



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



MATEUS ALVES FERREIRA

**IMPLEMENTAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE
FOURIER COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL
ATENUADA (ATR-FTIR) PARA DIAGNÓSTICO
SALIVAR DE ASMA**

UBERLÂNDIA
2019

MATEUS ALVES FERREIRA

**IMPLEMENTAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE
FOURIER COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL
ATENUADA (ATR-FTIR) PARA DIAGNÓSTICO
SALIVAR DE ASMA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de
Odontologia da UFU, como requisito
parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino
da Silva

Coorientadora: Ms. Léia Cardoso de
Sousa

UBERLÂNDIA
2019

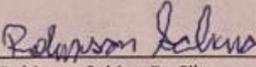
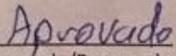
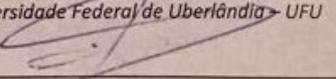
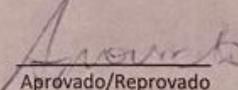
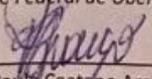
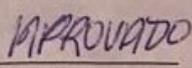
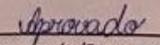


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Mateus Alves Ferreira** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia **28 de maio de 2019**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo(a) aluno(a) **Mateus Alves Ferreira**, COM O TÍTULO: **"IMPLEMENTAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR) PARA DIAGNÓSTICO SALIVAR DE ASMA"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo se encontra em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

Uberlândia, 28 de maio de 2019.

 Prof. Dr. Robinson Sabino Da Silva Universidade Federal de Uberlândia - UFU	 Aprovado/Reprovado
 Prof. Dr. Fabio Franceschini Mitri Luiz Universidade Federal de Uberlândia - UFU	 Aprovado/Reprovado
 Profª. Drª. Paula Caetano Araújo Universidade Federal de Uberlândia - UFU	 Aprovado/Reprovado
 Rafael Resende de Miranda Aluno(a) de doutorado - PPGO/UFU	 Aprovado/Reprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus , pelo dom da vida e por ter me proporcionado chegar até aqui.

Aos meus pais Valdivino e Dora Luce , pelo amor, apoio, paciência e muitas vezes se abdicarem de tanto para me proporcionar este momento.

Agradeço aos professores que sempre estiveram dispostos a ajudar, e especialmente aqueles que possuem um dom além de ensinar, o de inspirar. Agradeço por todo desenvolvimento profissional e pessoal que estes 5 anos de convívio me proporcionaram.

Agradeço um professor em especial, meu orientador Robinson, por acompanhar meu crescimento desde o início da graduação. Obrigado por sempre me ensinar, confiar, proporcionar oportunidades e pela paciência para o desenvolvimento das minhas pesquisas e deste trabalho.

Ao pessoal do grupo de pesquisa em Fisiologia Integrativa, e em especial minha coorientadora Léia, pela paciência, pelos ensinamentos e por toda orientação.

Aos meus amigos que estiveram comigo em todos os momentos, e a todos que participarão de minha formação, o meu obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
Introdução.....	8
Objetivos.....	10
Materiais e métodos.....	10
Resultados.....	13
Discussão.....	19
Conclusão.....	21
Referências Bibliográficas.....	22

IMPLEMENTAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR) PARA DIAGNÓSTICO SALIVAR DE ASMA

IMPLEMENTATION OF ATTENUATED TOTAL REFLECTION FOURIER-TRANSFORM INFRARED (ATR-FTIR) SPECTROSCOPY FOR SALIVARY DIAGNOSIS OF ASTHMA

Mateus Alves Ferreira

Léia Cardoso de Souza

Robinson Sabino da Silva

RESUMO

Asma é uma condição comum que afeta cerca de 10% da população mundial. Esta condição desenvolve sintomas que tem uma quantidade grande de diagnósticos diferenciais. O protocolo padrão-ouro para o diagnóstico da asma exige análises de espirometria que quando não acessíveis, podem levar a falhas no diagnóstico durante o atendimento de cuidados primários. ATR-FTIR é uma plataforma rápida, livre de reagentes, não destrutiva e com alta acurácia que pode analisar amostras biológicas não-invasivas como a saliva. O presente trabalho visa avaliar o perfil salivar por meio da espectroscopia ATR-FTIR para análise da composição da saliva em animais asmáticos comparado a não asmáticos buscando a implementação de diagnóstico salivar. Foram utilizados ratos Wistar machos (350g /média) que foram divididos em dois grupos: Não-Asmáticos tratados com salina (SAL – n = 7) e Asmáticos tratados com ovalbumina (OVA – n = 7). A asma foi induzida através da sensibilização por ovalbumina e hidróxido de alumínio – AL(OH)₃ (s.c.), nos dias 0, 7 e 14. Nos dias 21, 22 e 23, os animais OVA receberam desafio antigênico com ovalbumina intranasal. Após 48h do último desafio, os animais foram anestesiados para coleta salivar estimulada por pilocarpina e análise em FTIR. CEUA: 144/16 O grupo OVA apresentou alterações no pico de frequência 943cm⁻¹, apresentado na curva ROC, sensibilidade de 100% e especificidade de 71,43%. Desta forma, percebe-se que a asma pode promover alterações na composição da saliva, o que pode ser utilizado para diagnóstico salivar da asma.

Palavras-chave: Asma; Biomarcadores; Diagnóstico salivar; FTIR ;Secreção salivar;

ABSTRACT

Asthma is an extremely common condition with a global prevalence of ~ 10%. This condition develop symptoms which have a broad differential diagnosis. The gold standard protocol to diagnose asthma needs spirometrical analysis, so when it is not accessible the diagnosis are often poorly available to primary care physicians. ATR-FTIR is a rapid, free-label, non-destructive and high-accurated platform that can analyse non-invasive samples of saliva. The present work aims at the salivary profile in the ATR-FTIR spectroscopy to analyze the composition of saliva in asthmatic animals compared to non-asthmatic ones. Male Wistar rats (mean of 350g) were divided into two groups: Non-Asthmatics treated with saline (SAL - n = 7) and Asvalids treated with ovalbumin (OVA - n = 7). Asthma was induced through ovalbumine and aluminum alloxide (AL) (OH) 3 (s.c.) on days 0, 7 and 14. On days 21, 22 and 23, OVA animals were observed to be antigenic with intranasal Ovalbumin. After 48 hours from the end of the game, the animals were anesthetized to collect saliva by pilocarpine and analyzed in FTIR. CEUA: 144/16 Asthmatic animals of the OVA group presented changes in the peak frequency 943cm^{-1} , in the ROC curve with 100% and specificity of 71.43%. In this way, it is perceived that it can promote changes in saliva, which may be used to salivary diagnosis od asthma.

Keywords: Asthma; Biomarkers; Salivary diagnosis; FTIR ; Salivary secretion;

I- INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica que apresenta hiper-responsividade muco bronquiolar. A asma é manifestada clinicamente por eventos de broncoespasmo, dispneia, opressão torácica, tosse sibilos expiratórios, associados a secreção de muco (III CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA, 2002). A prevalência das doenças alérgicas aumentou muito nos últimos anos, afetando cerca de 35% da população mundial. A asma é uma das principais doenças alérgicas que afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo, sendo um problema crescente de saúde pública (PAWANKAR et al., 2011). No Brasil, a asma acomete cerca de 10% da população e é a terceira causa de internação hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS), computando 450 mil hospitalizações ao ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A asma é uma reação de hipersensibilidade do tipo I (imediate) que é mediada por imunoglobulina E. Os componentes celulares primários nesta reação de hipersensibilidade são os mastócitos ou basófilos. (ABBAS, 2008). Nesta reação, os anticorpos reagem rapidamente à presença do antígeno (alérgeno) e esta reação provoca a ativação dos mastócitos com liberação da histamina e de outras enzimas vasoativas que provocam vasodilatação e exsudação (ABBAS, 2008). A hiper-reatividade das vias aéreas é desencadeada pela contração do tecido muscular bronquiolar, o que limita a mobilização do ar nos pulmões (KILEEN; SKORA, 2013).

Asmáticos apresentam risco elevado de desenvolvimento de doenças orais em comparação indivíduos não-asmáticos. No entanto, ainda não está estabelecido se o aumento da frequência e da severidade das doenças orais nos asmáticos está mais associado à doença ou aos efeitos colaterais da farmacoterapia utilizada para seu controle (RYBERG; MOLLER; ERICSON, 1987; MILANO, 1999).

Em indivíduos asmáticos, as complicações orais mais frequentes são o aumento da frequência e da severidade de cáries, um elevado índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) e inflamação periodontal (LAURIKAINEN et al., 1998; LEANANDER-LUMIKARI et al., 1998; STENSSON et al., 2011). As complicações estão provavelmente relacionadas a diminuição do fluxo salivar e alteração de componentes salivares que podem comprometer a proteção na mucosa oral e a ação antimicrobiana da saliva (AMEROGEN; VEERMAN, 2002). Apesar disto, muito pouco se conhece sobre a caracterização dos componentes salivares em modelos de asma sem a associação de fármacos. A utilização da saliva como fluido diagnóstico, é uma alternativa, uma vez que ela pode indicar alterações sistêmicas, sendo um substituto do sangue em testes laboratoriais para diversas patologias (RATHNAYAKE et al., 2013). A saliva

é formada principalmente pelas glândulas salivares e é considerada um fluido fundamental para a manutenção da saúde oral. A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo (SNA), por um arco reflexo formado pela via aferente (estímulo mecânico da mastigação e químico da gustação e olfação) e eferente (simpático e parassimpático), além disso, este arco reflexo também pode receber atuação do sistema nervoso central (PEDERSEN et al., 2002).

Os diagnósticos salivares são atualmente uma ciência sofisticada que pode ser usada para um grande número de diagnósticos moleculares, agora reconhecidos com papel central em áreas básicas, biomédicas, translacionais e clínicas. O diagnóstico salivar pode detectar centenas de biomarcadores salivares expressos em escalas micromolar, nanomolar, picomolar e femtomolar (MALON et al, 2014). A reflexão total atenuada (ATR) é uma técnica de amostragem usada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho que permite que as amostras sejam examinadas de forma rápida, com alta sensibilidade e com análise de baixo custo pois não utiliza reagentes (PERKIN et al,2005). Desta forma, para fomentar a utilização clínica da saliva como fluido diagnóstico e de monitoramento de asma é necessário ampliar o entendimento da composição salivar e do fluxo de saliva em modelos animais de asma. A descoberta de biomarcadores salivares para desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica não-invasiva e sem utilização de reagentes para detecção da asma nos permitirá a criação de novas estratégias para o desenvolvimento de biossensores para screening e diagnóstico da asma (MALON et al, 2014).

II- OBJETIVO

Na busca por uma estratégia para a utilização da saliva como fluido diagnóstico para asma, o objetivo deste estudo foi identificar potenciais modos vibracionais da saliva que possam ser utilizados como biomarcadores espectrais para discriminar animais asmáticos de seus controles.

Utilizando animais controles e asmáticos propomos os seguintes objetivos específicos:

- Mensurar o fluxo salivar sob estímulo parassimpático de pilocarpina;
- Avaliar a assinatura espectral e a capacidade diagnóstica dos componentes moleculares da saliva por meio de espectroscopia FTIR.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o protocolo de número 028/2017.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos com peso em média de 350g, obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram acondicionados no Biotério da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) nas seguintes condições: Ciclo de 12/12 horas de iluminação (claro/escuro), sob temperatura ambiente 23±2 °C e com oferta plena de água e ração para estes roedores. Assim, foram estudados os seguintes grupos de animais (n=7/grupo):

- a) **Não-asmáticos desafiados com salina (Controle):** ratos sensibilizados com veículo (salina 0,9%) ;
- b) **Asmáticos desafiados com ovalbumina (OVA):** ratos sensibilizados com ovalbumina.

Indução da Asma

A indução da asma foi feita utilizando o modelo de sensibilização ativa através da injeção subcutânea (s.c.) de uma mistura contendo 1000 µg/Kg de ovalbumina (OVA) e 50 mg/Kg de Al(OH)₃ nos dias 0, 7 e 14. Nos dias 21, 22 e 23, os animais sensibilizados, e devidamente anestesiados com ketamina e xilazina, foram desafiados com 200 µg/Kg de OVA diluídos em 50 µl salina (0,9%) pela via intranasal (i.n.) até sua aspiração completa. Após 48h do último desafio, foi realizada a coleta das amostras.

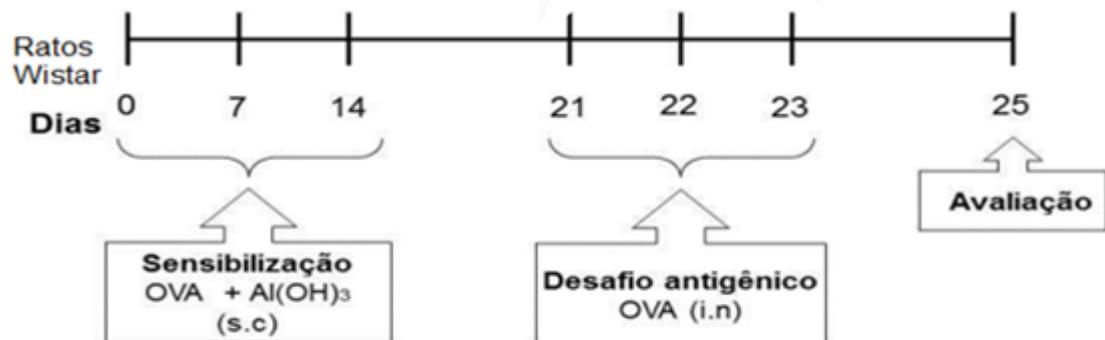


Figura 1. Esquema ilustrativo do modelo de asma alérgica induzida por OVA.

Fluxo salivar basal sob estímulo de pilocarpina

Os ratos foram anestesiados intraperitonealmente (ketamina e xilasina 90 mg/kg e 10mg kg, respectivamente) e colocados sobre uma mesa cirúrgica mantida em 36,5°C. Em seguida, os animais receberam uma dose de pilocarpina (2mg kg i.p.). A saliva foi coletada diretamente da cavidade oral do animal durante 7 minutos após o início da sua secreção. O volume de saliva foi calculado considerando a diferença de peso de “ependorfs” antes e após a coleta da saliva. A saliva coletada foi armazenada em freezer a -80°C para avaliação de uma série de biomarcadores salivares (TAKAI et al,1983 ; SABINO SILVA,R et al,2013). Após a morte do

animal buscando aplicar o programa 3Rs, foi realizada a remoção do pulmão para caracterizar a presença de asma pela técnica convencional de coloração por Hematoxilina e Eosina.

Avaliações de Componentes Salivares por meio de Espectroscopia FTIR

A composição molecular da saliva foi analisada em um sistema de Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR/ FTIR Vertex 70; Bruker, Ettlingen, Alemanha) sob faixa espectral de 1800 a 400 cm^{-1} . Para esta análise, dois microlitros de saliva foram inseridos diretamente no cristal e em seguida foi realizada a secagem da amostra utilizando um jato de ar atmosférico comprimido durante 3 minutos. Todo o procedimento de aquisição de dados foi realizado em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade controlada. O procedimento de aquisição dos espectros realizou 32 escaneamentos com uma resolução de 4 cm^{-1} . Buscando garantir a qualidade do espectro em relação a possível variação de CO_2 atmosférico e umidade entre as diferentes análises, foi realizado captação e correção de espectros de referência (background) em todas as amostras utilizando sistema Opus 6.5 (Bruker, Ettlingen, Germany). (KHAUSTOVA et al., 2010). Os dados foram coletados, armazenados e transformados em espectros com auxílio do software ORIGIN VERSÃO 9.1 (ThermoNicolet Inc.).

Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Estes foram comparados através de análise de variância test-t não-pareado. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa computacional GraphPadPrism®, v. 3,02 (GraphPad, EUA). O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descritivo de $p < 0,05$).

IV- RESULTADOS

1. Caracterização da asma

A análise histopatológica demonstrou ductos e acinos preservados e sem alterações inflamatórias nos animais controles. Os animais asmáticos (OVA) apresentaram presença de infiltrado inflamatório peribronquiolar e presença de infiltrado inflamatório alveolar intensos, característicos deste clássico modelo animal de asma que mimetiza a asma em humanos.

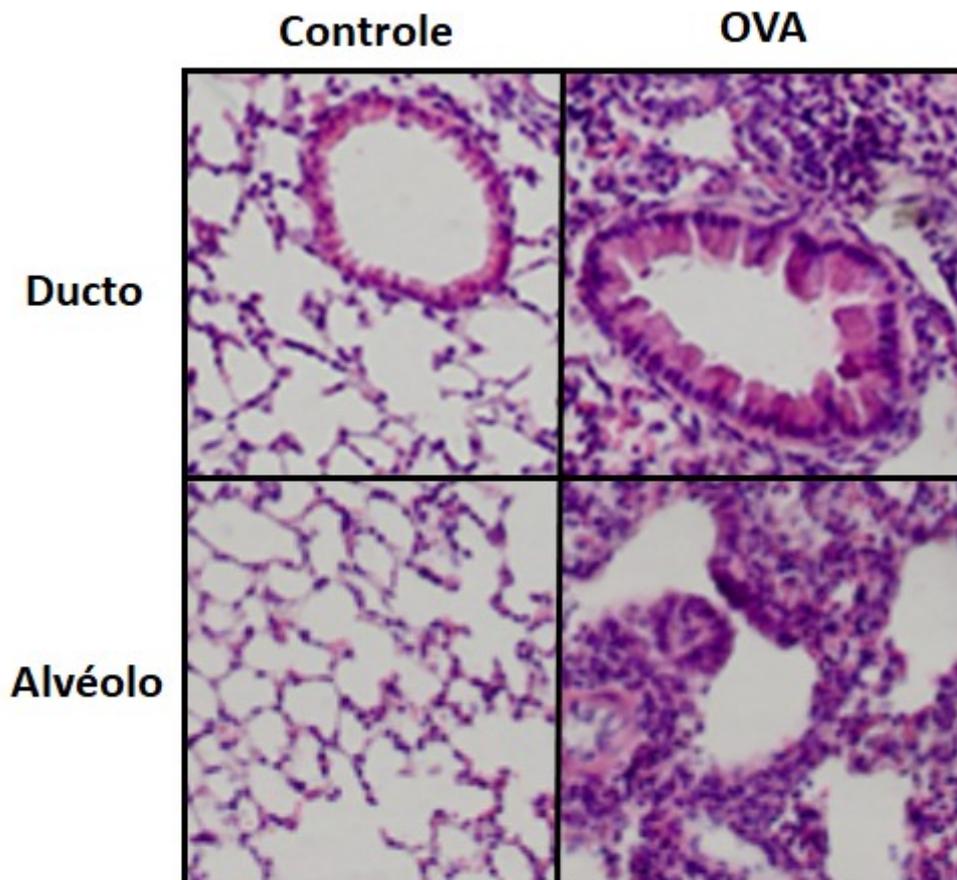


Figura 2. Análise histológica de pulmão dos animais controles e asmáticos (OVA) através da técnica de Hematoxilina-Eosina.

2. Pesos das glândulas

O peso das glândulas submandibular, sublingual e parótida foram similares ($p > 0,05$) em animais controle e OVA.

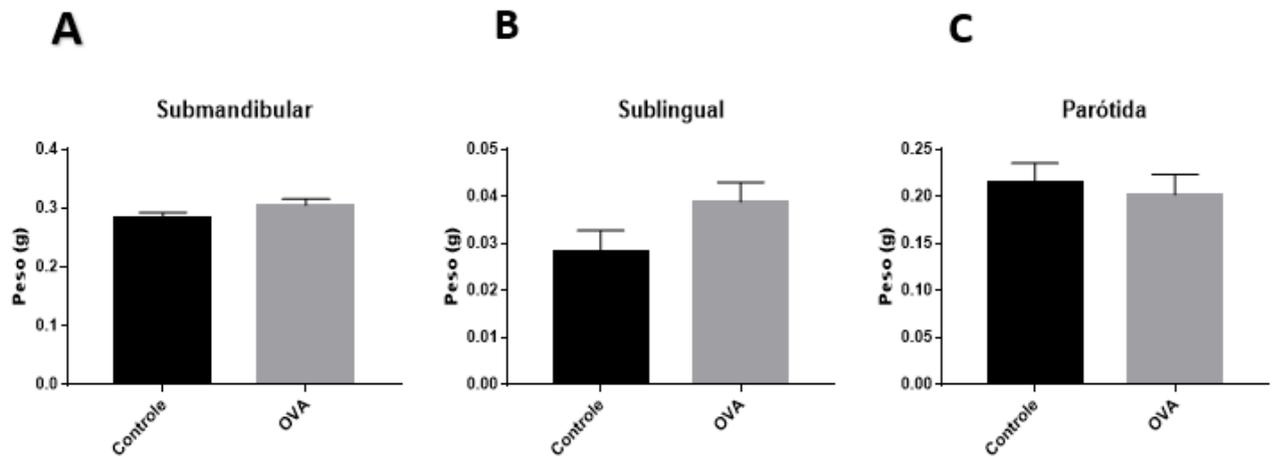


Figura 3. Peso das glândulas salivares submandibular, sublingual e parótida de animais controles e OVA.

3. Volume salivar sobre estímulo de pilocarpina

A secreção salivar estimulada por estímulo parassimpático foi similar ($p > 0,05$) em animais controle e OVA (Figura 4).

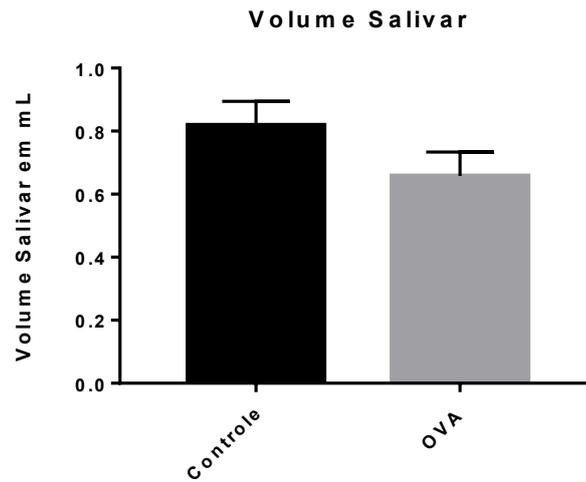


Figura 4. A secreção salivar estimulada por estímulo parassimpático foi similar ($p > 0,05$) em animais controle e OVA.

4. Perfil molecular dos componentes salivares

A assinatura digital espectral por meio espectroscopia FTIR da saliva de a animais controles e OVA está demonstrada na figura 5. Ao todo foram identificados 9 modos vibracionais tanto em controles como animais OVA.

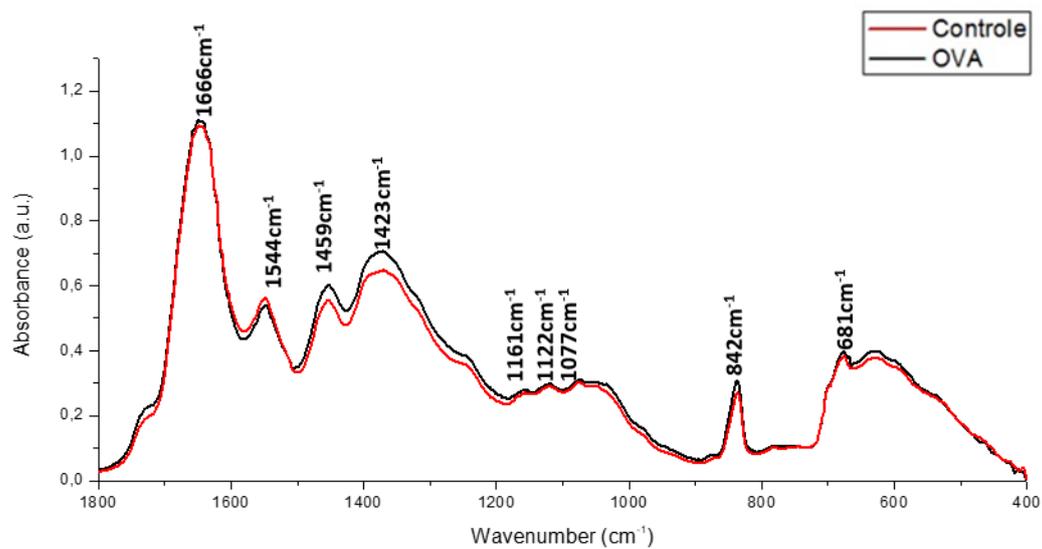


Figura 5. Espectro médio de infravermelho FTIR (1800-400cm⁻¹) representando o perfil salivar em animais controles e OVA.

A análise da figura 6 indica que os componentes espectrais da saliva foram similares ($p > 0,05$) em animais controles e OVA.

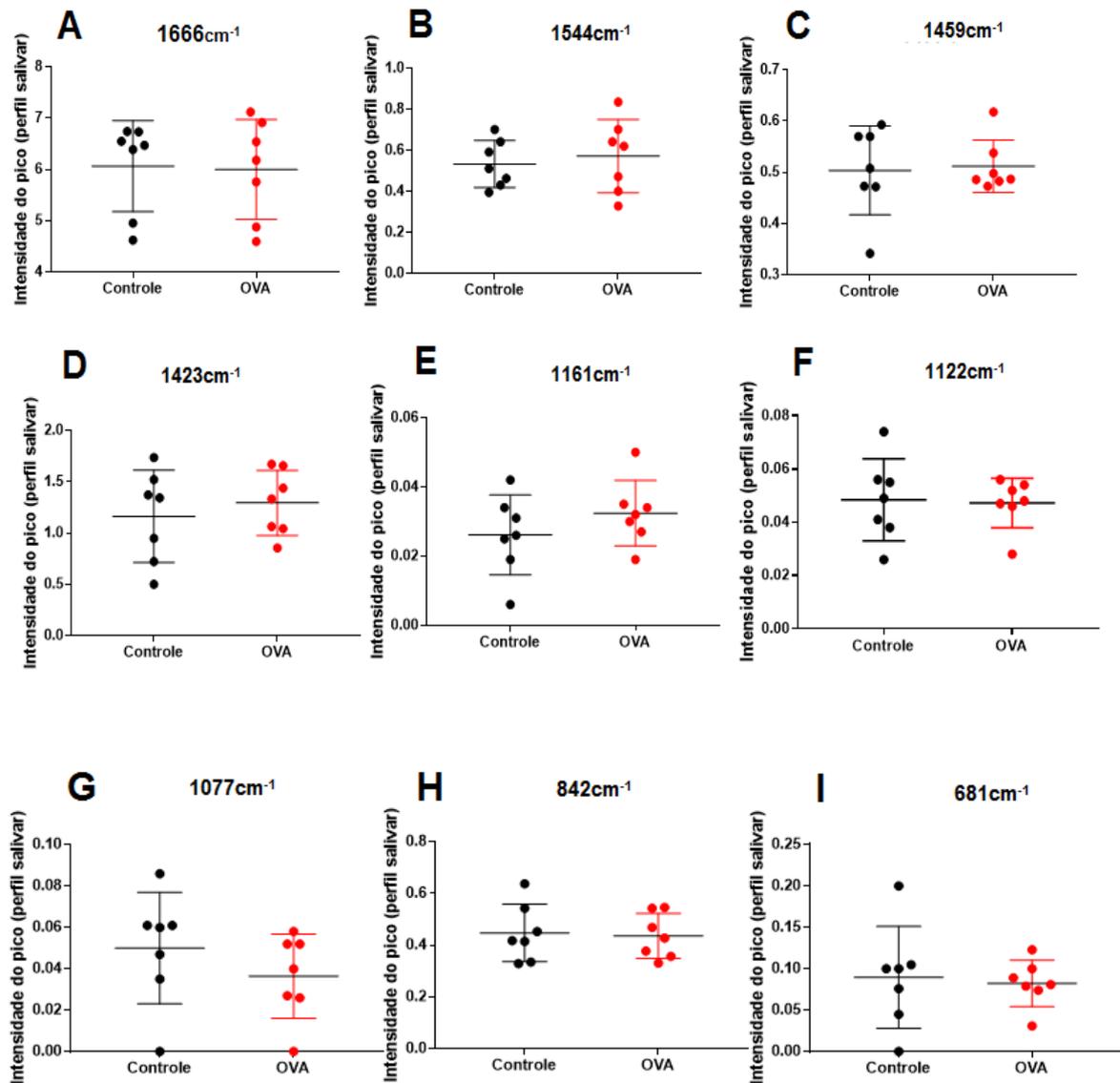


Figura 6. Área das bandas do espectro FTIR ($1800\text{-}400\text{cm}^{-1}$) da saliva total de ratos não asmáticos (Controle) e asmáticos (OVA). Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

Com auxílio do software ORIGIN 9.1, foi realizada a representação média da segunda derivada do espectro ATR-FTIR em animais controles e asmáticos (Figura 7A). Após a análise estatística utilizando a segunda derivada observou-se diferença estatística na região vibracional 943cm^{-1} (figura 7B-C). Foi realizada análise de curva ROC e o gráfico foi demonstrado na figura 7D. A curva demonstrou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 71,43% no diagnóstico de animais controle e asmáticos (OVA).

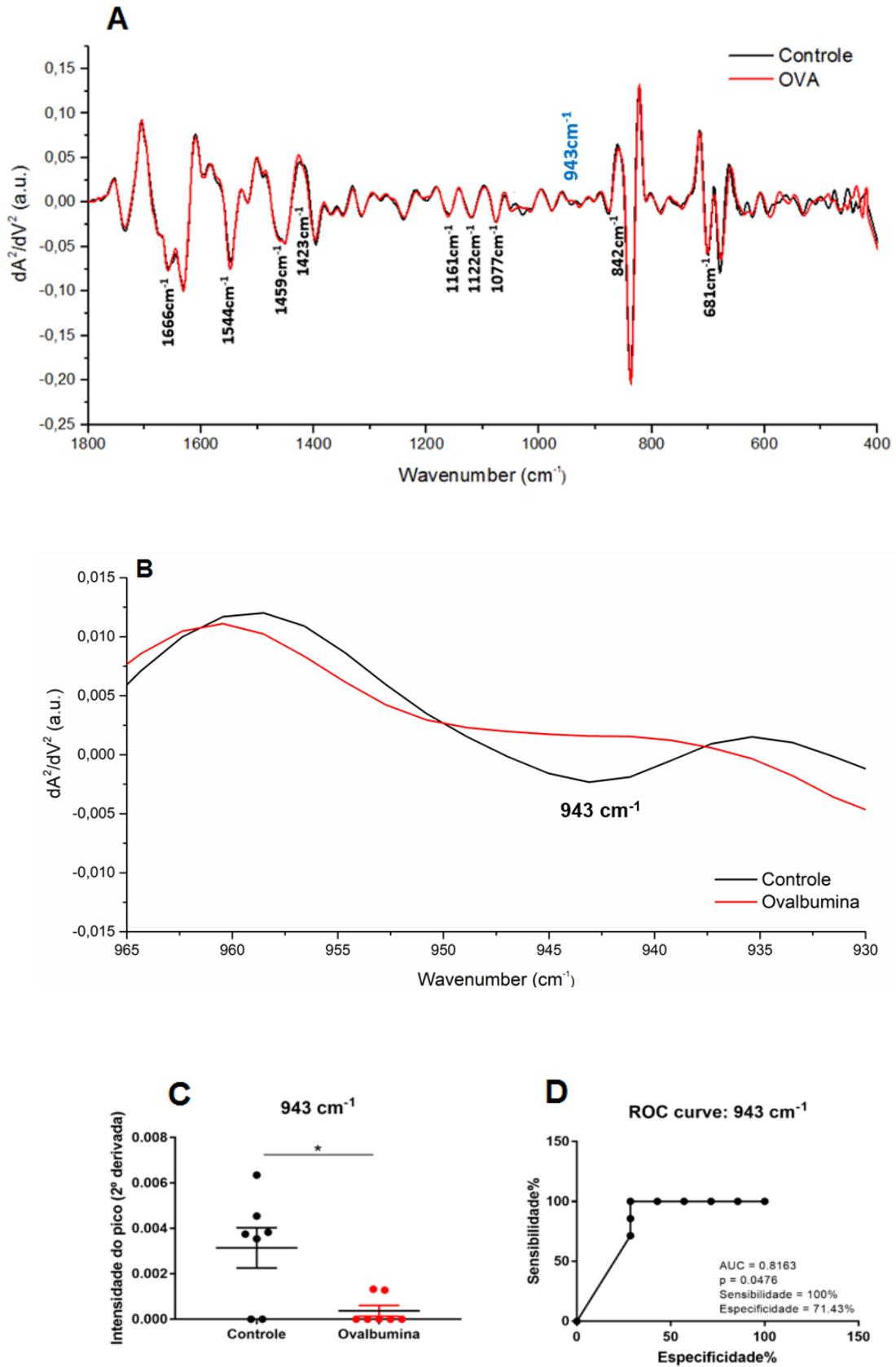


Figura 7. Segunda derivada das áreas das bandas do espectro FTIR (1800-400 cm^{-1})

V- DISCUSSÃO

O presente trabalho, em busca do aperfeiçoamento de novos métodos de diagnóstico pela saliva, demonstrou que este fluido biológico apresenta alto potencial para ser aplicado no diagnóstico. Após análise em espectroscopia ATR-FTIR foi estabelecido que o modo vibracional 943 cm^{-1} é capaz de discriminar amostras de saliva de animais asmáticos em comparação ao controle. Até o momento, acreditamos que o presente trabalho serve como prova-de-conceito para a utilização da espectroscopia ATR-FTIR para o diagnóstico salivar da asma.

É importante destacar que modelos animais de asma podem mimetizar a patofisiologia da asma humana. Os modelos animais mais clássicos utilizam uma fase de sensibilização e outra de desafio. O modelo mais amplamente aceito é o modelo de asma induzido por ovalbumina, no entanto, outros alérgenos, como ácaros, também podem ser utilizados (AUN, MARCELO VIVOLO et al, 2015).

Alguns estudos clínicos e epidemiológicos têm evidenciado associação entre a microbiota bucal e a patogênese das doenças respiratórias, como a asma (BÁGYI et al.2009; GOMES FILHO et al., 2010; GOMES FILHO et al., 2014; VARGAS et al.,2015). Nós acreditamos que a alteração da microbiota bucal pode estar associada com alteração em componentes salivares ou com possíveis alterações da secreção salivar não-estimulada que não foram avaliadas neste trabalho.

Quando agonistas β -adrenérgicos tipo 2 são usados por um longo período de tempo é frequente a descrição de diminuição da secreção salivar. Adicionalmente foi descrito aumento no número de cáries, o que foi relacionado com aumento na quantidade de *Streptococcus mutans* e colônias de Lactobacilos. Adicionalmente, foram descritas prevalência aumentada de candidíase, úlceras, doenças periodontais e alterações das papilas gustativas nesta população(ALZAKERKHALIFA et al , 2014).

Destaca-se que atualmente os pacientes que realizam teste espirométrico de função respiratória utilizam agonistas β -adrenérgicos tipo 2 para promover broncodilatação durante seu exame. Assim, apesar da espirometria não ser um exame invasivo, ela necessita da administração de um fármaco com potencial de efeitos colaterais em diversos órgãos do corpo, como o coração. Os dados deste trabalho indicam que apesar de uma normalidade na quantidade de tecido glandular e no fluxo salivar, a saliva tem potencial aplicação para desenvolvimento de novas plataformas de diagnóstico. A saliva pode ser coletada de forma simples com

facilidades para seu armazenamento, alta capacidade de não aumentar a ansiedade dos pacientes em comparação ao sangue, não ser um fluido que exige coletas invasivas ou administração de fármacos e por possuir alta capacidade de mensurar componentes específicos que refletem as condições fisiológicas do indivíduo. (BOSSOLA et al., 2012; KAUFMAN et al., 2002; KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017; LEE; WONG, 2009; MARON, 2017).

A identificação da variação da intensidade do sinal do FTIR no modo vibracional 943cm^{-1} é uma prova de conceito que de que um modelo animal de asma relacionado com ovalbumina e hidróxido de alumínio pode ser diagnosticado por esta plataforma molecular não invasiva. O modo vibracional 943 cm^{-1} devido a sua baixa expressão, não é um modo vibracional destacado nas análises salivares por ATR-FTIR. Acreditamos que este componente esteja afetado por meio da inibição de sua liberação por uma citocina inflamatória presente na glândula salivar devido à asma. Nesta região foram descritas vibrações simétricas de C-O relacionado com presença de carboidratos associados a proteínas e/ou lipídeos (MISTEK et al, 2018).

VI- CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados constataram que animais tratados com ovalbumina apresentaram níveis moleculares reduzidos do modo vibracional 943cm^{-1} em comparação com animais controles. Isto permitiu uma análise com sensibilidade de 100% e especificidade de 71,43%. Desta forma, percebe-se que a asma pode promover alterações na composição da saliva, o que pode ser utilizado para diagnóstico espectral da asma pela saliva.

VII- REFERÊNCIAS

- ABBAS, AK. *Imunologia celular e molecular*. 6ª edição – Rio de Janeiro:Elsevier, 2008; 267-302.
- CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA – DOENÇAS RESPIRATÓRIAS CRÔNICAS. Ministério da Saúde. Brasília – DF, 2010.
- KILLEEN, K; SKORA, E. Pathophysiology, Diagnosis, and Clinical Assessment of Asthma in the Adult. *NursClin N Am*, v.48, p. 11-23, 2013.
- LENANDER-LUMIKARI, M.; LAURIKAINEN, K.; KUUSISTO, P; VILJA, P. Stimulated salivary flow rate and composition in asthmatic and non-asthmatic adults. *Arch Oral Biol*. v.43, n.2, p.151-156, 1998.
- MALON R.S., SADIR S., BALAKRISHNAN M., CÔRCOLES EP. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:962903.
- MILANO, M. Increased risk for dental caries in asthmatic children. *Tex. Dent. J*.v. 116, p. 35-42, 1999.
- PAWANKAR, R. et al. State of World Allergy Report 2011: Allergy and Chronic Respiratory Diseases. *WAO Journal*, p.S4-S17, Jun. 2011.
- RYBERG, M; MOLLER, C; ERICSON, T. Effect of B2- adrenoceptor agonist on saliva proteins and dental caries in asthmatic children. *J. Dent. Res*. v.66, p.1404-6, 1987.
- STEINBACHER, A.V.N.; VEERMAN, E.C.I. Saliva – the Defender of the Oral Cavity. *Oral Diseases*.v.8, n.2, p. 12-22, 2002.
- TAKAI N, YOSHIDA Y, KAKUDO Y, Secretion and re-absorption of glucose in rat submandibular and sublingual saliva. *J Dent Res*. 1983.
- SABINO-SILVA R. et al. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. *Diabetol Metab Syndr*, v. 24; 5, n. 1, p. 64, Oct 2013.
- MISTEK, EWELINA; K, IGOR; LEDNEV. FT-IR Spectroscopy for Identification of Biological Stains for Forensic Purposes. 2018.
- ALZAKERKHALIFA, Mohie Aldeen Abd et al. Salivary composition and dental caries among children controlled asthmatics. 2014.
- LENANDER-LUMIKARI, M.; LAURIKAINEN, K.; KUUSISTO, P; VILJA, P. Stimulated salivary flow rate and composition in asthmatic and non-asthmatic adults. *Arch Oral Biol*. v.43, n.2, p.151-156, 1998.

- RATHNAYAKE, N. et al. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e61356, 2013. ISSN 1932-6203.
- PEDERSEN, A. M. et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis*, v. 8, n. 3, p. 117-29, May 2002.
- PERKINELMER. FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR) PerkinElmer Life and Analytical Sciences
- KHAUSTOVA, S. et al. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst*, v. 135, n. 12, p. 3183-92, Dec 2010. ISSN 0003-2654.
- AUN, MARCELO VIVOLO et al. Sensibilização por via subcutânea é superior à intraperitoneal na indução de asma por ácaro em modelo murino. 2015.
- BÁGYI K, HACZKU A, MÁRTON I, SZABÓ J, GÁSPÁR A, ANDRÁSI M et al. Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery. *BMC Infect Dis* 2009; 9(104): 1-10.
- GOMES FILHO IS, PASSOS JS, CRUZ SS. Respiratory disease and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol* 2010; 2(5811): 1-6.
- GOMES FILHO IS, MARQUES KR, CRUZ SS, SOARES JSP, TRINDADE SC, MACHADO AS et al. Does periodontal infection have an effect on severe asthma in adults? *J Periodontol* 2014; 85(6): 179-187
- VARGAS MH, MACEDO-SÁNCHEZ F, SOLÍS-TORRES C, RUBIO-MONTEVERDE H, FURUYA ME. Oral hygiene and dental status as factors related to asthma in high school and college students. *J Asthma* 2015; 52(4):376-381.
- BOSSOLA M.; TAZZA L. Xerostomia in patients on chronic hemodialysis. *NatRev Nephrol*, v. 8, n. 3, p. 176-82, Jan 2012.
- KAUFMAN K.; LAMSTER I. B. The diagnostic applications of saliva: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 12, n. 2, p. 197-212, 2002.
- KACZOR-URBANOWICZ, K. E. et al. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Experimental Biology and Medicine*, v. 242, n. 5, p. 459–472, 2017.
- LEE, Y. H.; WONG, D. T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, v. 22, n. 4, p. 241–248, 2009.
- MARON, J. L. Salivary Diagnostics in Pediatrics: Applicability, Translatability, and Limitations. *Front Public Health*, v. 5, n. April, p. 1–8, 2017.