic accuracy of spirometry in primary care. **BMC Pulmonary Medicine**, London, v.9:31, n.1, jul. 2009.

<https://doi.org/10.1186/1471-2466-9-31>

STAIB, A. et al. Disease pattern recognition testing for rheumatoid arthritis using infrared spectra of human serum. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 308, n. 1–2, p. 79–89, jun. 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00475-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00475-2)

STANISZEWSKA-SLEZAK, E.; et al. Plasma biomarkers of pulmonary hypertension identified by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. **The Analyst**. Cambridge, v.140, n.7, p. 2273–9, abr. 2015.

<https://doi.org/10.1039/c4an01864h>

STUART, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd., 2005.

SUN, X. et al. Detection of lung cancer tissue by attenuated total reflection–Fourier transform infrared spectroscopy—a pilot study of 60 samples. **Journal of Surgical Research**, New York, v. 179, n. 1, p. 33–38, jan. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.08.057>

WADSWORTH, S.; SIN, D.; DORSCHIED, D. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. **Journal of Asthma and Allergy**, London, v. 4, p. 77–86, 2011.

<https://doi.org/10.2147/JAA.S15081>

WANG, Q.; YU, Q.; LIN, Q.; DUAN, Y.; Emerging salivary biomarkers by mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.438, p.214-21, jan. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.037>

WANG, X. et al. FTIR spectroscopic comparison of serum from lung cancer patients and healthy persons. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Kidlington, v. 122, p. 193–197, mar. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.11.049>

WENZEL, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, New York, v. 18, n. 5, p. 716–725, 4 maio 2012.

<https://doi.org/10.1038/nm.2678>

WHITEMAN, S. C. et al. FTIR spectroscopic analysis of sputum: preliminary findings on a potential novel diagnostic marker for COPD. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, London, v. 2, n. 1, p. 23–31, fev. 2008.

<https://doi.org/10.1177/1753465807087972>

WHO, DIR (ED.). **World Health Organization, Diretrizes da OMS para tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia**, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/injection_safety/Phlebotomy-portuges_web.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2015

ZIMMERMANN, B. G.; PARK, N. J.; WONG, D. T. Genomic targets in saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1098, p. 184–191, mar. 2007.

<https://doi.org/10.1196/annals.1384.002>

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e Caracterização de Biomarcadores Relacionados ao Diagnóstico e Tratamento da Fibrose Pulmonar Idiopática

Pesquisador: Thulio Marquez Cunha

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 61266816.1.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.964.590

Apresentação do Projeto:

De acordo com o projeto "A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença crônica e progressiva, restrita aos pulmões, que apesar de rara é irreversível e invariavelmente fatal em poucos anos. A FPI é caracterizada principalmente por dispnéia progressiva e tosse, que evoluem com disfunção pulmonar grave e incapacitante. Apenas ocasionalmente a doença é detectada em fase assintomática, visto a grande dificuldade clínica de diagnóstico e a necessidade de centros de atendimento terciário à saúde. O diagnóstico diferencial e o acompanhamento das Doenças Pulmonares Intersticiais (DPI) crônicas, grupo que se encontra a FPI, são feitos geralmente por biópsias de tecido pulmonar, um processo laborioso e altamente invasivo, ou por imageamento pulmonar de alta qualidade, que pode identificar lesões pulmonares de difícil caracterização, até mesmo para especialistas. Além disso, existem somente dois medicamentos aprovados para o tratamento não paliativo de FPI, a Pirfenidona e o Nintedanib."

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

"Objetivo Primário: Selecionar e caracterizar biomoléculas que possam auxiliar no diagnóstico,acompanhamento e tratamento da FPI, utilizando técnicas biotecnológicas e amostras de

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.964.590

acometidos por essa patologia, no serviço de Pneumologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Objetivo Secundário: Dosar a activina A imunorreativa solúvel e seu principal receptor no sangue, saliva, lavado broncoalveolar (LBA) e biópsia transbrônquica (com indicação prévia) de pacientes com FPI, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), Asma, Pneumonia de Hipersensibilidade e DPI por colagenose; Comparar os resultados da dosagem da activina A e seu receptor na FPI e nas outras doenças pulmonares; Selecionar, através da técnica de SELEX e Phage Display, aptâmeros e peptídeos ligantes e miméticos a activina A e ao seu receptor ActRII; Avaliar a reatividade e especificidade das biomoléculas selecionadas frente a activina A purificada e amostras biológicas de pacientes diagnosticados com FPI; Avaliar a reatividade das biomoléculas selecionadas; Realizar a caracterização in silico das biomoléculas selecionadas; Verificar a eficiência de detecção das biomoléculas selecionadas frente a detecção dos níveis de activina A nos diferentes fluidos biológicos (sangue, saliva e LBA); Validar em larga escala o uso das biomoléculas selecionadas como biomarcadores para triagem; Avaliar os efeitos de citotoxicidade das biomoléculas selecionadas; Avaliar in vitro os possíveis efeitos terapêuticos e reparadores das biomoléculas selecionadas; Verificar in vivo os possíveis efeitos terapêuticos das biomoléculas selecionadas, utilizando o modelo animal de FPI induzida por bleomicina; (projeto será enviado ao Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA); Verificar a contribuição das moléculas identificadas para o diagnóstico precoce da FPI; Correlacionar as biomoléculas identificadas com os dados clínicos das pacientes e com a evolução clínica e desfecho final."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme projeto:

"RISCOS: Os riscos referentes à coleta de sangue são dor ou formação de hematoma no local da punção, que podem ser minimizados com realização de técnica adequada e pessoal qualificado, como no caso desse estudo, aonde as coletas serão realizadas por médico ou técnico qualificado. A coleta do escarro induzido será realizada através técnica que consiste na nebulização com uma solução salina hipertônica (3-5%), através de um nebulizador ultrassônico. Trata-se de um procedimento não invasivo, rápido e fácil realização e será executado por profissional tecnicamente habilitado e com a presença de médico no local.

O risco de broncoespasmo é pequeno e ocorre mais em pacientes com asma e DPOC, e pode ser evitado com tratamento com broncodilatadores prévio ao exame, conforme protocolo que será

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.964.590

seguido (SCHEICHER; TERRA FILHO; VIANNA, 2003). O LBA e a biópsia pulmonar possui vários riscos inerentes ao procedimento, mas que não serão acrescidos aos pacientes da pesquisa, uma vez que só será realizada coleta de amostras de ambos quando o paciente tiver indicação pela sua necessidade clínica. Os riscos referentes à coleta de saliva são um pequeno desconforto e enjoo devido à presença do algodão na boca para coletar a saliva. Os materiais serão coletados pelos enfermeiros e médicos do HC-UFU o que diminui o risco de incidentes durante o procedimento. Os exames clínicos, de avaliação da função pulmonar, aos quais todos os pacientes serão submetidos, são realizados rotineira e periodicamente em todos os pacientes do Ambulatório de Pneumologia, o que portanto não acrescentará nenhum dano ou sofrimento aos mesmos. Serão respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, resolução 466/12 para a pesquisa de seres humanos. A equipe executora compromete-se com o sigilo absoluto da identidade dos sujeitos da pesquisa.

BENEFÍCIOS: O benefício do estudo é a possibilidade de se detectar um marcador preciso para o diagnóstico, acompanhamento e/ou prognóstico da Fibrose Pulmonar Idiopática, e também a possibilidade desse conhecimento proporcionar novas opções terapêuticas num futuro próximo."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados de forma adequada.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.864.909, de 09 de Dezembro de 2016, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Julho de 2018.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Julho de 2019.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.964.590

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Julho de 2020.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.964.590

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_790888.pdf	05/01/2017 23:22:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura.docx	05/01/2017 23:21:33	Thulio Marquez Cunha	Aceito
Outros	relatorio.docx	05/01/2017 23:20:25	Thulio Marquez Cunha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo.docx	05/01/2017 23:15:04	Thulio Marquez Cunha	Aceito
Folha de Rosto	CEPROSTO.pdf	05/01/2017 23:14:34	Thulio Marquez Cunha	Aceito
Outros	DADOS.xlsx	07/10/2016 17:29:26	Thulio Marquez Cunha	Aceito
Outros	lattes.docx	07/10/2016 16:21:58	Thulio Marquez Cunha	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Equipe.pdf	11/09/2016 22:18:26	Thulio Marquez Cunha	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 14 de Março de 2017

Assinado por:

**Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)**

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

ANEXO 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e Caracterização de Biomarcadores Relacionados ao Diagnóstico e Tratamento de Doenças Pulmonares

Pesquisador: Thulio Marquez Cunha

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 61266816.1.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.708.746

Apresentação do Projeto:

A presente Emenda se refere ao projeto inicialmente intitulado "Desenvolvimento e caracterização de biomarcadores relacionados ao diagnóstico e tratamento da Fibrose Pulmonar Idiopática".

Objetivo da Pesquisa:

o objetivo da emenda é a alteração do título do trabalho, a inclusão de outras técnicas de análise dos materiais biológicos, inclusão de questionários de qualidade de vida, inclusão de outro grupo controle denominado grupo controle tabagista, inclusão de mais 10 pacientes em cada grupo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as solicitações de alteração foram justificadas, mantendo a proposta inicial de desenvolver biomarcadores relacionados ao diagnóstico e tratamento de doenças pulmonares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado novo termo da Instituição declarando estar ciente de suas corresponsabilidades no presente projeto de pesquisa.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.708.746

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação da emenda.

A emenda não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.708.746

enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

• Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_886217E1.pdf	09/03/2018 11:17:46		Aceito
Outros	justificativaemenda.pdf	09/03/2018 11:16:45	Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos	Aceito
Folha de Rosto	folhaemenda.pdf	09/03/2018 11:16:09	Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochuraemenda.docx	19/02/2018 10:43:55	Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termoemenda.docx	19/02/2018 10:38:36	Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoemenda.pdf	19/02/2018 10:37:40	Tatiane Martins de Lima Crosara Bastos	Aceito
Outros	DADOS.xlsx	07/10/2016 17:29:26	Thulio Marquez Cunha	Aceito
Outros	lattes.docx	07/10/2016 16:21:58	Thulio Marquez Cunha	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Equipe.pdf	11/09/2016 22:18:26	Thulio Marquez Cunha	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.708.746

UBERLANDIA, 12 de Junho de 2018

Assinado por:
Karine Rezende de Oliveira
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “Desenvolvimento e Caracterização de Biomarcadores Relacionados ao Diagnóstico e Tratamento de Doenças Pulmonares” sob a responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Victor Alexandre Felix Bastos, Tatiane Lima Crosara Bastos e Rodrigo Miquelanti.

Nesta pesquisa pretendemos buscar novos exames que possam identificar mais precocemente a Fibrose Pulmonar Idiopática e diferenciá-la de outras doenças pulmonares, caracterizando moléculas biológicas presentes nesta fibrose e diferentes na Asma, DPOC, Pneumonia intersticial crônica por colagenose e de Hipersensibilidade. Então estamos convidando pacientes com os diagnósticos citados acima para participarem do nosso estudo. Todos pacientes realizarão os mesmos procedimentos.

Será necessário realizar a coleta de dois tubos do sangue periférico (cerca de 15mL), escarro induzido e saliva. Se houver recomendação, pelo médico que te acompanha regularmente, de realização de lavado broncoalveolar (LBA) e biópsia pulmonar, serão coletadas pequenas amostras para análise, após o procedimento ser realizado pelo médico do serviço. Você poderá ser solicitado, durante o acompanhamento a colher mais de uma coleta de sangue, escarro e/ou saliva (máximo de três coletas de cada no acompanhamento).

Os riscos referentes à coleta de sangue são dor ou hematoma no local da punção, que são mínimos com realização de técnica adequada e pessoal qualificado, como no caso desse estudo. A coleta do escarro induzido é simples, não invasiva, rápida e será executada por profissional tecnicamente habilitado. O risco de broncoespasmo é pequeno e ocorre mais em pacientes com asma e DPOC, e será evitado com tratamento com broncodilatadores antes do exame. O LBA e a biópsia pulmonar possui vários riscos inerentes ao procedimento, mas que não serão acrescentados aos pacientes pela pesquisa, uma vez que só será realizada coleta de amostras se o paciente tiver indicação pela sua necessidade clínica. Os riscos referentes à coleta de saliva são um pequeno desconforto e enjoo devido à presença do algodão na boca para coletar a saliva. Os exames clínicos, de avaliação da função pulmonar são realizados na rotina em todos os pacientes do Ambulatório de Pneumologia, o que portanto não acrescentará nenhum desconforto ao participante. Sobre o risco existente de o participante ser identificado utilizaremos letras e números, diferentes do prontuário, para evitar sua identificação, na avaliação e/ou na publicação dos resultados da pesquisa. Serão respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, resolução 466/12 para a pesquisa com seres humanos.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será coletado pela pesquisadora Tatiane Bastos ou pela Equipe Médica durante o atendimento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Estas amostras serão processadas no laboratório para a seleção de moléculas-alvo a serem empregadas no diagnóstico precoce da fibrose pulmonar, e logo após serão descartadas em lixo biológico para posteriormente serem incineradas. Todo material utilizado será estéril e descartável.

O benefício em participar deste estudo consiste na contribuição para detectar a FPI de maneira precoce, rápida, segura e pouco invasiva, e direcionar novas perspectivas de prevenção e terapia da doença.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e, ainda assim, a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Victor Alexandre Felix Bastos: Universidade Federal de Uberlândia – Av. Amazonas s/n Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia – Fone: 3235-8440; ou ainda com Thulio Marquez Cunha e Tatiane Lima Crosara Bastos no telefone (34) 3218-2728. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP: 38408-100; fone: 3239-4131. O CEP é um colegiado independente criado para defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos conforme resoluções do Conselho Nacional de Saúde.

Uberlândia, ___ / ___ / ___

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

☐

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participantes “saudáveis”

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada “Desenvolvimento e Caracterização de Biomarcadores Relacionados ao Diagnóstico e Tratamento de Doenças Pulmonares” sob a responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dr. Thúlio Marquez Cunha, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Victor Alexandre Felix Bastos, Tatiane Lima Crosara Bastos e Rodrigo Miquelanti.

Nesta pesquisa pretendemos buscar novos exames que possam identificar mais precocemente a Fibrose Pulmonar Idiopática e diferenciá-la de outras doenças pulmonares, caracterizando moléculas biológicas presentes nesta fibrose e diferentes na asma, dpc, pneumonia intersticial crônica por colagenose e de hipersensibilidade, e também de pessoas saudáveis, ou seja, sem os diagnósticos citados acima. Então estamos convidando participantes saudáveis para participarem do nosso estudo.

Será necessário realizar a coleta de dois tubos do sangue periférico (cerca de 15mL) e saliva. Você poderá ser solicitado, durante o acompanhamento a colher mais de uma coleta de sangue e/ou saliva (máximo de três coletas de cada no acompanhamento).

Os riscos referentes à coleta de sangue são dor ou hematoma no local da punção, que são mínimos com realização de técnica adequada e pessoal qualificado, como no caso desse estudo. Os riscos referente à coleta de saliva são um pequeno desconforto e enjoo devido à presença do algodão na boca para coletar a saliva. Sobre o risco existente de o participante ser identificado utilizaremos letras e números, diferentes do prontuário, para evitar sua identificação, na avaliação e/ou na publicação dos resultados da pesquisa. Serão respeitadas as orientações do Ministério da Saúde do Brasil, resolução 466/12 para a pesquisa com seres humanos.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será coletado pela pesquisadora Tatiane Bastos ou pela Equipe Médica durante o atendimento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Estas amostras serão processadas no laboratório para a seleção de moléculas-alvo a serem empregadas no diagnóstico precoce da fibrose pulmonar, e logo após serão descartadas em lixo biológico para posteriormente serem incineradas. Todo material utilizado será estéril e descartável. O benefício em participar deste estudo consiste na contribuição para detectar a FPI de maneira precoce, rápida, segura e pouco invasiva, e direcionar novas perspectivas de prevenção e terapia da doença.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e, ainda assim, a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Victor Alexandre Felix Bastos: Universidade Federal de Uberlândia – Av. Amazonas s/n Bloco 2E, Campus Umuarama, Uberlândia – Fone: 3235-8440; ou ainda com Thulio Marquez Cunha e Tatiane Lima Crosara Bastos no telefone (34) 3218-2728. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP: 38408-100; fone: 3239-4131. O CEP é um colegiado independente criado para defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos conforme resoluções do Conselho Nacional de Saúde.

Uberlândia, ___/___/___

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

☐

ANEXO 4

Analyst



Analyst

**Differential Spectral Signature of Human Saliva Using
Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for Asthma
Diagnosis**

Journal:	<i>Analyst</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cunha, Thulio; Universidade Federal de Uberlândia, Pulmonary Function and Clinical Exercise Physiology Laboratory Bastos, Tatiane; Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório Função Pulmonar Sabino-Silva, Robinson; Universidade Federal de Uberlândia Goulart, Luiz Ricardo; Federal University of Uberlândia,, Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry; University of California Davis School of Medicine, Medical Microbiology and Immunology Caixeta, Douglas; Universidade Federal de Uberlândia - Campus Umuarama Cardoso, Léia; Universidade Federal de Uberlândia - Campus Umuarama Nomelini, Quintiliano; Universidade Federal de Uberlândia

SCHOLARONE™
Manuscripts