

Fernanda Bacchin

Espectroscopia Molecular Salivar: uma ferramenta de diagnóstico *label free* e não invasiva para Apneia Obstrutiva do Sono

Salivary Molecular Spectroscopy: a label free and non-invasive diagnostic tool for Obstructive Sleep Apnea

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2020

Fernanda Bacchin

Espectroscopia Molecular Salivar: uma ferramenta de diagnóstico *label free* e não invasiva para Apneia Obstrutiva do Sono

Salivary Molecular Spectroscopy: a label free and non-invasive diagnostic tool for Obstructive Sleep Apnea

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Simamoto Júnior

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Prof. Paulo César Simamoto Júnior
Profa. Dra. Morgana Guilherme de Castro
Profa. Dra. Thays Crosara Abrahão Cunha

Uberlândia, 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, nº 367, PPGO				
Data:	Doze de fevereiro de dois mil e vinte	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	11:15
Matrícula do Discente:	11812ODO006				
Nome do Discente:	Fernanda Bacchin				
Título do Trabalho:	Salivary molecular spectroscopy: a label-free and non-invasive diagnostic tool for Obstructive Sleep Apnea				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Tratamento das Deformidades e dor Oro-facial e das disfunções temporomandibulares				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Tratamento das Deformidades e dor Oro-facial e das disfunções temporomandibulares				

Reuniu-se no Anfiteatro/Sala 31 do Bloco 4L - Anexo A, Campus Umarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, assim composta: Professores Doutores: Morgana Guilherme de Castro (UFU); Thays Crosara Abrahão Cunha (Faculdade de Sete Lagoas); Paulo César Simamoto Junior (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Paulo César Simamoto Junior, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Cezar Simamoto Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/02/2020, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Morgana Guilherme de Castro, Professor(a) do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 12/02/2020, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thays Crosara Abrahão Cunha, Usuário Externo**, em 12/02/2020, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1844296** e o código CRC **89D153BC**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B116 2020	<p>Bacchin, Fernanda, 1976- Salivary molecular spectroscopy: a label-free and non-invasive diagnostic tool for Obstructive Sleep Apnea [recurso eletrônico] / Fernanda Bacchin. - 2020.</p> <p>Orientadora: Paulo César Simamoto Júnior. Coorientadora: Thays Crosara Abrahão Cunha. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.146 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Odontologia. I. Simamoto Júnior, Paulo César ,1977-, (Orient.). II. Cunha, Thays Crosara Abrahão,1978-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.314</p>
--------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal de Uberlândia -
UFU

DEDICATÓRIA

Este trabalho eu dedico...

A Deus, por ter me concebido o dom da vida e de ser dentista, com todas as condições de desfrutá-las e de poder ajudar os que necessitam.

A meu marido Ronaldo Coletto, meu companheiro incondicional, pela paciência e pela importante contribuição na execução deste trabalho. Meu obrigada sempre! Sem seu apoio a concretização desse sonho não seria possível. Meu eterno Amor.

A todos os professores, que conseguem transmitir seus conhecimentos e fazer um mundo melhor.

Aos meus pais, Maria Inês e Márcio pela educação, ensinamentos e valores que me foram passados, sem os quais não chegaria até aqui. Minha mãe, por não me deixar desistir em muitos momentos, e meu pai, por me incentivar e me ajudar por muitas vezes ativamente em todo esse processo.

Aos meus irmãos, Daniel, Julieta e Clara pela amizade e companheirismo, sempre comemorando nossas conquistas, mesmo estando distantes.

Aos meus avós Julieta e Arnaldo que sempre me apoiaram e incentivaram, e vibram a cada conquista profissional alcançada. Vocês fazem parte dessa vitória.

Aos meus sogros, cunhados e sobrinhos por entenderem minha ausência e comemorarem minhas conquistas.

Aos meus sócios e parceiros de trabalho da clínica CODE, em especial a Fabiana Teodoro, meu muito obrigada pelo incentivo e paciência...

Às queridas Cristianne Pacheco e Maria Aparecida Campoli, eterno agradecimento por me introduzirem essa vontade insaciável pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo César Simamoto Júnior, que me deu a oportunidade de realizar o sonho do mestrado! Por ter acreditado em mim e ter me apresentado um novo desafio diante de um projeto tão inovador. Muito obrigada por tanta paciência e amizade. Foram dois anos de muito aprendizado e crescimento.

À minha coorientadora Profa. Dra. Thays Crosara Abrahão Cunha, por me apresentar os ensinamentos na área de apneia, por toda a paciência, carinho, atenção e disponibilidade de sempre. Tê-la como coorientadora foi um privilégio, por poder compartilhar dos seus conhecimentos e acima de tudo pela amizade. Obrigada por ser uma pessoa tão querida, competente e por termos realizado esse trabalho de forma tão harmoniosa.

Ao Prof.Dr. Robinson Sabino e aos pós-graduandos Léia, Douglas, Stephanie e Emília, por abrirem as portas dos laboratórios, pelo incentivo, esforço e pelas preciosas informações e contribuições para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Morgana Guilherme de Castro pela amizade e pelo apoio, traduzidos na confiança firmada na parceria de apresentações de trabalhos e aulas. O seu exemplo é muito valioso na minha formação.

Aos amigos e companheiros de projeto Maria Cecília Monteiro Guimarães, Ana Júlia Lopes, Diego Nascimento, sem vocês seria impossível a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

Aos técnicos dos laboratórios (John, Bruno - CPBio) e funcionários da Universidade Federal de Uberlândia (Brenda, Laís e Graça) que sempre me atenderam com muito carinho!

A todos os docentes da Pós-graduação de odontologia e a todos os meus colegas do PPGOUFU.

Aos pacientes apneicos e seus responsáveis, por se permitirem fazer parte deste projeto de pesquisa, pela paciência em responder aos questionários e a realizar cada exame. Meu eterno agradecimento!!

Aos pacientes saudáveis e seus responsáveis, que participaram deste trabalho, colhendo saliva e respondendo questionários, agradeço a disponibilidade! A participação de vocês foi fundamental!

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE	11
ABSTRACT / KEY WORDS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 CAPÍTULO 1	17
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	43

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar se biomarcadores específicos podem ser identificados na saliva de crianças com AOS, e se os modos vibracionais expressos diferencialmente, podem ser preditores de diagnóstico para AOS. Atualmente, o diagnóstico da AOS é realizado através do PSG, que é um exame caro, difícil de realizar e não é uma realidade em um sistema público de saúde. Conseqüentemente, a busca por um método de diagnóstico mais barato, mais acessível e que seja específico da AOS é de grande interesse. Para isso, este estudo investigou a aplicação potencial da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR) para discriminar crianças com AOS dos controles usando saliva. Foi coletada saliva de 40 crianças, sendo 26 crianças com AOS e 14 controles saudáveis (sem AOS). Os exames clínicos e físicos e os questionários OSA-18 e SBQ foram aplicados a todas as crianças. Apenas pacientes com AOS foram submetidos à polissonografia e todos tiveram suas amostras de saliva estimuladas coletadas após o sono noturno. O perfil salivar foi analisado por espectroscopia ATR-FTIR e os modos vibracionais foram avaliados quanto à capacidade diagnóstica pela curva ROC. O espectro infravermelho salivar de crianças não AOS e AOS apresentou vários modos vibracionais únicos e, destes, cinco modos vibracionais em 2962, 1670, 1638, 1548 e 1075 cm^{-1} foram pré-validados como biomarcadores de diagnóstico em potencial pela análise de curva ROC com AUC superior a 0,8 na análise da curva ROC. Dessa forma conclui-se que os biomarcadores espectrais salivares descobertos usando análise univariada podem fornecer uma nova alternativa robusta para o monitoramento da AOS, usando uma tecnologia verde e não invasiva.

Key Words: ATR-FTIR, Biomarcadores, Crianças, Diagnóstico, AOS, Saliva,

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether specific biomarkers can be identified in the saliva of children with OSA, and whether the vibrational modes expressed differentially, can be predictors of diagnosis for OSA. Currently, the diagnosis of OSA is performed through PSG, which is an expensive test, difficult to perform and is not a reality in a public health system. Consequently, the search for a cheaper, more accessible and OSA specific diagnostic method is of great interest. To this end, this study investigated the potential application of Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (ATR-FTIR) to discriminate children with OSA from paired controls using saliva. Saliva was collected from 40 children, 26 children with OSA and 14 healthy controls matched (without OSA). Clinical and physical examinations and the OSA-18 and SBQ questionnaires were applied to all 40 children. Only patients with OSA underwent polysomnography and all had their stimulated saliva samples collected after night sleep. The salivary profile was analysed by ATR-FTIR spectroscopy and the vibrational modes were evaluated for diagnostic capacity using the ROC curve. The salivary infrared spectrum of Non-OSA and OSA children showed several unique vibrational modes and, of these, five vibrational modes in 2962, 1670, 1638, 1548 and 1075 cm^{-1} were pre-validated as potential diagnostic biomarkers by the analysis of the ROC curve with AUC greater than 0.8 in the analysis of the ROC curve. Thus, it is concluded that the salivary spectral biomarkers discovered using univariate analysis can provide a new robust alternative for OSA monitoring, using green and non-invasive technology.

Key Words: ATR-FTIR, Biomarkers, Children, Diagnosis, OSA, Saliva,

1.INTRODUÇÃO

Privação de sono é um problema generalizado na sociedade de hoje, que pode levar à diminuição do desempenho cognitivo, aumento da sonolência diurna e redução da produtividade, trazendo para seus portadores sérios problemas intersociais. Além disso, aumenta a suscetibilidade a problemas de saúde, incluindo déficits cardiovasculares, diminuição na imunidade, entre outros [1].

Apneia obstrutiva do sono (AOS) é uma potencial causa de morbidade em adultos (30%) e crianças (2% a 7%). É caracterizada pela obstrução total (apneia) ou parcial (hipopneia) das vias aéreas superiores, o que interrompe os padrões normais de ventilação durante o sono, levando a micro despertares noturnos [2]. Hipóxia intermitente e fragmentação do sono frequentes, desencadeiam stress, inclusive nos níveis celulares, prejudicando assim a homeostasia do organismo [3]. A AOS pode afetar crianças de todas as idades, com uma maior prevalência em pré-escolares, não reportando diferença entre gêneros. Apresenta em seus portadores alterações comportamentais, pouco rendimento escolar, hiperatividade, enurese noturna, terror noturno, depressão, insônia, problemas psicológicos e sonolência excessiva diurna e, comorbidades tais como déficits de aprendizado, disfunções metabólicas e endoteliais [1]. Sendo, portanto, considerada um problema de saúde pública [4].

A investigação clínica preditora para diagnóstico de AOS se baseia inicialmente na história do paciente, na avaliação clínica e no exame físico, mas a avaliação polissonográfica de laboratório durante noite completa é o método considerado como padrão ouro de diagnóstico para AOS [5]. Porém, na prática clínica é pouco utilizada pois, trata-se de um exame caro, de difícil execução, existem poucos leitos disponíveis e não é uma realidade nos sistemas públicos de saúde.[6]

Este fato estimulou, então, a busca por métodos diagnósticos alternativos. Recentemente, as proteínas salivares ganharam interesse como método diagnóstico e para avaliação de doenças [7]. É facilmente coletada e

estocada, e é ideal por conter biomarcadores solúveis específicos em sua composição. [8]

Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é um dos métodos de análise para a determinação da estrutura de pequenas moléculas, que utiliza a interação da radiação eletromagnética com a matéria com a finalidade de obter informações físicas e químicas de um determinado material ou amostra biológica [9]. Os modos vibracionais de IR de amostras biológicas, como a saliva, podem ser consideradas impressões digitais bioquímicas que se correlacionam diretamente com a presença ou ausência de doenças além disso, fornecem a base para a determinação quantitativa de várias análises de interesse diagnóstico [10,11].

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi investigar se biomarcadores espectrais específicos podem ser identificados na saliva de crianças diagnosticadas com AOS, e se os modos vibracionais expressos diferencialmente podem ser preditores de diagnóstico para AOS. Para isso foram avaliados quantitativamente os perfis dos modos vibracionais salivares de crianças com AOS leve, moderada e grave, e de crianças sem AOS, e confrontados com PSG das crianças doentes.

REFERÊNCIAS

- 1-Thimgman MS, Toedebush C, Mcleland J, Dntley SP, Shaw PJ. Excessive daytime sleepiness is associated with changes in salivary inflammatory genes transcripts. *Mediators Inflamm*.Vol:2015:539627. <https://doi.org/10.1155/2015/539627>. (2015).
- 2-Patacchioli FR, Nicoletti F. et al. Salivary biomarkers of obstructive sleep apnea syndrome in children. *Pediatric Pulmonology* 49,1145–1152, <https://doi.org/10.1002/ppul.22972>. (2014).
- 3-Da Silva Gusmão Cardoso T, Pompéia S, Miranda MC. Cognitive and behavioural effects of obstructive sleep apnea syndrome in children: a systematic literature review. *Sleep Med*.Vol:46:46-55. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.12.020>. (2018).
- 4-Dyugosvskaya L, Lavie L, HirshM, Lavie L. Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. Vol: 25: 820–828. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00103204>. (2005).
- 5-De Luca Canto G, Pacheco-Pereira C, Avdinoz S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Diagnostic capability of biological markers in assessment of obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 2015 Jan 15;11(1):27-36, <https://doi.org/10.5664/jcsm.4358>. (2015).
- 6-Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Paediatric OSA Syndrome Morbidity Biomarkers. The Hunt Is Finally On! *Chest*. vol: 151(2): 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.09.026>. (2016).
- 7-Park CS, Guillemineault C, Park HJ, Cho JH, Son HL, Hwang SH. Correlation of salivary alpha amylase level and adenotonsillar hypertrophy with sleep disordered breathing in pediatric subjects. *J. Clin Sleep. Med*.Vol: 15;10(5):559-66. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3712>. (2014).
- 8-Rathhnayake N, Tryselius Y, Gustafsson A. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. *Plos One*. Vol. 8, Issue 4,1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061356>. (2013).
- 9- Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, June 2007, Vol:1767 ,1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>. (2007).
- 10-Caetano Júnior, P. C., Strixino, J. F. & Raniero, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in

athletes. *Research on Biomedical Engineering*. Vol:31, 116-124. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0664>. (2015).

11-Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V. & Tonevitsky, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *The Analyst* 135, 31833192, <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>. (2010).

2-CAPÍTULO 1

Espectroscopia Molecular Salivar: uma ferramenta de diagnóstico *label free* e não invasiva para Apneia Obstrutiva do Sono

Salivary molecular spectroscopy: a label-free and non-invasive diagnostic tool for Obstructive Sleep Apnea

Bacchin F¹, Cunha TCA^{1*}, Cardoso-Sousa, L.², Caixeta D. C.², Aguiar, E.M.G.², Oliveira, S.W.², Siqueira, W.L.³, Goulart, L.R.⁴, Cunha, T.M.⁵, Neto, A.J.F.¹, Sabino-Silva, R.^{2,3*}, Simamoto-Junior PC.¹

¹College of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

²Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³College of Dentistry, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

⁴Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁵Department of Pulmonology, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

***Corresponding Author:**

*Thays Crosara Abrahão Cunha

University of Uberlandia (UFU)

School of Dentistry (FOUFU)

Uberlândia, MG, Brazil

Av. Pará, s/n - Bloco 4L

Campus Umuarama, Uberlândia, MG, CEP 38400-902, Brazil

&

*Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil

Phone: +55 34 3218 2100

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract

Background and Objectives: Currently the OSA diagnosis is performed through PSG, which is an expensive exam, difficult to perform, and not a reality in a public health system. Consequently, the search for a cheaper, more accessible and OSA-specific diagnostic method is of great interest. This study investigated the potential application of Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy to discriminate children with OSA than matched-controls using saliva.

Materials and Methods: Saliva was collected in 26 OSA children and 14 matched-healthy controls (Non-OSA). The clinical and physical exams and OSA-18 and SBQ questionnaires were applied to all 40 children. Only OSA patients underwent polysomnography and all had their stimulated saliva samples collected after night's sleep. The salivary profile was analysed by ATR-FTIR spectroscopy and the vibrational modes were evaluated for diagnostic capacity using the ROC curve.

Results: The salivary infrared spectrum of Non-OSA and OSA children displayed several unique vibrational modes and from these, five vibrational modes at 2962, 1670, 1638, 1548 and 1075 cm^{-1} were pre-validated as potential diagnostic biomarkers by ROC curve analysis with AUC more than 0.8 in ROC curve analysis ($p > 0.05$).

Conclusion: Spectral salivary biomarkers discovered using univariate analysis may provide a novel robust alternative for OSA monitoring using a non-invasive and green technology.

Mesh Terms: ATR-FTIR, Biomarkers, Children, Diagnosis, OSA

Introduction

Obstructive Sleep Apnea (OSA) is a respiratory disorder, characterized by total or partial obstruction of upper airways during sleep, leading to hypoxemia and awakening. It is estimated that 2% to 7% of preschool-aged [1] are affected and 936 million adults [2] who may present with or without symptoms and are accompanied by neurocognitive and cardiovascular sequelae [3,4,5].

The OSA predictive investigation diagnosis is based on patient's history, clinical and physical examinations, even though the full night polysomnography evaluation (PSG) is the gold standard for this diagnosis [6]. Despite evidence of the increase prevalence and incidence of this disease in children, routine evaluation in clinical practice is unusual, and one of the reasons for this, is the difficulty of access and high added value, complex execution and low availability in the public system health from the PSG exam [7].

Due to the technological development of the last years, saliva as a fluid for the diagnosis and monitoring of diseases as well as for the evaluation of the effectiveness of treatments, presents itself as a great potential for use in paediatric patients since it is easily collected and stored [8]. Salivary diagnosis is a dynamic field that has been incorporated as an increasing form of disease diagnosis, also applied to OSA [9].

The Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy is sensitive, non-destructive, reagent-free and highly reproducible global analytical technique that identifies structural molecules based on its infrared (IR) fingerprints [10]. It is one of the analysis methods for determining the structure of small molecules that can be found in saliva [11]. The infrared vibrational modes of ATR-FTIR can be considered a molecular fingerprint that can correlate directly with the presence or absence of disease, provide the basis for multiple quantitative determination applied to diagnostic interest [12,13].

Therefore, the aim of this study was to investigate whether specific spectral biomarkers as well as their vibrational modes can be applied in OSA

diagnosis. For that, the salivary infrared vibrational modes of children with OSA determined by PSG were compared to matched-healthy control children.

Materials and Methods

This observational study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia (#protocol: 1,582,746). 40 children between 5 to 11 years old and BMI below 25 were recruited, 26 in the OSA group and 14 in the Non-OSA group. The patients in the OSA group had a clinical sign or symptom for OSA (snoring or apnea witnessed) confirmed later by PSG. The Non-OSA group did not present signs and clinical symptoms of OSA [14]. The exclusion criteria for both groups were patients who have already undergone some treatment for OSA, patients with neuromuscular diseases, patients with genetic syndromes and with craniofacial malformations [15].

The SBQ and the OSA-18 Questionnaires

All patients' parents completed the SBQ (Sleep Behaviour Questionnaire) questionnaires [16] to assess the subjective quality of sleep and the OSA -18 (Obstructive Apnea-18), to assess quality of life [17].

The SBQ questionnaire is intended for the assessment of sleep disorders in children and their influences on behaviour, development, school performance and family relationships [16]. Each item is numbered in a score of 1 (never) and 5 (always), according to the frequency that each item has presented in the last 6 weeks.

The OSA-18 Questionnaire was developed [18] to assess the impact of OSA in children and their caregivers based on 18 questions, which asks caregivers in 5 domains: sleep disorders, physical symptoms, emotional problems, everyday problems and informant's opinion (showing caregiver concerns). Each item has a score on a 7-point scale ranging from 1 (never) to 7 (always).

For both, the high score reveals impaired quality of sleep and life, respectively.

Polysomnography (PSG)

The polysomnography examination was performed at full night of sleep and interpreted by trained professionals using ALICE 5 ® equipment (Alice®/Respironics) Electroencephalogram (EEG) channels (C3 / A2, C4 / A1, O1/ A2, O2 / A1), bilateral electrooculogram (EOG) and submental electromyography (EMG) for sleep staging. Airflow was assessed using a pressure transducer nasal cannula, and the thermistor was used for oral and nasal breathing. Chest and abdominal movements were measured using uncalibrated inductance plethysmography, oxyhemoglobin saturation was measured by measuring pulse oximetry and snoring was measured by tracheal microphone. Sleep position was determined using position sensor. Electrocardiogram (modified ECG – V2) was also used. Sleep staging was performed according to the criteria of Rechtschaffen and Sales [19].

Respiratory events were analysed according the American Academy of Sleep Medicine (AASM) [20]. Apnea in children was defined as continuous breathing effort with an absolute termination of air flow through the nose and mouth, lasting 2 or more consecutive breathing cycles. Obstructive hypopnea was defined as an abnormal respiratory event with at least 30% reduction in airflow, together with oxygen stimulation or desaturation $\geq 3\%$ from baseline. AHI (obstructive sleep apnea / hypopnea index) was defined as the total number of apneas and hypopneas per hour of electroencephalographic sleep and recorded in the analysis [20]. Patients with mild OSA were considered to have $1 < \text{AHI} \leq 5$ events / hour of sleep, moderate OSA $5 < \text{AHI} \leq 10$ and severe OSA $\text{AHI} \geq 10$ events / hour of sleep.

Saliva Collection and Processing

The salivary collection was performed in the morning, about 30 minutes after waking up, in a liquid and solid fast. In the OSA group, it occurred the following morning, after the PSG exam. [21,22]. Salivary fluid was collected by means of smooth cylinders, the Salivettes® (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DEU). Cotton rolls measuring approximately 1cm thick and 3.5cm long are

contained inside. The rollers absorb saliva, after stimulated collection of 5 minutes, are later introduced into Salivette® and properly closed. After collection, the salivary sample tube (Salivette®) was stored in a freezer at -80° c (ColdLab® Laboratory Equipment, S.P, BRA) until analysis.

The recovery of the salivary sample absorbed by the cotton roller by thawing at room temperature and centrifugation (Centribio® Biovera Laboratory Equipment, RJ, BRA Centrifuge) of Salivette® (STRAZDINS et al.,2005 – [23]). This process is done at 3000 rpm at 2 minutes. Samples are aliquoted by pipette (Digipet® Variable Volume Monochannel Micropipette, BRA), with disposable tips for each sample, and transferred to a 1.5 ml Eppendorf tub (Eppendorf®, Hauppauge, NY, USA).

Chemical profile in stimulated saliva by ATR-FTIR Spectroscopy

Saliva samples were analysed in the 4000 cm⁻¹ to 400 cm⁻¹ region using attenuated full-reflection infrared spectroscopy (ATR-FTIR Vertex 70®, Bruker Optics, Reinstetten, Germany). The infrared ray penetration depth over the crystal formed films varies between 0.1 e 0.2µm and depends on the wavelength, beam incidence angle and refractive index of the ATR, in this case a diamond Crystal material. In ATR crystal, the infrared beam is reflected toward the sample of saliva. 2µl of sample were dried (2 min and 30sec.) on the ATR crystal, and then the sample spectra were acquired. 32 scans were made to obtain the profile each sample with a resolution of 4 cm⁻¹.

Spectra data evaluation procedures

The process of evaluating and interpreting spectral data was performed blindly for the presence or absence of the disease.

The spectra were obtained in Absorbance, normalized by the vector method and subsequently the baseline was corrected. The profile was obtained using Opus 6.5 Software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). Original data were plotted on Origin Pro 9.0 (Origin Lab, Northampton, MA, USA) to perform second derivative analysis. The second derivate was obtained applying the Savitzky-Golay algorithm with polynomial order 5. The normalization of the

second derivatives was made by means and the levels were calculated by the band intensities.

Sensitivity and specificity values were calculated based on the external test set as follows:

The specificity or true negative rate is characterized as the percentage of healthy matched control children who are correctly identified as being Non-OSA subjects:

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FP}$$

The quantity 1-specificity is the false positive rate and is the percentage of subjects that are incorrectly identified as OSA subjects.

The sensitivity or true positive rate is defined as the percentage of patients who are correctly identified as OSA subjects:

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN}$$

Where TP stands for true positives; TN for true negatives; FP for false positives; and FN for false negatives.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software version 24.0.

The evaluation of the data distribution according to the normality curve was performed according to the Kolmogorov Smirnov test. The data that do not follow the normality curve were standardized by the Z score. The comparison of continuous data between groups, and the data on bandwidth and peak intensity were analysed using T-test for independent samples. The comparison of categorical data was performed using the Chi Square / Fisher's Exact test. Pearson's correlation was performed to analyse AHI measurements and quality of life domains

For all Biomarker candidates, the Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve was obtained with sensitivity and specificity values. All of these were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Prism7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Only p values <0.05 were considered significant and the results were expressed as mean \pm SD. Continuous data were represented in absolute frequency and percentage (%).

Results:

TABLE 1 - Demographic and Anthropometric Characteristics in the Study Population

	OSA (n=26)	Non-OSA (n=14)	p
Age, years	8 \pm 2	8 \pm 1.5	0.22
Gender (M:F)	1:1	9:5	0.16
BMI- Kg/m ²	18.1 \pm 5	-	-
AHI	10.68 \pm 7.6	-	-

The data are shown as the mean values \pm SEM.

The study population characteristics (age, gender and BMI) are presented in Table 1. 50% were women in the OSA group versus 28.6% in the Non-OSA group. As described in table 1, the age mean was similar (p > 0.05) in both groups. The BMI of OSA children were 18.1 \pm 5 Kg/m². When comparing sex, there was no difference between groups (p=0.16).

Subjective Parameters

SBQ and OSA-18 Questionnaires

The final SBQ score was increased (p < 0.05) in the OSA compared to Non-OSA children. Likewise, patients with sleep apnea had the full impact of OSA-18, daily problems and the informant's opinion with statistically higher levels demonstrating that they have a worse quality of sleep and life compared to Non-OSA children (Table 2).

TABLE 2 - Comparison of Study population questionnaire Score

	Non-Osa	Osa	p
	Mean±DP	Mean±DP	
SBQ	52.30±11.14	73.15±13.38	<0.001
OSA 18 - Total impact	37.22±19.65	73.19±23.25	<0.001
OSA 18 - Sleep	6.90±4.40	18.5±6.60	<0.001
OSA 18 - Physical	8.90±5.46	15.03±9.64	0.063
OSA 18 - Emotional	7.10±3.48	10.73±6.61	0.176
OSA 18 - Daytime	6.20±3.08	11.53±4.46	0.001
OSA 18 - Informant	6.50±4.85	18.30±7.20	<0.001

The data are shown as the mean values ± SEM.

Polysomnographic Parameters

In assessing severity, the OSA group had 46.2% (n=12) patients with severe OSA, 19.2% (n=5) patients with moderate OSA and 34.6% (n=9) with mild OSA (Table 3). The polysomnography parameters of OSA children are describe in table 4.

TABLE 3- AHI severity (OSA GROUP)

Severity	%	N
Mild	46.2	12
Moderate	19.2	5
Severe	34.6	9

The data are shown as percentage

TABLE 4 - Polysomnographic Characteristics of Children With OSA

Variables	Mean±SD	Standard Of Normality
TRT - Total registration time - min	491.42±37.06	Minimum Of 4 Hours
TST - Total sleep time - min	455.40±49.18	-
Sleep efficiency, %	94.41±6.05	>85
Sleep-onset latency, min	13.19±33.84	<30
REM-onset latency, min	160.15±90.19	70-120
WASO, min	26.05±27.63	-
Arousal index, enents/night	66.38±27.82	<10
Micro arousal index, events/hr	9.62±3.65	<10
Stage 1 sleep, %	3.46±3.90	<5
Stage 2 sleep, %	16.28±9.80	50-55
Stage 3 sleep, %	66.00±11.67	>15
REM, %	14.63±6.12	20-25
PMM	1.87±1.04	<5
Arousal mean saturation %	97.34±0.93	90
Minimum saturation %	88.61±7.13	90
Saturation REM %	97.00±1.54	90
Saturation NREM %	96.76±0.99	90
AHI, events/hr	10.68±7.60	<1
AHI REM, events/hr	13.60±11.42	<1
AHI NREM, events/hr	10.61±7.54	<1
AHI TST, events/hr	10.87±7.44	<1
Heart rate mean	82.71±9.91	-
Highest heart rate	97.57±10.18	-

The data are show as the mean values, SD (TRT-total registration time, TST-total sleep time, REM-rapid Eye moviment, WASO-wake after sleep onset , PMM-periodic member movements,AHI-apnea/hypopnea index, NREM-nom rapid Eye moviment)

Correlation between AHI, SBQ and OSA-18 in the OSA Population

The table 5 shows Pearson's correlation between the AHI with SBQ and OSA-18 questionnaires. It was observed that the AHI in the OSA children was positively correlated ($p < 0.05$) with sleep disorders, daytime problems and the informant's opinion on the OSA-18 questionnaire, indicating that the presence of sleep apnea has an important impact on the quality of life in this population.

TABLE 5- Correlation Between AHI, SBQ and OSA-18 in the OSA Population

	AHI	
	r	p
Age, years	0.173	0.398
BMI- Kg/m ²	0.215	0.291
SBQ	0.216	0.290
OSA 18 - Total impact	0.247	0.225
OSA 18 - Sleep	0.408*	0.039*
OSA 18 - Physical	-0.225	0.268
OSA 18 - Emotional	-0.025	0.904
OSA 18 - Daytime	0.396*	0.045*
OSA 18 - Informant	0.450*	0.021*

Pearson Correlation $p < 0.05^*$

Average spectra of saliva

A representative infrared average spectrum of saliva from Non-OSA and OSA children, which indicates several functional groups derived from proteins, lipids, glycoproteins and nucleic acid, is demonstrated in Figure 1. These representative spectra suggest paramount changes among Non-OSA and OSA children.

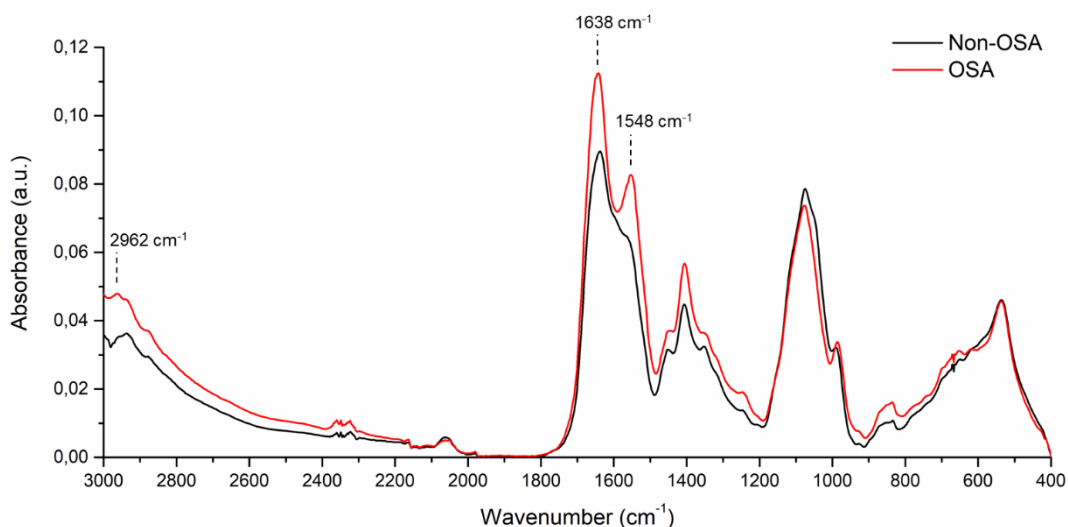


Figure 1. Average ATR-FTIR spectra (3000-400 cm^{-1}) in saliva of Non-OSA subjects and OSA patients.

Spectral bands analyzed by IR spectroscopy

The expression of each molecular component based on their infrared spectral band areas were analyzed in saliva. Besides, we also showed three infrared spectral bands (2962 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} and 1548 cm^{-1}) with significant potential for salivary OSA diagnostic (Figure 2). OSA induced an increase ($p < 0.05$) at 2962 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} and 1548 cm^{-1} bands compared with Non-OSA children (Figure 2.A, 2.C and 2.E). Bearing in mind that sensitivity and specificity are elementary data to determine the accuracy of diagnostic test, the OSA potential diagnostic of these infrared spectral bands were tested by ROC curve analysis. The area under the curve (AUC) was 0.8613 ($p: 0.0002$) to 2962 cm^{-1} spectral band. To a cutoff value of 0.0185, the corresponding sensitivity and specificity were 73.08% and 92.86%, respectively (Figure 2.B). In ROC analysis, the AUC of 1638 cm^{-1} band was 0.8571 ($p: 0.0002$). To a cutoff value of 2.561, the corresponding sensitivity and specificity were 76.92% and 85.71%, respectively (Figure 2D). In ROC analysis, the AUC of 1548 cm^{-1} band was 0.8503 ($p: 0.0003$). To a cutoff value of 0.5635, the respective sensitivity and specificity were 88.46% and 71.43%, respectively (Figure 2.F).

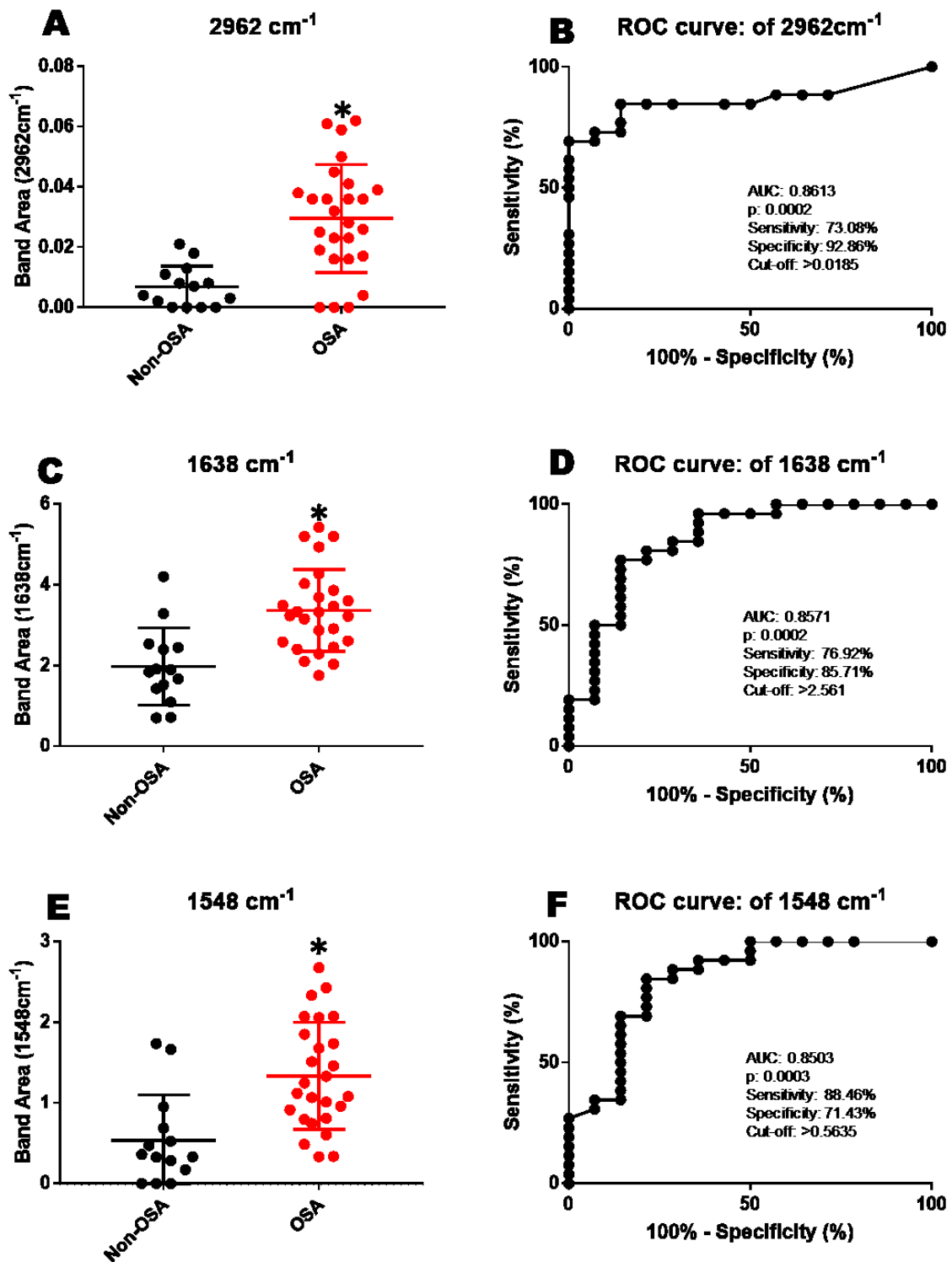


Figure 2. A. Band area of 2962cm^{-1} ; B. ROC curve analyses of 2962cm^{-1} ; C. Band area of 1638cm^{-1} ; D. ROC curve analyses of 1638cm^{-1} ; E. Band area of 1548cm^{-1} ; F. ROC curve analyses of 1548cm^{-1} ; * $p < 0.05$ vs Non-OSA.

Second derivative is an analysis which enhances the separation of overlapping vibrational modes. It can perform a practical and more accurate method than routinely used in infrared absorption spectrum analysis. So, we also carried out the second derivative of ATR-FTIR spectrum. A salivary representative second derivative infrared average spectrum from Non-OSA and OSA children is demonstrated in Figure 3. These representative spectra suggest paramount changes among Non-OSA and OSA children. The assignments of each vibrational modes with higher diagnostic potential verified in figure 3 are indicated in Table 6.

Table 6. Assignments of main wavenumbers of saliva ATR-FTIR spectra. Assignments based on different references [24,25,26]. Abbreviations: ν = stretching vibrations, s = symmetric vibrations and as = asymmetric vibrations.

Peak (cm^{-1})	Proposed vibrational mode	Molecular source
2962	ν as CH_3	Lipids
1670	anti-parallel β -turn of Amide I	Protein
1638	β -sheet structure of amide I	Protein
1548	Amide II [ν (N-H), ν (C-N)]	Protein
1075	ν s PO_2^-	Nucleic acids

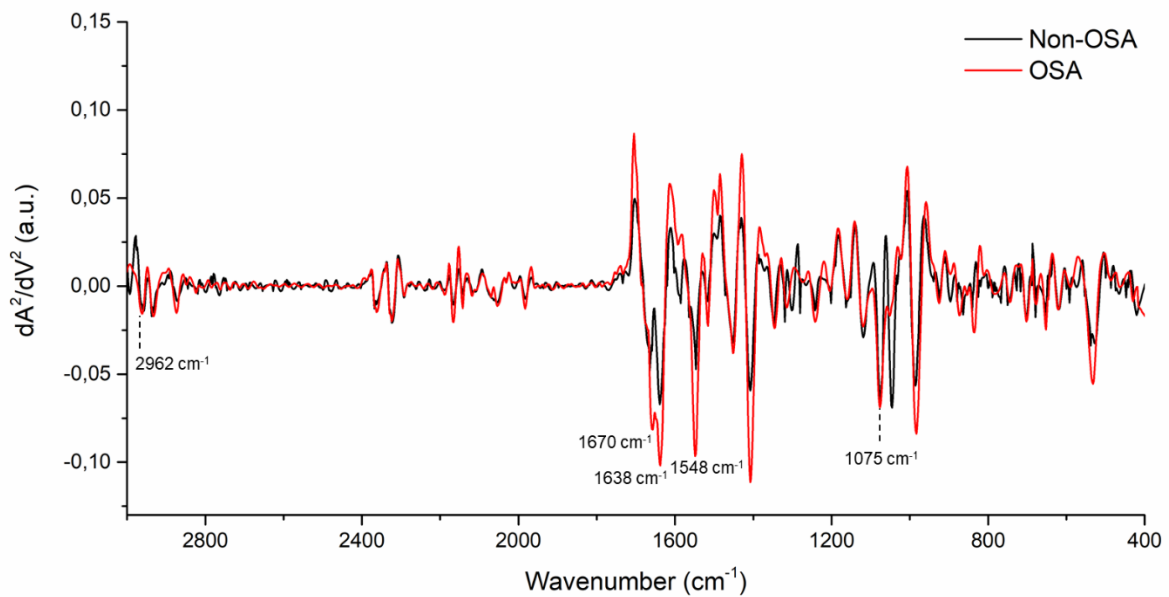


Figure 3. Average ATR-FTIR of a second derivative spectra (3000-400 cm^{-1}) in saliva of Non-OSA subjects and OSA patients.

In figure 4, we depicted a specific salivary representative second derivative infrared average spectrum from Non-OSA and OSA children (Figure 4.A, 4.D, 4.G, 4.J and 4.M). It is important point out that the expression of each vibrational mode is calculate by the intensity of valley. The 2962 cm^{-1} vibrational mode was increased ($p < 0.05$) in the saliva of OSA patients compared to Non-OSA subjects (Fig. 4.B). In ROC analysis, the AUC of second derivative 2962 cm^{-1} vibrational mode was 0.794 ($p: 0.0024$). To a cutoff value of -0.0115, the respective sensitivity and specificity were 88.46% and 78.57%, respectively (Figure 4.C). The 1670 cm^{-1} vibrational mode was decreased ($p < 0.05$) in the saliva of OSA patients compared to Non-OSA subjects (Fig. 4.E). In ROC analysis, the AUC of second derivative 1670 cm^{-1} vibrational mode was 0.8022 ($p: 0.0018$). To a cutoff value of -0.0459, the respective sensitivity and specificity were 80.77% and 71.43%, respectively (Figure 4.F). The 1638 cm^{-1} vibrational mode was increased ($p < 0.05$) in the saliva of OSA patients compared to Non-OSA subjects (Fig. 4.H). In ROC analysis, the AUC of second derivative 1638 cm^{-1} vibrational mode was 0.794 ($p: 0.0024$). To a cutoff value of -0.0743, the respective sensitivity and specificity were 80.77% and 78.57%,

respectively (Figure 4.I). The 1548 cm^{-1} vibrational mode was increased ($p < 0.05$) in the saliva of OSA patients compared to Non-OSA subjects (Fig. 4.K). In ROC analysis, the AUC of second derivative 1548 cm^{-1} vibrational mode was 0.8709 ($p: 0.0001$). To a cutoff value of -0.0713, the respective sensitivity and specificity were 80.77% and 85.71%, respectively (Figure 4.L). The 1075 cm^{-1} vibrational mode was decreased ($p < 0.05$) in the saliva of OSA patients compared to Non-OSA subjects (Fig. 4.N). In ROC analysis, the AUC of second derivative 1075 cm^{-1} vibrational mode was 0.761 ($p: 0.0071$). To a cutoff value of -0.07728, the respective sensitivity and specificity were 76.92% and 71.43%, respectively (Figure 4.O).

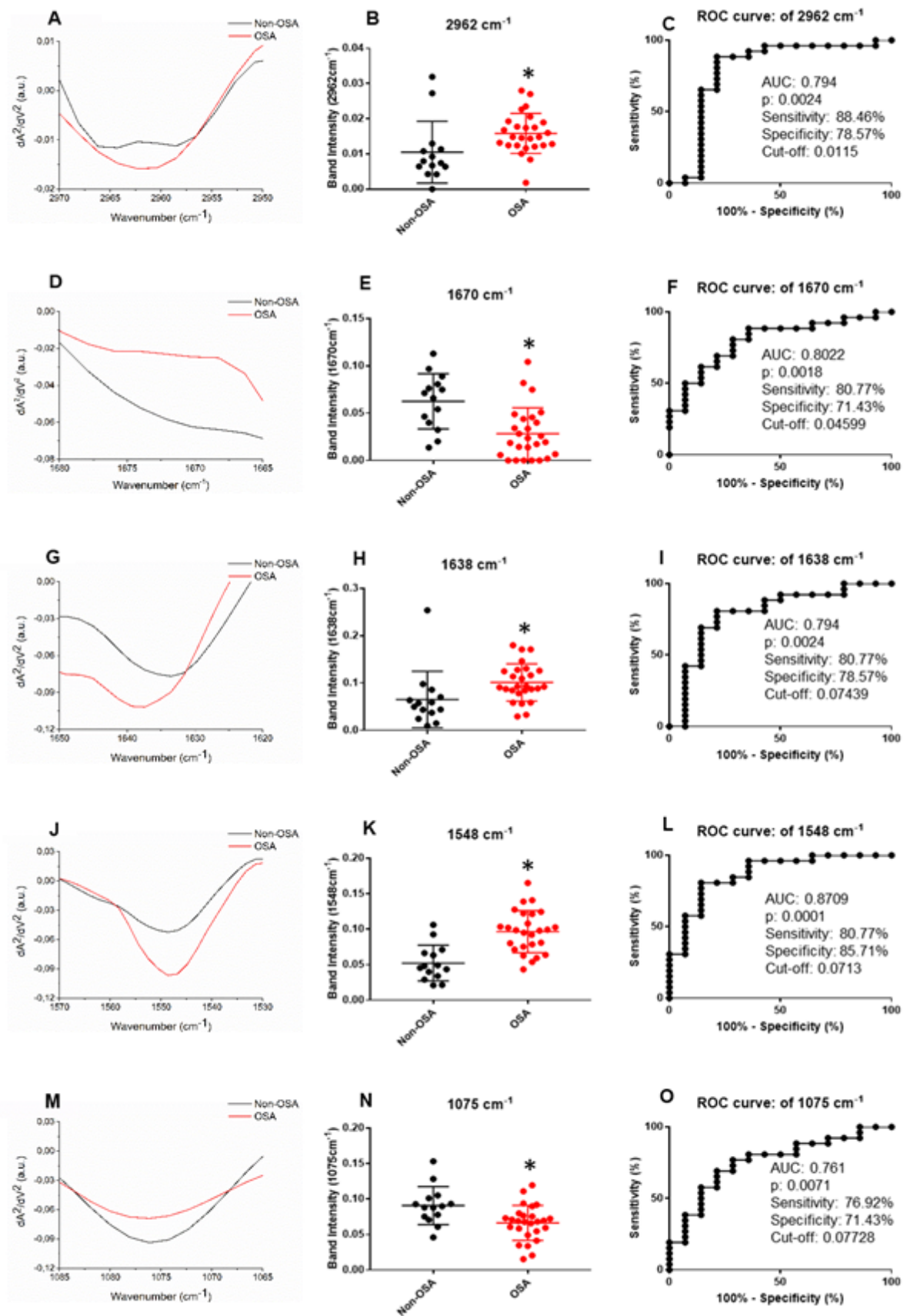


Figure 4. Average ATR-FTIR of a second derivative spectra of vibrational

modes, band area and ROC curve of vibrational modes at 2962, 1670, 1638, 1548 and 1075 cm^{-1} in saliva of Non-OSA subjects and OSA patients. * $p < 0.05$ vs non-OSA.

Discussion

Bearing in mind that, until now, the potential salivary biomarkers to OSA diagnosis use costly and non-sustainable reagents, the development of a reagent free, cost effective, fastly and non-invasive platform for the OSA diagnosis has the potential to promote leading role on early patient treatment, which can save resources in health services and improve the quality of life. To perform it, we measured the clinical applicability of infrared spectral salivary analysis to OSA based on ATR-FTIR spectroscopy. Five potential infrared spectral vibrational modes were detected by ATR-FTIR with significant accuracy to discriminate children with OSA than healthy-matched subjects. These infrared spectral salivary biomarkers can be considered potential candidates for diagnose OSA in clinical practice.

Currently, the PSG exam is the gold standard to OSA diagnosis, however, it has several limitations, such as: costly, potentially stressful, the evaluation is performed in a unusually patient context (hospital or sleep clinic), thus, a typical situation is not measured [27]. Although questionnaires validated in the literature have been used both as predictors of diagnosis and as a tool for evaluating therapeutic results, its effectiveness remain unknowing comparison to PSG tests [28,29,16]. As expected, we demonstrated a positive correlation between the parameters of the questionnaire and the PSG data, stating that OSA-18 can be a good indicator of disease, but still needing further scientific validation. The proportion of OSA severity is not established, here the severity of OSA in our samples indicate 46.2% patients with severe OSA, 19.2% patients with moderate OSA and 34.6% with mild OSA. The substitution of PSG and clinical evaluation to a new non-invasive diagnostic technology in this field with equivalent accuracy can became useful in clinical practice.

The concentration of the salivary functional groups can be measured by band area in original data and by the valley intensity of each vibrational mode in a second derivative analysis [30]. As with other molecular tests, ATR-FTIR is capable to reveal functional groups present in numerous components of biofluids, which leads us to the analysis focus in the spectral biomarker performance over a distinction of specific type of protein/lipid or nucleic acid. Although salivary α -amylase [31] and salivary cortisol [32] have been described to OSA diagnosis, they are unlikely to become a clinical reality due to the potential of several diseases change your expression.

Therefore, OSA promotes increase of vibrational modes at 2962 cm^{-1} in the original and second derivative data, which is related with a stretching asymmetric vibration of CH_3 described in lipidic cellular components. In this lipid field, the sphingomyelin (SM d18:1/12:0), phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholines, phosphoethanolamine, lysophosphatidylethanolamine, phosphoserine, lysophosphatidic acids, fatty acids and eicosanoids were also increased in blood of OSA patients [33,34], which suggest that lipid components in blood can be transported to saliva. Besides, it was showed that salivary cortisol may be a useful biomarker of OSA in pediatric subjects [35]. Considering the lipid characteristics of this hormone, it can be related with changes in 2962 cm^{-1} vibrational mode in saliva of OSA children. This salivary vibrational mode performed more than 80% of accuracy to discriminate OSA and matched control children in both original and second derivative analysis, reaching 88.4% in the sensitivity and 92.8% the specificity in the association of both analyses.

Amide I and amide II vibrational modes are the most prominent functional groups of the protein backbone, and it is related to protein secondary structural components. The amide I spectra provide a reliable method for determination of chemical changes in proteins and polypeptides. [36]. The reduction in the intensity of 1670 cm^{-1} vibrational mode that indicates anti-parallel β -turn of Amide I and the associated increase in the 1638 cm^{-1} that indicates β -sheet structure of amide I, suggest that OSA can promotes possible transcriptional, traductional, or post-traductional changes in salivary protein

constituted by amide I. Considering that saliva can express >3000 proteins [37], the ATR-FTIR analysis is not able to suggest changes in a specific protein, however these data can indicate that some salivary proteins or peptides are changed in OSA. Although it is difficult to interpret, the reduction in amide II was identified in aged saliva, indicating degradation of this protein structures [38]. Considering that the expression of 1548 cm^{-1} was increased in OSA children, this scenario suggests that the enzymatic degradation in salivary proteins upon their release into the oral cavity [39] are reduced in OSA. Further proteomic studies are needed to a salivary global protein profile in OSA.

Saliva has been considered a non-invasive attractive biofluid providing good quality DNA to comprehensive studies about epigenetic mechanisms [40]. Saliva is a rich source of cell-free and exosomal DNA that can monitor the overall health and discriminate diseases [41]. The lower expression of vibrational mode at 1075 cm^{-1} suggests reduction in DNA material in OSA patients.

Although the present data reinforces that ATR-FTIR platforms are profitable for spectral biomarkers identification for OSA diagnosis using saliva, this is an innovative exploratory study using ATR-FTIR technology for this purpose in OSA. Our findings should be interpreted in light of some limitations. First, although we assessed patients severe, moderate and mild OSA together, we did not test the accuracy in each sub-group due to dimensions requires larger samples to capture optimal distributions. Further studies are needed to evaluate the effect of treatments in these innovative infrared spectral vibrational modes to diagnose OSA using saliva.

In conclusion, we showed that ATR-FTIR spectroscopy in saliva is suitable to differentiate OSA from healthy-matched children. Our data suggest specific fingerprint regions as the salivary infrared spectral modes 2962, 1670, 1638, 1548 and 1075 cm^{-1} are suitable to discriminate OSA from healthy-matched children in univariate analysis. In summary, these salivary results indicate that ATR-FTIR spectroscopy coupled with univariate analysis has the potential to provide a novel non-invasive approach to OSA diagnosis, which can assist clinical decision in health centers.

References:

- 1-Brunetti L, Rana S, Lospalluti ML, Pietrafesa A, Francavilla R, Fanelli M, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in a cohort of 1,207 children of southern Italy. *Clinical Investigations*, vol:120(6), 1930-1935, <https://doi.org/10.1378/chest.120.6.1930>. (2001).
- 2-Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, IP MSM, Morrel MJ, et al. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med*, Vol:7: 687–98, [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30198-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30198-5). (2019).
- 3-Redlibe S, Young T. Epidemiology and Natural History of Obstructive Sleep Apnea. *Ear Nose Throat J*. 72(1):20-1, 24-6, <https://doi.org/10.1177/014556139307200106>. (1993).
- 4- Lévy P, Pépin J-L, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy R.D, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Natures Reviews / Disease Primers*. Article number: 15015,30. vol:1:1-20, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.15>. (2015).
- 5-Malhotra A, Orr JE, Owens RL. On the cutting edge of obstructive sleep apnoea: where next? *Lancet Respir Med* 2015. Vol:3: 397–403, [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00051-X). (2015).
- 6-Ehsan Z, Ishman SL. Pediatric Obstructive Sleep Apne. *Otolaryngol Clin N Am*. Vol: 49:1449–1464. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2016.07.001>. (2016).
- 7-Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Paediatric OSA Syndrome Morbidity Biomarkers. The Hunt Is Finally On! *Chest*. vol: 151(2): 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.09.026>. (2016).
- 8-Malamud D. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent. Clin. N Am.*,55. 159-178. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>. (2011).
- 9-Rathhnayake N, Tryselius Y, Gustafsson A. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. *Plos One*. Vol. 8, Issue 4,1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061356>. (2013).
- 10- Ojeda, J. J. & Dittrich, M. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), Vol:881, 187-211, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8. (2012).

- 11- Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol:1767 ,1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>. (2007).
- 12-Caetano Júnior, P. C., Strixino, J. F. & Raniero, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Research on Biomedical Engineering*. Vol:31, 116-124. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0664>. (2015).
- 13-Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V. & Tonevitsky, A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *The Analyst* 135, 31833192, <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>. (2010).
14. Kim JH, Guilleminault C. The nasomaxillary complex, the mandible, and sleep-disordered breathing. *Sleep Breath*. Vol:15(2): 185-93. <https://doi.org/10.1007/s11325-011-0504-2>. (2011).
- 15-Redlibe S, Young T. Epidemiology and Natural History of Obstructive Sleep Apnea. *Ear Nose Throat J*.72(1):20-1, 24-6, <https://doi.org/10.1177/014556139307200106>. (1993).
- 16-Btista HBB, Nunes LM. Validação para Língua Portuguesa de Duas Escalas para Avaliação de Hábitos e Qualidade de Sono em Crianças. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*.Vol:12(3):143148. <https://doi.org/10.1590/S1676-26492006000500006>. (2006).
- 17-Silva VC, Leite AJ. Quality of life in children with sleep-disordered breathing: evaluation by OSA-18. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*.Vol:72(6): 747-756. <https://doi.org/10.1590/S0034-729906000600005>. (2006).
- 18-Fernandes FM, Teles Rda C. Application of the Portuguese version of the Obstructive Sleep Apnea-18 survey to children. *Braz J Otorhinolaryngol*. Vol: 79(6):720-726, <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20130132>. (2013).
- 19-Hori T, Sugita Y, Shikawama S, Inoue S, Kuwahara H, Kousaka M, et al. Proposed supplements and amendments to 'A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects', the Rechtschaffen & Kales (1968) standard. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*.Vol: 55:305–310, <https://doi.org/10.1046/j.1440-1819.2001.00810.x>. (2011).

- 20-Morgenthaler T, Aurora RN, Brown T, Zark R, Alessi C, Boehlecke B, et al. Practice Parameters for the Use of Autotitrating Continuous Positive Airway Pressure Devices for Titrating Pressures and Treating Adult Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome: An Update for 2007. *Sleep*. Vol:31(1): 141-7. <https://doi.org/10.1093/sleep/31.1.141>. (2008).
- 21-Patacchioli FR, Nicoletti F. et al. Salivary biomarkers of obstructive sleep apnea syndrome in children. *Pediatric Pulmonology* 49,1145–1152, <https://doi.org/10.1002/ppul.22972>. (2014).
- 22-Park CS, Park HJ, Lee HK, Son HL. et al. Correlation of Salivary Alpha Amylase Level and Adenotonsillar Hypertrophy with Sleep Disordered Breathing in Pediatric Subjects. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, Vol.10, No. 5.559-566. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3712>. (2014).
- 23-Strazdins L, Meyerkort S, Brent V, D'souza RM, Broom DH, Kyd JM. Impact of saliva collection methods on sIgA and cortisol assays and acceptability to participants. *Journal of Immunological Methods*. vol.307, 167–171, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.09.010>. (2005).
- 24- Ghimire H, Venkataramani M, Bian Z, Liu Y, Parera AGU. ATR-FTIR spectral discrimination between normal and tumorous mouse models of lymphoma and melanoma from serum samples. *Sci Rep*.Vol: 5;7(1):16993. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17027-4>. (2017).
- 25- Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CC, Siqueira WL. et al. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz.Dent.J*. Vol: 7;30(5):437-445. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902228>. (2019).
- 26-Khaustova S, Shkurnikov M, Tonevitsky E, Artvushenko V, Tonevitsky A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst*.Vol:135(12):3183-92. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>. Epub. (2010).
- 27- Brockemann PE, Shaefaer C, Poets A, Urschitz MS. Diagnosis of obstructive sleep apnea in children: a systematic review. *Sleep Med Rev*.Vol:17: 331-40. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2012.08.004>. (2013).
- 28-Zhao G, Li Y, Wang X, Ding X. Wang C, Xu W Han D. The predictive value of polysomnography combined with quality of life for treatment decision of children with habitual snoring related to adenotonsillar hypertrophy. *European Archives of Oto-Rhino- Laryngology*. Vol: 275(6):1579-1586. <https://doi.org/10.1007/s00405-018-4984-6> (2018).

- 29- Garetz SL, Mitchell RB, Parker PD, Moore RH, Rosen CL, Giordani B, et al. Quality of Life and Obstructive Sleep Apnea Symptoms After Pediatric Adenotonsillectomy *Pediatrics*. Vol:135/issue 2. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-0620>. (2015).
- 30-Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bharqava R, Bulter HJ, Dorling KM, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc*. Vol:9(8):1771-91. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>. (2014).
- 31-Park CS, Guilleminault C, Park HJ, Cho JH, Son HL, Hwang SH. Correlation of salivary alpha amylase level and adenotonsillar hypertrophy with sleep disordered breathing in pediatric subjects. *J. Clin Sleep. Med*. Vol: 15;10(5):559-66. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3712>. (2014).
- 32- Park CS, Guilleminault C, Hwang SH, Jeong JH, Park DS, Maeng JH. Correlation of salivary cortisol level with obstructive sleep apnea syndrome in pediatric subjects. *Sleep Med*. Vol:14(10):978-84. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.05.012>. (2013).
- 33-Lebkuchen A, Carvalho VM, Vehturine G, Salgueiro JS, Freitas LS, Dellavence A, et al. Metabolomic and lipidomic profile in men with obstructive sleep apnoea: implications for diagnosis and biomarkers of cardiovascular risk. *Sci Rep*. Vol: 26;8(1):11270. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29727-6>. (2018).
- 34-Xu H, Zheng X, Jia W, Ying S. Chromatography/Mass Spectrometry-Based Biomarkers in the Field of Obstructive Sleep Apnea. *Medicine*. Vol:94(40): e1541. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001541>. (2015).
- 35- Park CS, Guilleminault C, Hwang SH, Jeong JH, Park DS, Correlation of salivary cortisol level with obstructive sleep apnea syndrome in pediatric subjects. *Maeng JH.Sleep.Med*. Vol:14(10):978-84. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.05.012>. (2013).
- 36-Yang H, Yang S, Kong J, Dong A, Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat Protoc*. Vol:10(3):382-96. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>. (2015).
- 37- Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J.Dent.Res*. Vol:98(2):133-141. <https://doi.org/10.1177/0022034518816961>. (2019).

38-Takamura A, Watanabe K, Akutsu T, Osawa T. Soft and Robust Identification of Body Fluid Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometric Strategies for Forensic Analysis. *Sci Rep*. Vol:31;8(1):8459. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26873-9>. (2018).

39-Helmerhorst EJ, Algi AS, Siqueira WL, Oppenheim FG. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Arch Oral Biol*. Vol:51(12): 1061-70. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.06.005>. (2006)

40-Langie SAS, Moisse M, Declerck K, Koppen G, Godderis L, Vanden. et al. Salivary DNA Methylation Profiling: Aspects to Consider for Biomarker Identification. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* Vol:121 Suppl 3:93-101. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12721>. (2017).

41-Yao W, Mei C, Nan X, Hui L. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene*. Vol: 15;590(1):142-8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.033>. Epub (2016).

ANEXOS

Anexo 1 Questionário OSA-18

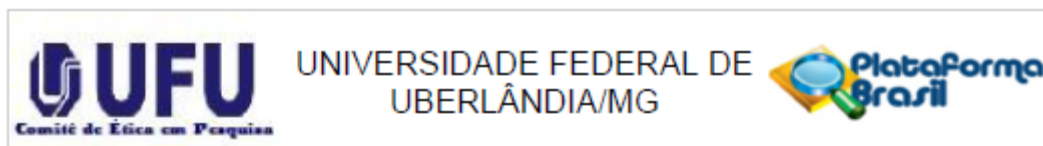
OSA-18 Versão Portuguesa (OSA-18-pv) Data: ___/___/___							
Nome: _____							
Em cada uma das questões seguintes, faça por favor um círculo à volta do número que melhor descreve a frequência de cada sintoma ou problema nas últimas 4 semanas. Assinala apenas um número por questão. Obrigado.							
	Nunca	Quase Nunca	Poucas Vezes	Algumas Vezes	Bastantes vezes	Quase Sempre	Sempre
Distúrbio do Sono							
Nas últimas 4 semanas, com que frequência o seu filho teve...							
... rressonar alto?	1	2	3	4	5	6	7
... paragens na respiração durante a noite?	1	2	3	4	5	6	7
... engasgos ou respiração ofegante enquanto dormia?	1	2	3	4	5	6	7
... sono agitado ou despertares frequentes do sono?	1	2	3	4	5	6	7
Sintomas Físicos							
Nas últimas 4 semanas, com que frequência o seu filho teve...							
... respiração bucal por obstrução nasal?	1	2	3	4	5	6	7
... resfriados ou infecções das vias aéreas superiores?	1	2	3	4	5	6	7
... secreção e congestão nasal?	1	2	3	4	5	6	7
... dificuldade em engolir alimentos?	1	2	3	4	5	6	7
Problemas emocionais							
Nas últimas 4 semanas, com que frequência o seu filho teve...							
... alterações do humor ou acessos de raiva?	1	2	3	4	5	6	7
... comportamento agressivo ou hiperactivo?	1	2	3	4	5	6	7
... problemas disciplinares?	1	2	3	4	5	6	7
Problemas do quotidiano							
Nas últimas 4 semanas, com que frequência o seu filho teve...							
... sonolência diurna excessiva?	1	2	3	4	5	6	7
... episódios de falta de atenção ou concentração?	1	2	3	4	5	6	7
... dificuldade ao levantar da cama de manhã?	1	2	3	4	5	6	7
Opinião do Informante							
Nas últimas 4 semanas, com que frequência os problemas acima descritos...							
... causaram preocupação com a sua saúde?	1	2	3	4	5	6	7
... preocuparam-no pelo seu filho não poder respirar ar suficiente?	1	2	3	4	5	6	7
... interferiram com as suas actividades diárias?	1	2	3	4	5	6	7
... deixaram-no frustrado?	1	2	3	4	5	6	7

Anexo 2 – Questionário SBQ

QUESTIONÁRIO SOBRE O COMPORTAMENTO DO SONO					
Responda com uma das alternativas abaixo o que ocorre rotineiramente com o seu filho.					
1 - Nunca		3 - Algumas vezes		5 - Sempre	
2 - Poucas vezes		4 - Frequentemente			
Seu filho:	1	2	3	4	5
1	Vai para cama disposto				
2	Adormece sozinho				
3	Adormece na sua própria cama				
4	Adormece na cama dos pais				
5	Acorda 1 a 2 vezes por noite				
6	Acorda 3 a 4 vezes por noite				
7	Permanece acordado por menos de 30 minutos				
8	Permanece acordado por mais de 30 minutos				
9	Adormece novamente na presença dos pais				
10	Após acordar durante a noite vai para a cama dos pais				
11	Acorda para comer				
12	Movimenta-se muito enquanto dorme				
13	Sua muito enquanto dorme				
14	Divide o quarto com os pais (mesmo tendo outro lugar para dormir)				
15	Dorme na cama dos pais				
16	Contrai-se muito durante o sono ou enquanto tenta dormir				
17	Acorda confuso ou desorientado				
18	Fala dormindo				
19	Corinha dormindo				
20	Ranje os dentes dormindo				
21	Urina na cama				
22	Acorda gritando e aterrorizado				
23	Tem pesadelos				
24	Ronca enquanto dorme				
25	Pela manhã acorda repousado e com bom humor				
26	Fica sonolento enquanto sentado e/ou estudando				
27	Fica sonolento enquanto assiste televisão				
28	Fica sonolento enquanto está sentado e conversando com alguém				
29	Adormece na escola				

INSTRUÇÕES: 1. Recodifique na direção oposta (3=1) (4=2) (1=3) (2=4) os itens 1, 2, 3 e 25.
2. Escores altos = mais problemas de sono.

Anexo 3 – Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Marcadores salivares em crianças portadoras de distúrbios respiratórios do sono

Pesquisador: Paulo César Simamoto Júnior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53671716.6.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.582.746

Apresentação do Projeto:

segundo os pesquisadores: A Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) é um distúrbio respiratório relacionado ao sono que acomete indivíduos de todas as idades, desde neonatos até idosos. É caracterizada por episódios recorrentes de obstrução total (apneia) ou parcial (hipopneia) da via aérea superior (VAS) simultaneamente ao esforço respiratório durante o sono levando a hipóxia intermitente e despertares (Kim et al., 2004; Udwadia et al., 2004, AASM 1999). Trata-se de uma doença crônica, progressiva e incapacitante, apresentando uma alta taxa de mortalidade e morbidade cardiovascular (Yamashiro & Kryger, 1994; Marshall et al., 2008; Young et al., 2008) sendo portanto considerada um problema de saúde pública (Lavie et al., 2005).

A Classificação Internacional dos Distúrbios do Sono descreve que o diagnóstico da SAOS necessita de questionários específicos, história clínica, exame físico e polissonografia (PSG) clássica (AASM, 2005). O uso da PSG em laboratório especializado com acompanhamento de profissionais treinados permite avaliar o registro do eletroencefalograma (EEG), do eletro-oculograma (EOG), da eletromiografia (EMG) não invasiva do mento e dos membros inferiores, das medidas do fluxo oronasal, do movimento torácico-abdominal, do eletrocardiograma (ECG), da oximetria de pulso e da posição corporal. Com esses registros, podemos calcular o IAH (índice de apneia e hipopneia por hora de sono), a dessaturação da oxi-hemoglobina, as porcentagens dos estágios do sono, a

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

eficiência e a fragmentação do sono, que podem ser atribuídas aos eventos respiratórios. Pode-se afirmar que a polissonografia é o principal método objetivo de diagnóstico da SAOS (Kushida et al., 2005). A gravidade da SAOS é em crianças se classifica como leve quando o paciente apresenta de 1 a 5 eventos respiratórios por hora de sono (ER/HS), moderada quando apresentarem entre 5 e 10 ER/HS e grave quando mais de 10 ER/HS forem registrados em polissonografia (AASM, 1999).

Em crianças na idade pré-escolar, a incidência da SAOS é estimada em 2%, enquanto que o ronco primário é mais comum e estima-se que ocorra entre 6 e 9% (Brunetti et al., 2001). Além disso, crianças com SAOS apresentam ativação mantida do sistema nervoso simpático, inflamação sistêmica e alteração no metabolismo da glicose e dos lipídeos, levando ao início e propagação de processos de aterogênese. (Capdevilla, 2008).

Considerando o alto custo para realização do diagnóstico da SAOS atualmente, é evidente que a construção de plataformas de diagnóstico de baixo custo terá grande relevância para sociedade, pois permitirá um diagnóstico para uma parcela mais significativa da população e possibilitará um diagnóstico precoce evitando complicações advindas da SAOS. Nos últimos anos, a utilização da saliva como fluido diagnóstico para diagnosticar doenças e para avaliar a efetividade do tratamento tem sido empregada como possibilidade de exame complementar. A simplicidade da coleta e o custo reduzido, facilidade de estoque e transporte, possibilidade de coleta sem dor e com menor risco de contaminação demonstram que esta é uma técnica promissora para rotina médica e odontológica, inclusive no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Devido às características de sua coleta, esta análise poderá permitir análises rápidas por tempos prolongados e com estresse bastante reduzido em crianças. 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. (Malamud & Chavez, 2011).

Foi demonstrado que o cortisol salivar e a amilase salivar são biomarcadores promissores para SAOS (Park et al., 2013; Park et al., 2014). No entanto, ainda apresentam fatores limitantes como custo, ritmo circadiano e níveis glicêmicos. Caso ocorra uma correlação significativa entre os biomarcadores salivares que serão avaliados com parâmetros de avaliação da severidade da SAOS poderemos propor inovação com a utilização da saliva como fluido diagnóstico. Deste modo temos a expectativa de que os biomarcadores e processos a serem investigados nesta proposta possam refletir a presença e a severidade da SAOS em crianças.

Os pacientes com SAOS frequentemente apresentam periodontite, o que está associada ao aumento do número de bactérias na placa dental (Nizam et al., 2015). Outro estudo demonstrou

Continuação do Parecer: 1.582.746

que ausência de correlação entre o índice de CPOD (total de dentes cariados, perdidos e obturados) com a severidade da SAOS e correlação significativa entre o tempo de ronco com o índice de CPOD (Acar et al., 2015). Desta forma, percebe-se o impacto da saúde oral nos pacientes com SAOS ainda precisa ser melhor desvendado, especialmente na população brasileira. Apesar da indicação de xerostomia (sensação subjetiva de boca seca) aumentada em pacientes com SAOS (Acar et al., 2015), não evidenciamos na literatura estudos que avaliem o fluxo salivar basal e estimulado nestes pacientes. Desta forma, é possível perceber que muito pouco é conhecido sobre a função das glândulas salivares em indivíduos com SAOS.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar biomarcadores salivares para implementar a utilização da saliva como fluido diagnóstico e de monitoramento da apnéia obstrutiva do sono.

Objetivo Secundário:

O presente projeto pretende descrever a relação da saúde oral com o fluxo e a composição salivar em pacientes portadores de apnéia obstrutiva do sono. Além disso, buscaremos identificar biomarcadores salivares para implementar a utilização da saliva como fluido diagnóstico e de monitoramento da apneia obstrutiva do sono.

Propomos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar o nível de higiene oral simplificado, índice CPOD (total de dentes cariados, perdidos e obturados) e Periograma;
- 2) Mensurar o fluxo salivar basal e estimulado;
- 3) Avaliar a concentração de proteínas totais na saliva;
- 4) Avaliar uma série de componentes salivares por meio de espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier-FTIR (glicose, lipídios, tiocianato);
- 5) Mensurar a concentração de cortisol salivar por meio de Elisa
- 6) Avaliar a atividade da amilase salivar
- 7) Correlacionar parâmetros de saúde oral com parâmetros de caracterização da severidade da apneia obstrutiva do sono;
- 8) Correlacionar biomarcadores salivares e fluxo salivar com parâmetros de caracterização da severidade da apneia obstrutiva do sono;
- 9) Correlacionar biomarcadores salivares e fluxo salivar com parâmetros de saúde oral.

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: 1.582.746

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Durante o processo de seleção dos pacientes e publicação dos resultados as crianças poderão ser identificadas. Devido a este risco, colheremos o termo de consentimento livre e esclarecido dos responsáveis e ocultaremos a identidade da criança, bem como seu rosto nos artigos publicados. Os

riscos, da participação do (a) menor na pesquisa, consistem em esperar o tempo para fazer o exame de sono antes de realizar qualquer tratamento para a apneia obstrutiva do sono.

Benefícios:

as crianças farão um exame de polissonografia em clinica especializada de sono, caso seja confirmado o diagnostico de apneia elas serão encaminhadas para o ambulatório de otorrino-pediatria para remoção de amígdalas e adenoides ou para a faculdade de odontologia para expansão rápida da maxila, dependendo do tipo de tratamento necessário mais indicado para cada paciente. Os benefícios serão a realização do exame de sono sem nenhum custo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP/UFU considera o trabalho bem descrito e relevante. Apresenta forte relevância científica pois aborda um campo pouco explorado e com dificuldade de abordagem devido a população estuda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão corretos

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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 Final ao CEP/UFU: outubro/2016

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: 1.582.746

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: 1.582.746

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_667600.pdf	01/03/2016 10:55:42		Aceito
Outros	curriculo.docx	01/03/2016 10:54:31	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	consentimento.doc	01/03/2016 10:53:24	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Introducao.docx	01/03/2016 10:52:51	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito
Folha de Rosto	Doc3.docx	01/03/2016 10:51:50	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito
Outros	MODELO.docx	28/02/2016 15:25:27	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	20160225_161044.jpg	25/02/2016 16:14:06	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	20160224_172329.jpg	24/02/2016 17:25:26	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	20160106_090405.jpg	23/02/2016 11:30:02	Paulo César Simamoto Júnior	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 09 de Junho de 2016

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: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br