

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E PROPRIEDADE INTELECTUAL

Felipe Morando Avelar

ESPECTROSCOPIA MOLECULAR ACOPLADA COM ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINAS EM SALIVA: uma rápida e não-invasiva ferramenta de triagem diagnóstica para amelogênese imperfeita

BELO HORIZONTE

2022

FELIPE MORANDO AVELAR

ESPECTROSCOPIA MOLECULAR ACOPLADA COM ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINAS EM SALIVA: uma rápida e não-invasiva ferramenta de triagem diagnóstica para amelogenese imperfeita

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração 1: Inovação Biofarmacêutica

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientadores: Prof. Dra. Célia Regina Moreira Lanza

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

BELO HORIZONTE

2022

043 Avelar, Felipe Morando.
Espectroscopia molecular acoplada com algoritmos de aprendizado de máquinas em saliva: uma rápida e não-invasiva ferramenta de triagem diagnóstica para Amelogênese Imperfeita [manuscrito] / Felipe Morando Avelar. – 2022.

62 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientadores: Prof. Dra. Célia Regina Moreira Lanza; Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual.

1. Inovação. 2. Amelogênese Imperfeita. 3. Saliva. 4. Biomarcadores. 5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Lanza, Célia Regina Moreira. III. Silva, Robinson Sabino da. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 608.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E PROPRIEDADE INTELECTUAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ESPECTROSCOPIA MOLECULAR ACOPLADA COM ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINAS EM SALIVA: UMA RÁPIDA E NÃO INVASIVA FERRAMENTA DE TRIAGEM DIAGNÓSTICA PARA AMELOGÊNESE IMPERFEITA "

FELIPE MORANDO AVELAR

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 29 de agosto de 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:

PROF^a. DR^a. JOSIMERI HEBLING

UNESP

Dr. Douglas Carvalho Caixeta

UFU

PROF. DR. FELIPE PAIVA FONSECA

Odontologia/UFMG

PROF^a. DR^a. CÉLIA REGINA MOREIRA LANZA - Coorientadora

Odontologia/UFMG

PROF. DR. ROBINSON SABINO DA SILVA - Coorientador

UFU

PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO – Orientador

ICB/UFMG

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2022.



Documento assinado eletronicamente por Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior, em 30/08/2022, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Celia Regina Moreira Lanza, Professora do Magistério Superior, em 01/09/2022, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Felipe Paiva Fonseca, Subcoordenador(a), em 01/09/2022, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Josimeri Hebling Costa, Usuária Externa, em 01/09/2022, às 15:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Douglas Carvalho Caixeta, Usuário Externo, em 01/09/2022, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Carlos Alberto Tagliati, Membro, em 09/03/2023, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1718794 e o código CRC 6481E66A.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda a saúde, determinação e sabedoria para trilhar mais este caminho profissional.

A conclusão desta etapa só foi possível graças ao suporte, incentivo e apoio de inúmeras pessoas, que direta ou indiretamente passaram por estes anos em minha vida.

Agradeço aos meus super-heróis, minha mãe Walkíria e a meu pai Roberto, a minha filha Isabela e minha esposa Roberta, por compreender os momentos de estudos, de ausência de atenção.

Ao meu orientador Professor Vasco de Azevedo, agradeço a condução deste trabalho e por toda a transmissão de conhecimento obtido. A minha co-orientadora Professora Célia Regina Lanza Moreira, o meu eterno e irrestrito agradecimento, sem a presença dela, nada deste trabalho seria possível. Este trabalho tem também por finalidade, coroar o trabalho magnífico e solidário do Professor Lincoln Dias Lanza, do Departamento de Dentística que juntamente com a Professora Célia chefiam a anos, Projeto de Extensão na Faculdade de Odontologia da UFMG SIEX 403090 (Diagnóstico e Tratamento Interdisciplinar de Defeitos da Odontogênese) cuidando com enorme carinho e qualidade a prestação de assistência odontológica aos pacientes portadores de Amelogênese Imperfeita.

Ao Professor Robinson Sabino da UFU, e sua equipe, pelo apoio, atenção, carinho e todo suporte técnico e intelectual.

A toda a equipe do laboratório chefiado pelo Professor Vasco, obrigado pelos ensinamentos, atenção e carinho a mim dispensado.

Obrigado UFMG pela fantástica estrutura pessoal e organizacional que possibilita a formação de pessoas altamente capacitadas e comprometidas na execução de inovações em todos os tipos de campos de trabalho. Por isso, o meu orgulho em ser aluno da melhor universidade federal do Brasil.

“Segue fazendo o bem. Provavelmente, não te faltarão espinhos e pedras. Pedras, no entanto, servem nas construções e espinhos lembram rosas”.

Chico Xavier

RESUMO

A Amelogênese Imperfeita (AI) é uma doença rara do esmalte dental que afeta a dentição decídua e a permanente com a mesma severidade, acarretando problemas mastigatórios, problemas de autoestima e demanda de tratamento complexo de longo-prazo. Uma série de inovadoras plataformas de diagnóstico salivar com menor produção de resíduos, menor custo, não-invasiva e sem utilização de reagentes tem potencial aplicação para doenças orais e sistêmicas. Nossa hipótese é de que uma plataforma biofotônica no infravermelho possa detectar características únicas no espectro salivar de pacientes com amelogênese imperfeita. Desta forma, neste estudo investigou-se a utilização da saliva aplicada em plataforma de espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) acoplada a algoritmos de aprendizado de máquinas pode ser utilizada na triagem diagnóstica de pacientes com Amelogênese Imperfeita. Este estudo-piloto com 06 pacientes com Amelogênese Imperfeita e 06 sujeitos saudáveis, sem antecedentes de nenhum tipo de alteração do esmalte dentário e pareados por gênero e idade. A saliva completa não estimulada foi coletada em tubos de polipropileno estéreis, com pelo menos 1 hora de jejum alimentar e ausência de escovação dentária. Posteriormente, foram armazenadas e congeladas a -80°C . O presente estudo teve como objetivo comparar os modos vibracionais salivares entre pacientes com AI e controles pareados usando espectroscopia ATR-FTIR acoplada à análise discriminante linear (LDA), Random forest e algoritmos de máquina vetorial de suporte (SVM). A classificação dos espectros de infravermelho salivar por LDA mostrou uma sensibilidade de 83%, especificidade de 67% e acurácia de 75% entre AI e controles pareados. O algoritmo SVM discriminou a AI com sensibilidade de 100%, especificidade de 83% e acurácia de 92%. A área espectral entre 1300 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} pode ser considerada uma área espectral de infravermelho salivar pré-validada como um potencial biomarcador para triagem de AI. Em resumo, a espectroscopia ATR-FTIR acoplada a algoritmos de aprendizado de máquina apresenta potencial para ser aplicada na discriminação de AI pela saliva como ferramenta de triagem adicional em ambientes odontológicos

Palavras-chave: Amelogênese Imperfeita, saliva, ATR-FTIR, biomarcadores

ABSTRACT

Amelogenesis Imperfecta is a rare disease of the dental enamel that affects both primary and permanent dentition with the same severity, causing masticatory and self-esteem problems and demanding complex and prolonged treatment. Successful treatment depends on early detection and intervention. A series of innovative salivary diagnostic platforms with lower waste production, lower cost, and non-invasive and reagent-free use have potential applications for oral and systemic diseases. In this study, we evaluate the potential of ATR-FTIR associated with artificial intelligence algorithms to discriminate amelogenesis imperfecta from matched healthy controls. The pilot study included 06 patients with Amelogenesis Imperfecta and 06 controls matched by gender and age, previously healthy and with no history of any type of dental enamel alteration. Whole unstimulated saliva was collected in sterile polypropylene pots at least 1 hour after feeding or tooth brushing. Subsequently, they were stored and frozen at -80°C . The present study aimed to compare salivary vibrational modes between AI patients and matched controls using ATR-FTIR spectroscopy coupled with linear discriminant analysis (LDA), Random forest and support vector machine (SVM) algorithms. Classification of salivary infrared spectra by LDA showed a sensitivity of 83%, specificity of 67%, and accuracy of 75% between AI and matched controls. The SVM algorithm discriminates AI more than matched controls with 100% sensitivity, 83% specificity, and 92% accuracy. The spectral area between 1300 cm^{-1} to 1200 cm^{-1} can be considered a pre-validated salivary infrared spectral area as a potential biomarker for AI screening. In summary, ATR-FTIR spectroscopy coupled with machine learning algorithms can be used on saliva samples to discriminate AI and can be further explored as an additional screening tool for AI in dental settings.

Keywords: Amelogenesis Imperfecta, saliva, ATR-FTIR, biomarkers

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AI: Amelogênese Imperfeita

ATR: Reflexão total atenuada

ATR-FTIR: Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho
com Transformada de Fourier

DNA: Ácido desoxiribonucleico

LDA : Análise discriminante linear

FTIR: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

IR: Espectroscopia de infravermelho

RNA: Ácido ribonucleico

SVM : Máquina vetorial de suporte

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Chapa aquecedora digital de cerámica (SolidSteel).....	25
Figura 2 FTIR Benchtop System Cary 630 FTIR (Agilent)	25

SUMÁRIO

Delineamento do manuscrito da dissertação

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	19
3. HIPÓTESE	21
4. OBJETIVO GERAL	22
4.1 Objetivos específicos.....	22
5. METODOLOGIA	23
ARTIGO	27
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	47
8. PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	53

Análise e Aprovação Comitê de Ética UFMG

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e Termos de Assentimento

Delineamento do manuscrito da dissertação

Esse trabalho discorre sobre o desenvolvimento de análise salivar de baixo custo, não invasiva e precisa para a triagem diagnóstica da Amelogênese Imperfeita com o auxílio de algoritmos de inteligência artificial.

A plataforma biofotônica visa testar a hipótese de que modos vibracionais de infravermelho associados a algoritmos de Inteligência Artificial possam ser usados para discriminar pacientes com Amelogênese Imperfeita em comparação com pacientes saudáveis utilizando a saliva como fluido diagnóstico.

O texto se inicia com uma introdução geral sobre a Amelogênese Imperfeita, a análise da saliva como método diagnóstico e a apresentação dos resultados da pesquisa. Ao final, está apresentada uma discussão e conclusão sobre o tema e as perspectivas de novas pesquisas.

A dissertação se apresenta no formato de tese incluído um artigo submetido para publicação em periódico internacional visando alcançar o maior número de pessoas por meio da divulgação científica.

1 INTRODUÇÃO

A Amelogênese Imperfeita (AI) é uma doença rara que compreende um grupo complexo de alteração hereditária na formação do esmalte e afeta todos os dentes de ambas as dentições, decídua e permanente (CRAWFORD, ALDRED, BLOCH-ZUPAN 2007). É um distúrbio que apresenta comprometimento quantitativo e ou qualitativo da formação e deposição de esmalte nos dentes e não possui um tratamento padrão disponível até o momento. A condição surge devido a mutações em múltiplos genes, associadas à secreção e funções prejudicadas das proteínas da matriz do esmalte, proteases da matriz do esmalte, proteínas de adesão célula-célula e matriz celular e proteínas de transporte (SMITH et al., 2017).

Dados sugerem que a prevalência de AI seja bastante variável, em diferentes populações, variando de 1.700 a 14.000 indivíduos (CRAWFORD; ALDRED; BLOCH-ZUPAN, 2007). Entretanto, dados recentes sobre a prevalência desta anomalia são escassos ou inexistentes (MANTON, 2020), uma vez que o diagnóstico se limita apenas ao histórico familiar e observação clínica meticulosa, sem diagnóstico genético.

Outros achados clínicos associados em pacientes com AI incluem: maior susceptibilidade a cárie, sensibilidade, perda de dimensão vertical, má oclusão dentária e comprometimento estético (CANGER et al., 2010). A AI também pode estar associada a atraso na erupção dos dentes, calcificação pulpar e taurodontismo (YIP; SMALES, 2003).

Dependendo do fenótipo clínico, a AI pode ser classificada em cinco tipos: Hipoplásica, Hipocalcificada, Hipomature, Hipomineralizado e Hipoplásico ou Hipomature associado ao taurodontismo (SMITH et al., 2017; CHAUDHARY et al., 2021). O padrão de herança genética da AI pode ser autossômica recessiva (AR), autossômica dominante (AD), ligada ao X (XL) e dominante ligada ao X (XLD) (CRAWFORD PJM et al., 2007; SMITH et al., 2017).

Na amelogênese do tipo hipoplásica ocorre deficiência na quantidade de esmalte. As lesões podem aparecer de maneira puntiformes ou dispersas na superfície do esmalte resultante de uma deposição inadequada de matriz do esmalte. Na amelogênese imperfeita hipocalcificada, o esmalte é constituído por uma matriz normal, mas insuficientemente mineralizada, afetando o desgaste e a anatomia dentária (CRAWFORD; ALDRED; BLOCH-

ZUPAN, 2007). Clinicamente caracteriza-se como dentes severamente desgastados, sensíveis às questões térmicas e possuem coloração marrom escuro (SMITH et al., 2017; CHAUDHARY et al., 2021). A do tipo hipomaturada é associada a defeitos na deposição final dos cristais e na maturação do esmalte, o que resulta em alteração na coloração do esmalte variando de branco-opaca a amarelo-marrom ou vermelho-marrom. A camada de esmalte tem sua espessura adequada porém, ela pode ser muito facilmente destacada da camada subjacente, a dentina (WRIGHT et al. 1992). O ultimo tipo envolve o esmalte hipoplásico ou hipomaturado associado ao taurodontismo (WIKTOP 1989).

Entretanto, além dos cinco tipos, a AI apresenta muitos subtipos e uma grande variedade nos fenótipos que acarretam dificuldade na sua classificação e entendimento. A correta identificação da mutação assim como a compreensão da falha no desenvolvimento do esmalte depende da possibilidade de realização de testes genéticos e moleculares de alto custo, na maioria das vezes inacessíveis para a população. Almeja-se o desenvolvimento de testes diagnósticos que possam ser utilizados próximos ao local de cuidado ao paciente, inclusive em consultórios e locais fora da área técnica de um laboratório, por profissionais de saúde ou por pessoal capacitado (“Point of care testing – PoCT”; RDC nº 302/2005 – Anvisa). Dessa forma, reforça-se a necessidade de estabelecimento da relação entre as bases científicas e validações médicas e também de evolução das tecnologias de análise.

O papel da saliva na proteção e manutenção dos tecidos bucais está bem estabelecido, entretanto o interesse nesse fluido corporal como uma ferramenta de diagnóstico e monitoramento de condições bucais e sistêmicas tem sido alvo de ascendente interesse científico (LIU & DUA 2012, SLOWEY 2015, MIKKONEN et al. 2016, LIMA et al. 2020, FERREIRA et al. 2020), especialmente quando aliada aos novos métodos de análise que possibilitam a identificação precisa de substâncias em traços e pequenas quantidades (RODRIGUES et al. 2017; PASCHOTTO et al. 2020).

A saliva é um fluido biológico que permite auto-coleta, de forma não-invasiva e indolor, apresenta armazenamento simplificado e sem risco de coagulação, apresenta menor risco de contaminação quando em comparação ao sangue, não necessita de equipamentos e profissionais especializados para a sua coleta, pode ser coletada com maior frequência e é possível a realização da coleta em praticamente todas as faixas etárias e tipos de doenças (PFAFFE et al., 2011).

A saliva apresenta em sua constituição, 99% de água e 1% de moléculas orgânicas e inorgânicas que compreendem amilases, mucinas, cálcio, fosfato, ácido carbônico, proteínas ricas em prolina, lisozimas, lactoferrina, peroxidases, aglutininas e histidina, imunoglobulinas A, G e M (IgA, IgG e IgM), além de componentes do fluido crevicular, remanescentes de alimentos, microorganismos e células da mucosa oral descamada (LLENA-PUY 2006). Seus componentes participam da lubrificação, atividade antimicrobiana, digestão, homeostase do fosfato de cálcio, remineralização do esmalte, entre outras funções (SABINO-SILVA et al., 2012). A saliva é um fluido complexo contendo várias enzimas, eletrólitos, proteínas, ácidos nucleicos, hormônios, citocinas, anticorpos e cerca de 700 espécies de microorganismos (DAWES; WONG, 2019; RUHL, 2012; TABAK, L.A., 2007; WEI. F.; WONG, DTW, 2012).

As alterações específicas nestes componentes salivares foram utilizadas para o diagnóstico não invasivo de várias doenças sistêmicas como por exemplo: doenças oncológicas, doenças de pele, doenças renais (RODRIGUES et al.2022), doenças da cavidade oral (BEL´SKAYA e SARF (2021), câncer de mama (ZHANG et al., 2010, FERREIRA et al., 2020), diabetes mellitus (CAIXETA et al., 2020, BEL´SKAYA e SARF 2021). Dessa forma, fica evidente a importancia da composição salivar e da composição aquosa que dilue este fluido, podendo ser um indicador dos níveis plasmáticos de várias substâncias investigadas em doenças orais e sistêmicas.

Não há um modelo ou critério uniforme estabelecido para a coleta de saliva, assim, algumas variações de resultados são encontradas devido a influência do método de coleta na quantificação dos componentes presentes na saliva (YOSHIZAWA et al., 2013; CHOJNOWSKA et al., 2017). Porém, essa limitação é reduzida em comparação a diversas vantagens do uso da saliva como fluido diagnóstico para diversas patologias. (REZNICK et al., 2006; BALAJI et al., 2017).

O diagnóstico salivar é um campo de investigação que busca ser uma alternativa aos testes sorológicos, podendo permitir auto-coletas não invasivas e rápidos. Diversos testes salivares indicaram potencial para análise de alta acurácia, entre elas espectroscopias tema apresentando destaque. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a sistema de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) tem sido utilizada em fluidos salivares, especialmente aplicada com propósitos diagnósticos (SLOWEY 2015; RODRIGUES et al. 2017).

A espectroscopia ATR-FTIR é um método analítico que permite a detecção molecular de componentes inclusive em biofluidos. Considerando que uma molécula é determinada pela sua estrutura única, cada biomolécula exibirá um espectro ATR-FTIR único, representando o modo vibracional dessa ligação estrutural (SEVERCAN et al., 2010; OJEDA e DITTRICH, 2012).

A espectroscopia ATR-FTIR permite investigação rápida e eficiente de múltiplos marcadores a partir do metaboloma de uma amostra completa (PASCHOTTO et al. 2020) e é utilizada para estudar a interação da luz com materiais biológicos (MORAIS et al. 2019).

Na espectroscopia ATR-FTIR a radiação emitida por uma fonte de radiação infravermelha passa por um interferômetro antes de incidir na amostra, possibilitando que a radiação não absorvida pela amostra seja captada por um detector, gerando um gráfico da intensidade em função do deslocamento do espelho móvel, chamado de interferograma. A aplicação da transformada de Fourier permite a transformação em um gráfico que representa a quantidade de radiação detectada em função da frequência da radiação, chamado de espectro. Conhecendo a frequência da radiação absorvida, é possível identificar a molécula responsável pela absorção (BENETTI 2014). A complexidade e o conjuntos de dados espectrais garantem análise multivariada para redução de dados, interpretação e classificação através de uma variedade de algoritmos computacionais (MORAIS et al. 2020, KELLY et al. 2011).

A ATR-FTIR também pode ser aplicado para a triagem diagnóstica de doenças orais e sistêmicas apresentando vantagens atrativas como: sustentabilidade, custo-benefício, facilidade de uso, agilidade na liberação de resultados e não destrutivo (CAIXETA et al., 2020, PMID: 32182246, PARASKEVAIDI; MORAIS; RAGLAN; LIMA et al., 2018; SALA; ANDERSON; BRENNAN; BUTLER et al., 2020). Na saliva, os componentes moleculares detectados são lipídios, proteínas, ácidos nucleicos (DNA / RNA), carboidratos e derivados glicídicos (LILO; MORAIS; ASHTON; PARDILHO et al., 2020). Diversos estudos demonstraram a capacidade do ATR-FTIR em discriminar vários tipos de câncer em relação a indivíduos controle saudáveis usando sangue e tecidos (SALA; ANDERSON; BRENNAN; BUTLER et al., 2020; RODRIGUES et al., 2021). E outros estudos também demonstraram que o ATR-FTIR foi capaz de discriminar câncer de mama usando amostras de saliva (FERREIRA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020). Desta forma, Esse método tem sido utilizado em análises de

tecidos, fluidos biológicos e células (BAKER et al. 2014). A combinação da aplicação da saliva na plataforma ATR-FTIR traz inúmeras perspectivas de contribuir com o diagnóstico e monitoramento de condições bucais e sistêmicas pela identificação precisa de substâncias e marcadores bioquímicos, trazendo aplicações biológicas e principalmente clínicas de interesse da Odontologia (LILO; MORAIS; ASHTON; PARDILHO et al., 2020).

2 JUSTIFICATIVA

A utilização da saliva como método para diagnóstico rápido de infecção da COVID-19 ampliou as perspectivas de uso desse fluido corporal por apresentar marcadores bioquímicos. A espectroscopia ATR-FTIR apresenta elevado potencial para testes de triagem diagnóstica em grande escala pois se mostrou efetiva para identificar moléculas específicas em pequenas amostras de tecidos mineralizados e de fluidos corporais, das quais a saliva apresenta vantagens como auto-coleta, não invasiva e sem coagulação. O método pode contribuir para análise mais abrangente da saliva e o reconhecimento do potencial espectro específico de diferentes patologias orais e sistêmicas.

Destaca-se a evolução do potencial de aplicação tecnológica da ATR-FTIR com sua associação com Bioinformática e algoritmos de aprendizado de máquinas para análise computacional dos espectros, que encontram-se em ampla utilização em pesquisas no Laboratório de Genética Celular e Molecular do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do ICB-UFMG sob a expertise do Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Essa tecnologia apresenta inúmeras possibilidades de pesquisas translacionais na área da saúde e pode contribuir com a melhoria diagnóstica em diversas situações clínicas.

Dessa forma investigamos em um estudo piloto, o potencial de contribuição da ATR-FTIR associada com algoritmos de aprendizado de máquina para triagem diagnóstica da Amelogênese Imperfeita, uma condição bucal desafiadora para o cirurgião-dentista tanto em seu diagnóstico como terapêutica.

A Amelogênese Imperfeita (AI) representa um grupo de condições hereditárias de grande heterogenicidade clínica e genética, caracterizada por afetar o esmalte dentário de

todos os dentes (NG & MESSER, 2009; SMITH et al. 2017). Insuficiente depósito de proteínas e modificação nos cristais resultam em um esmalte patologicamente fino, poroso ou quebradiço com estética pobre, gengivite e sensibilidade exacerbada em alguns casos. A análise da saliva que envolve os dentes estruturalmente e molecularmente alterados pela AI pode mostrar marcadores não só orais como também sistêmicos envolvidos e contribuir com a identificação individual da manifestação fenotípica e com a estratégia do tratamento odontológico.

O diagnóstico salivar é um campo emergente para a implementação da tecnologia verde conhecida como “Point-of-care” (PoC), uma inovação tecnológica de baixo custo, não invasiva (utiliza-se a saliva como fluido diagnóstico), coleta rápida e segura. No Brasil, a tradução adotada oficialmente para este tipo de produto é conhecida como Teste Laboratorial Remoto (TLR). Apesar das diferentes nomenclaturas, PoCT e TLR são conceitos semelhantes. Utilizando a tecnologia, podemos utilizar o equipamento de PoCT para desenvolvimento de diagnóstico e caracterização da AI. Análises abrangentes da saliva, especialmente as mudanças composicionais biomoleculares, podem contribuir para a compreensão da fisiopatologia oral e fornecer uma base para o reconhecimento de potenciais espectros específicos de diferentes transtornos.

3 HIPÓTESES

H1- Condições bucais como a Amelogênese Imperfeita podem ter um espectro de bioimpressão digital próprio identificado na saliva.

H0 - Condições bucais como a Amelogênese Imperfeita, não apresentam um espectro de bioimpressão digital próprio identificado na saliva.

4 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é o de avaliar o potencial da espectroscopia ATR-FTIR associada a algoritmos de aprendizado de máquinas para discriminar a amelogênese imperfeita por meio da saliva de sujeitos controle saudáveis.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos buscou-se:

- ✓ Detectar perfil molecular da saliva por meio de ATR-FTIR entre os grupos do estudo e analisar os dados obtidos das áreas das bandas e modos vibracionais do espectro salivar de pacientes portadores de amelogênese imperfeita em comparação com os pacientes saudáveis.
- ✓ Avaliar e discriminar a plataforma espectroscópica de amostras salivares de pacientes saudáveis e com amelogênese imperfeita por meio de algoritmos de inteligência artificial.
- ✓ Avaliar o potencial diagnóstico destes possíveis biomarcadores espectrais da saliva.

5 METODOLOGIA

Desenho do estudo:

Tratou-se de um estudo inédito e preliminar de natureza exploratória, transversal e de abordagem quantitativa, de acordo com os objetivos gerais e específicos.

Aspectos legais e éticos:

O estudo seguiu as normas nacionais e internacionais de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (CAAE: 59154622.8.0000.5149).

Os pacientes diagnosticados clinicamente com Amelogênese Imperfeita atendidos em um Projeto de Extensão na FAO-UFMG, destinados a pessoas com defeitos da odontogênese foram convidados a participar mediante concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento (Anexos), em conformidade com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Amostras

A metodologia amostral envolveu 4 etapas: coleta e preparo da amostra, aquisição espectral, pré-processamento e análise computacional (KELLY et al. 2011)

Parte 1 - Coleta da saliva e preparo da amostra

As amostras de saliva total, não estimulada foram coletadas individualmente em local arejado e com o mínimo de 1 hora após o participante ter realizado alimentação ou escovação dentária.

Os voluntários foram instruídos a permitir que a saliva se acumule na boca e então a depositá-la passivamente diretamente no frasco coletor (tubo de polypropileno de 20 mL, Axygen do Brasil, SP, Brasil). As amostras foram identificadas e estocadas sob refrigeração (-80° C) até serem processadas.

Foram 2 grupos experimentais:

Grupo 1 – 06 participantes do Projeto de Extensão da FAO-UFMG- SIEX 403090 (Diagnóstico e Tratamento Interdisciplinar de Defeitos da Odontogênese) e que apresentem a doença genética hereditária Amelogênese Imperfeita

Grupo Controle - 06 participantes saudáveis, pareados por idade e sexo com ausência de Amelogênese Imperfeita ou de qualquer outra alteração de desenvolvimento dentário

Parte 2 – Processamento e obtenção dos espectros

Para a análise no FTIR, 10 μ L da saliva previamente descongelada e homogeneizada foram depositados sobre disco circular derivado de alumínio que permite aplicação em larga escala com auxílio de uma micropipeta graduada (Eppendorf Research Plus pipette, Eppendorf AG) e em seguida, secos e desidratados a 80°C em chapa aquecedora digital de cerâmica pelo período de 5 minutos (SolidSteel. Piracicaba, São Paulo, Brasil). (FIGURA 1)

Os espectros salivares infravermelhos foram coletados em um espectrômetro FTIR Benchtop System Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Santa Clara, CA, EUA) (FIGURA 2) conectado a um dispositivo de reflectância total microatenuada (ATR) entre 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} . Um diamante foi usado para produzir o elemento de reflexão interna aplicado no sistema ATR. Amostras de saliva foram inseridas em um disco de alumínio para análise de alto rendimento para realizar análise de infravermelho. A análise de alto rendimento é fundamental para a implementação do ATR-FTIR em ambientes de laboratórios biomédicos para análises clínicas. O reduzido background promovido pela interferência espectral infravermelha do alumínio e suas características sustentáveis oferece um potencial dispositivo de baixo custo para análises de alto rendimento. Todas as amostras salivares de pacientes AI e sujeitos controle foram registradas em duplicata. O espectro do ar foi considerado como *background* em todas as análises de amostras ATR-FTIR. Os espectros e o fundo da película salivar foram capturados com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.



FIGURA 1 - Chapa aquecedora digital de cerâmica (SolidSteel)



FIGURA 2 - FTIR Benchtop System Cary 630 FTIR (Agilent)

Parte 3 e 4 – Análise computacional do Espectro Infravermelho, Processamento e Classificação

A análise dos dados do espectro infravermelho salivar foi dividida em pré-processamento e classificação. A etapa de pré-processamento consistiu em agregação, seleção de atributos e transformação de dados. A média aritmética das três leituras espectrais de cada amostra foi realizada de forma agregada. Os dados espectrais foram truncados para

selecionar apenas em ($1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$.) ou na região da impressão digital ($1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). Além disso, aplicamos parâmetros de pré-processamento selecionados antes da aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina.

As classificações com cada parâmetro de pré-processamento foram testadas com algoritmos de aprendizado de máquina, entre eles: Análise Discriminante Linear (LDA), Random Forest e Support Vector Machine (SVM). As amostras foram divididas em 6 amostras com uma interação; 5 amostras foram usadas para treinar o algoritmo e uma exclusivamente para teste. O desempenho preditivo do LDA e SVM foi indicado após validação cruzada com estratificações de cinco vezes. Além disso, essa estratégia foi repetida três vezes com mudanças nas configurações da amostra em subconjuntos para estimar o desempenho real. A sensibilidade ou taxa de verdadeiros positivos é a proporção de positivos (amostras de AI) classificados corretamente, e a especificidade ou taxa de verdadeiros negativos é a proporção de negativos (controles) que foram classificados corretamente. A acurácia é o número total de amostras classificadas corretamente considerando verdadeiros e falsos negativos.

ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

SALIVARY MOLECULAR SPECTROSCOPY COUPLED TO MACHINE LEARNING ALGORITHMS: A RAPID AND NON-INVASIVE DIAGNOSTIC TRIAGE TOOL FOR AMELOGENESIS IMPERFECTA

Felipe Morando Avelar¹, Célia Regina Moreira Lanza ², Sttephany Silva Bernardino³, Murillo

Guimarães Carneiro⁴, Vasco Ariston Carvalho de Azevedo ⁵, Robinson Sabino-Silva³

¹ Professional Master's Student in Technological Innovation and the Intellectual Property Federal University of Minas Gerais.

² Department of Clinical, Pathology and Dental Surgery, Dental School, Federal University of Minas Gerais.

³ Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Faculty of Computing, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Department of Genetics, Ecology, and Evolution, ICB, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding Author:

Vasco Azevedo, DVM, M.Sc, Ph.D, Depto de Genética , Ecologia e Evolução, ICB/UFMG. Av.

Antonio Carlos,6627. Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CP 486 CEP 31270-901,

Tel/FAX 00 55 31 3409 2610

ResearcherID: F-4315-2011 email: vascoariston@gmail.com

Abstract

Amelogenesis Imperfecta (AI) is a genetic disorder characterized by impaired amelogenesis and enamel deposition on teeth. AI occurs due to mutations, especially in AMEL, ENAM, KLK4, MMP20, and FAM83H, associated with changes in matrix proteins, matrix proteases, cell-matrix adhesion proteins, and transport proteins of enamel. Due to the wide range of phenotypes, the AI diagnosis is complex, and a genetic test is required to characterize AI for better management. Therefore, there is a demand for developing low-cost, non-invasive, and accurate platforms for AI diagnostics. Here, we tested the hypothesis that some salivary vibrational modes obtained in attenuated total reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) coupled with learning-machine algorithms could be used to discriminate AI from control subjects due to changes in salivary components. The present study aimed to compare salivary vibrational modes between AI patients and matched control subjects using ATR-FTIR spectroscopy coupled to linear discriminant analysis (LDA), random forest, and supporting vector machine (SVM) algorithms. The classification of salivary infrared spectra by LDA showed a sensitivity of 83 %, specificity of 67%, and accuracy of 75% between AI and matched control subjects. The classification of salivary infrared spectra by the Random forest algorithm showed a sensitivity of 67 %, specificity of 83%, and accuracy of 75% between AI and matched control subjects. SVM algorithm discriminates AI more than matched-control subjects with a sensitivity of 100 %, specificity of 83%, and accuracy of 92%. The spectral area between 1300 cm^{-1} to 1200 cm^{-1} can be considered a salivary infrared spectral area pre-validated as a potential biomarker for IA screening. In summary, ATR-FTIR spectroscopy coupled with machine learning algorithms can be used in saliva samples to discriminate AI and can be further explored as an additional screening tool for AI in dental settings.

KEY WORDS saliva, salivary biomarkers, Amelogenesis Imperfecta, ATR-FTIR, clinical spectroscopy.

INTRODUCTION

Amelogenesis Imperfecta (AI) is a genetic condition characterized by impaired amelogenesis and enamel deposition on teeth, and it has no available treatment. This rare condition occurs due to mutations in at least five genes, AMEL, ENAM, KLK4, MMP20, and FAM83H, related to matrix proteins, matrix proteases, and cell-matrix adhesion proteins, and transport proteins of enamel (Smith et al., 2017, Gadhia et al., 2012). The AI clinical phenotype can be classified by: reduced amount of enamel (hypoplasia), deficient calcification (hypocalcification), poor enamel maturation (hypomaturation), or poor mineralization (hypomineralization) (Smith et al., 2017; Chaudhary et al., 2021). Further, the inheritance of AI can be Autosomal recessive (AR), Autosomal Dominant (AD), X-linked (XL), and X-linked Dominant (XLD), which generate an overlapping of clinical symptoms and issues to an adequate diagnosis and management of AI. The prevalence of AI is highly divergent worldwide, and some analysis indicates 1 case per 718 people in Sweden and the other 1 per 14,000 people in the United States (Hoppenreijns et al., 1998). Besides, the prevalence of AI in several countries, such as Brazil, is unknown.

Other non-exocrine sources mixed in saliva are desquamated epithelial cells, intact and blood cell-derived components, and gingival crevicular fluid (Lundberg, 2012). Saliva is a complex biological fluid with more than 3,000 proteins, thousands of different mRNA, hundreds of microRNAs, several metabolites, and microorganisms. Bearing that saliva collection is a self-collect, convenient and non-invasive method (Dawes, Wong, 2019, Caixeta et al., 2021), it is a promising alternative for screening or applied in the diagnostic of genetic diseases. Saliva is derived mainly by acinar cells in salivary glands in a process modified in ductal cells (Lundberg, 2012, Kazcor-Urbanowick et al., 2017). In this context, it was shown that genetic variations in AI genes could be related to changes in calcium and phosphorus salivary levels (Kuchler et al., 2017). The gene ESRRB can be expressed in salivary gland tissue and during enamel development (Weber et al., 2014), indicating the relationship of classical genes related to enamel with changes in salivary composition. Some salivary proteins were detected only in patients with molar–incisor hypomineralization (Vieira, Modesto 2020).

A promising alternative to analyzing salivary components by a reagent-free, sustainable, and rapid analysis is the application in the attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) (Caixeta et al., 2021; Butler et al., 2019). This green technology platform can detect vibrational modes derived from salivary components with high sensitivity and specificity (Caixeta et al., 2020; Ferreira et al., 2020). The salivary spectra in the ATR-FTIR platform can detect lipids; amide I; amide II; amide III of proteins; methyl vibrations from peptides; nucleic acids

as RNA, and derivatives from carbohydrates and glycans (Baker et al., 2014; Caixeta et al., 2021; Rodrigues et al., 2016; Khaustova et al., 2010).

Here, we tested the hypothesis that some salivary vibrational modes obtained in attenuated total reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) coupled with learning-machine algorithms could be used to discriminate AI from control subjects due to changes in salivary components. The present study aimed to compare salivary vibrational modes between AI patients and matched control subjects by using ATR-FTIR spectroscopy coupled to linear discriminant analysis (LDA) and supporting vector machine (SVM) algorithms

MATERIALS AND METHODS

Study design

Six patients clinically and radiographically diagnosed with AI and six age- and gender-matched healthy control were recruited from the Department of Dentistry at the Federal University of Minas Gerais. Subjects gave written informed consent for the enrolment in the study (CAAE: 59154622.8.0000.5149).

Saliva collection

Saliva samples were collected using slight suction through a soft plastic catheter. No intentional stimulation was used, although the presence of the soft plastic catheter is capable of slightly stimulating the salivary flow. Saliva was collected for two minutes to minimize the stress. During the saliva collection period, the subjects remained comfortably seated in a well-ventilated room. After the saliva collection, samples were immediately stored at -80°C until the analysis (Siqueira et al., 2005; Siqueira et al., 2007; Davidovich et al., 2010; Sousa et al., 2015). Participants were requested to abstain feed 1 h before the saliva collection.

Chemical profile of unstimulated saliva by ATR-FTIR Spectroscopy

The infrared salivary spectra were collected in an FTIR Benchtop System Cary 630 FTIR Spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) connected to a micro-attenuated total reflectance (ATR) device between 4000 cm^{-1} to 650 cm^{-1} . A diamond was used to produce the internal-reflection element applied in the ATR system. Saliva samples were inserted into an aluminum disc for

high-throughput analysis to perform infrared analysis. The high-throughput analysis is critical to ATR-FTIR implementation in biomedical laboratory settings for clinical analysis. The little background promoted by the infrared spectral interference of aluminum and its sustainable characteristics offers a potential low-cost device for high-throughput analysis. Ten μl of saliva were dried on a hot plate at 80°C under aluminum devices for 5 minutes. All IA and control samples were recorded in triplicate. The air spectrum was considered as a background in all ATR-FTIR sample analyses. Salivary pellicle spectra and background were captured with 4 cm^{-1} resolution and 32 scans.

Spectra data evaluation procedures

The data analysis of salivary infrared spectral was divided into pre-processing and classification. The pre-processing stage consisted of aggregation, attribute selection, and data transformation. The arithmetic mean of the three spectral readings of each sample was performed in aggregation. The spectral data were truncated to select only in (1300-1200) or in the fingerprint region ($1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). Furthermore, we applied selected pre-processing parameters before machine learning algorithms applications.

The classifications with each pre-processing parameter were tested with machine learning algorithms associated with Linear Discriminant Analysis (LDA), Random forest, or Support Vector Machine algorithms (SVM). The samples were divided into 6 samples with one interaction; 5 samples were used to train the algorithm and one exclusively to test. The predictive performance of the LDA and SVM were indicated after cross-validation with 5 times stratifications. Furthermore, this strategy was repeated 3 times with changes in the sample configurations in subsets to estimate the real performance. The sensitivity or true positive rate is the proportion of positives (AI samples) correctly classified, and the specificity or true negative rate is the proportion of negatives (Controls) that were correctly classified. Accuracy is the total number of samples correctly classified considering true and false negatives.

RESULTS

The mean age was similar ($p>0.05$) in AI and control subjects (16 ± 5.1 and 16 ± 5.13 years old, respectively). The gender was 50% male and 50% female in both AI and control subjects (Figure 1).

Table 1. Age and gender from patients diagnosed with AI patients and age- and gender-matched healthy control subjects.

Table 1 - Participating individuals clinically and radiographically diagnosed with AI and their controls paired

Individual Affected (AI)	phenotype Likely	Genre	Agee	Probable Inheritance Pattern	Control
D1	AI Type hypomineralized	F	12	autosomal dominant	12 year old girl without AI
D2	AI Type hypoplastic	M	12	autosomal recessive	12 year old boy without AI
D3	AI Type hypoplastic	M	13	Not determined	13 year old boy without AI
D4	AI Type hypoplastic	F	25	autosomal recessive	24-year-old female without AI
D5	AI Type hypomineralized	F	15	autosomal recessive	15 year old girl without AI
D6	AI Type hippomature	M	19	autosomal recessive	20 year old male without AI

Samples	Clinical and Genetic Diagnosis	Age	Gender
AI1	AI	12	F
AI 2	AI	12	M
AI 3	AI	13	M
AI4	AI	25	F
AI 5	AI	15	F
AI 6	AI	19	M
C1	Control	12	F
C2	Control	12	M
C3	Control	13	M
C4	Control	24	F

C5	Control	15	F
C6	Control	20	M

Blood plasma infrared spectroscopy

The mean infrared spectra normalized by amide 1 in salivary spectra of control and AI samples were presented in figure 1. The biofingerprint region ($1800\text{ cm}^{-1} - 900\text{ cm}^{-1}$) can detect salivary components such as proteins, lipids, DNA/RNA, and carbohydrates (Figure 1).

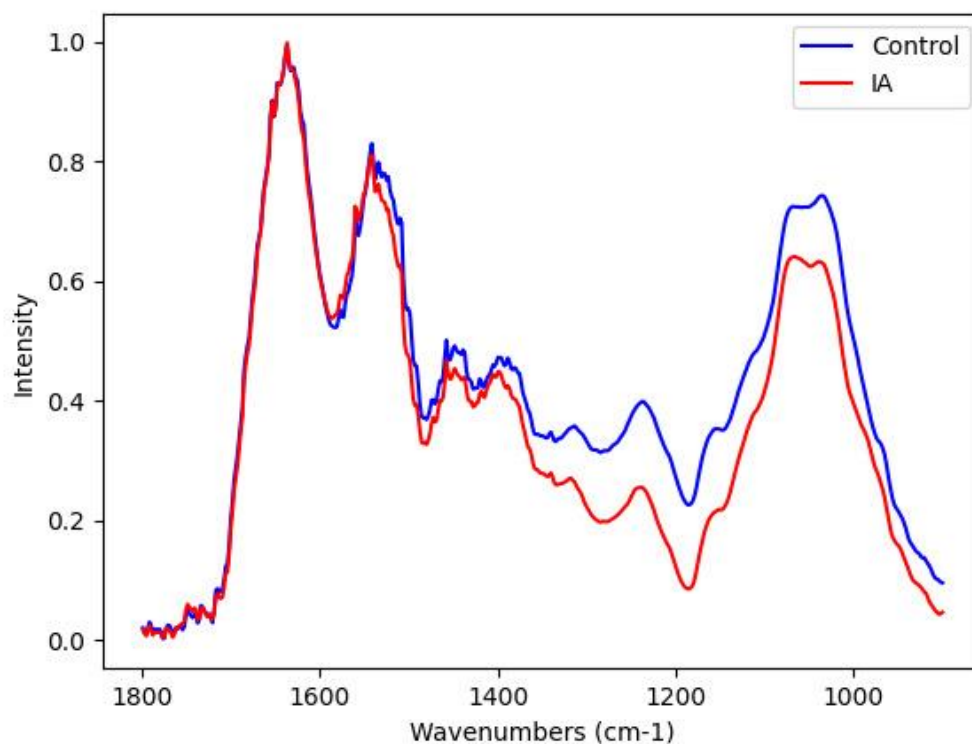


Figure 1. Representative average ATR-FTIR original spectra ($1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$) in control (blue) and AI (red) samples.

The classification of LDA and SVM algorithms showed the discrimination of salivary infrared spectra applied in AI and control samples. The best discrimination of the LDA algorithm was obtained

using the 1300 to 1200 cm^{-1} with 83% of sensitivity, 67% of specificity, and 75% accuracy. The best discrimination of the SVM algorithm was obtained using 1300 to 1200 cm^{-1} with 100% sensitivity, 83% specificity, and 92% accuracy (Table 2). The classification of salivary infrared spectra by Random forest algorithm showed a sensitivity of 67 %, specificity of 83%, and accuracy of 75% between AI and matched control subjects.

Table 2. Machine learning algorithms are applied in salivary spectra to classify AI and control samples.

Algorithm	Area	Sensitivity	Specificity	Accuracy
Linear Discriminant Analysis	1800-900 cm^{-1}	0.83	0.50	0.67
	1300-1200 cm^{-1}	0.83	0.67	0.75
Random forest	1800-900 cm^{-1}	0.67	0.83	0.75
	1300-1200 cm^{-1}	0.67	0.83	0.75
Supporting Vector Machine	1800-900 cm^{-1}	1.00	0.67	0.83
	1300-1200 cm^{-1}	1.00	0.83	0.92

The loading plot with spectral wavenumbers responsible for discrimination of the best algorithm between AI and control samples is represented in Figure 2. As an outcome, the loading plot changes indicate the main salivary vibrational modes at 1708 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} , 1632 cm^{-1} , 1572 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1403 cm^{-1} , 1289 cm^{-1} , 1220 cm^{-1} , 1012 cm^{-1} , and 980 cm^{-1} as responsible for distinguishing AI from age- and gender-matched healthy subjects. The tentative molecular assignments of each vibrational mode selected to discriminate AI from age- and gender-matched healthy subjects were described in table 3 (Movasaghi, Rehman, 2008).

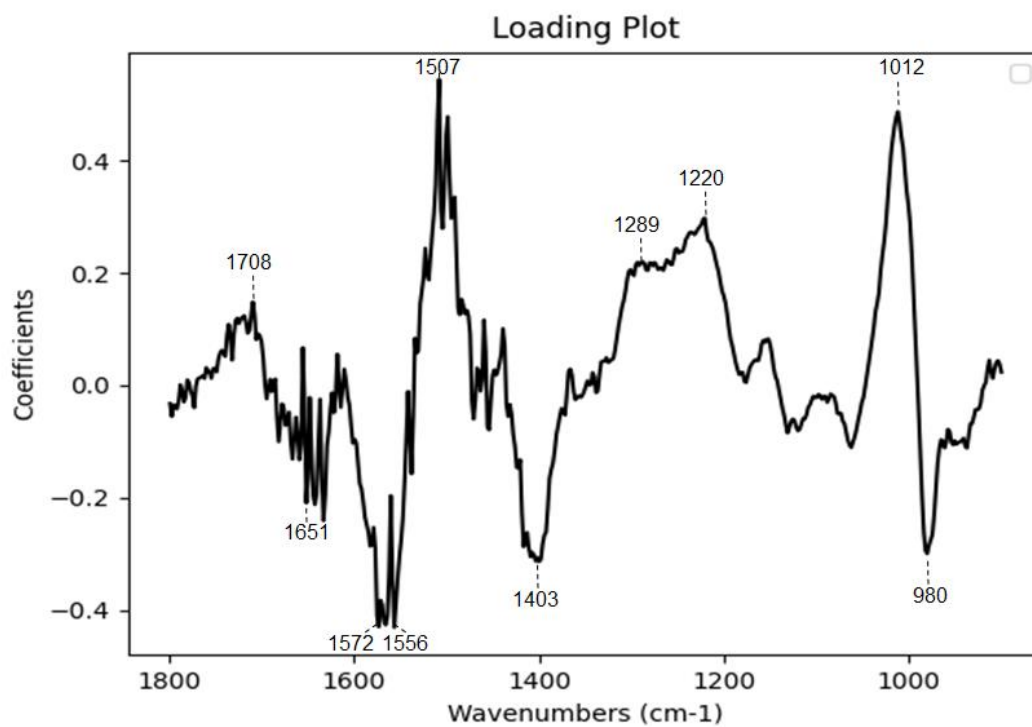


Figure 2. SVM loading plot to discriminate AI and control samples of saliva.

Table 3. Selected vibrational modes by SVM to discriminate AI from age- and gender-matched healthy subjects and its tentative molecular assignments.

Selected vibrational mode	Tentative assignment and type of source	Type of potential source
1708 cm^{-1}	C=O thymine	DNA
1651 cm^{-1}	Amide I	Protein
1572 cm^{-1}	Amide II	Protein
1556 cm^{-1}	CO stretching of amide II	Protein
1507 cm^{-1}	In-plane CH bending vibration from the phenyl rings (amino acid Phenylalanine)	Protein
1403 cm^{-1}	Symmetric CH ₃ bending modes of the methyl groups of peptides	Protein
1289 cm^{-1}	Amide II	Protein
1220 cm^{-1}	Asymmetric PO ₂ ⁻ stretching	Phosphate
1012 cm^{-1}	Stretching C-O deoxyribose	Carbohidrates
980 cm^{-1}	OCH ₃ (polysaccharides)	Carbohidrates

DISCUSSION

The present study provides the first indication that the molecular changes of saliva from AI and control-matched subjects present potential to be detected using a reagent-free and sustainable system based on ATR-FTIR spectroscopy. As an additional novelty of this approach, we showed that AI could be used as a screening platform using minimal saliva samples with fast delivery of results based on SVM algorithms.

We examined the loading plot profiles to identify the main salivary vibrational modes responsible for distinguishing AI from age- and gender-matched healthy subjects. These vibrational modes could potentially be used in a panel of infrared spectral markers of AI. The loading plot analysis found that AI can be associated with changes in DNA-related (vibrational mode at 1708 cm^{-1}), protein-related (vibrational mode at 1651 cm^{-1} , 1572 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1403 cm^{-1} , and 1289 cm^{-1}), phosphate-related (vibrational mode at 1220 cm^{-1}), and carbohydrate-related (vibrational mode at 1012 cm^{-1} and 980 cm^{-1}), regions. The changes in the loading plot of a protein region could be related to changes in salivary proteins as described in AI subjects (Vieira; Modesto 2020). Interestingly, the discrepancy of the loading plot in a phosphate region could be related to changes in AI subject's calcium and salivary phosphorus levels (Kuchler et al., 2017). In this context, we remind the expression of the ESRRB gene in salivary gland tissue and during the development of enamel (Weber et al. 2014), suggesting a connection between classical genes related to the enamel with a non-canonical expression of these genes in salivary glands.

In general, we detected a consistent infrared pattern of spectral changes in vibrational modes in salivary AI samples. Although it was performed within a limited study setting, the findings of this pilot project strongly suggest that the consistent changes in the salivary infrared spectra of AI are connected to AI-related molecular changes in saliva. We also highlight the similarity of matched control samples with the same mean age and percentual of gender in both groups.

The present cohort study shows a classification of salivary infrared spectra by LDA showed a sensitivity of 83 %, specificity of 67%, and accuracy of 75% between AI and matched control subjects. The classification of salivary infrared spectra by the Random forest algorithm showed a sensitivity of 67 %, specificity of 83%, and accuracy of 75% between AI and matched control subjects. Besides, the SVM algorithm discriminates AI more than matched-control subjects with a sensitivity of 100 %, specificity of 83%, and accuracy of 92%. The spectral area between 1300 cm^{-1} to 1200 cm^{-1} can be considered a salivary infrared spectral area pre-validated as a potential biomarker for AI screening. In summary, ATR-FTIR spectroscopy coupled with machine learning algorithms can be considered an emerging green technology used in saliva samples to discriminate AI and further explored as an additional screening tool for AI in dental settings.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, Fielden PR, Fogarty SW, Fullwood NJ, Heys KA, Hughes C, Lasch P, Martin-Hirsch PL, Obinaju B, Sockalingum GD, Sulé-Suso J, Strong RJ, Walsh MJ, Wood BR, Gardner P, Martin FL. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc.* 2014 Aug;9(8):1771-91. doi: 10.1038/nprot.2014.110. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24992094; PMCID: PMC4480339.

Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, Palmer DS, Smith BR, Baker MJ. Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nat*

Commun. 2019 Oct 8;10(1):4501. doi: 10.1038/s41467-019-12527-5. PMID: 31594931; PMCID: PMC6783469.

Caixeta DC, Oliveira SW, Cardoso-Sousa L, Cunha TM, Goulart LR, Martins MM, Marin LM, Jardim ACG, Siqueira WL, Sabino-Silva R. One-Year Update on Salivary Diagnostic of COVID-19. *Front Public Health*. 2021 May 21;9:589564. doi: 10.3389/fpubh.2021.589564. PMID: 34150692; PMCID: PMC8210583.

Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS, Raniero L, Crosara KTB, Baker MJ, Siqueira WL, Sabino-Silva R. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One*. 2020 Mar 17;15(3):e0223461. doi: 10.1371/journal.pone.0223461. PMID: 32182246; PMCID: PMC7077825.

Chaudhary M, Dixit S, Singh A, Kunte S. Amelogenesis imperfecta: Report of a case and review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol [serial online]* 2009 [cited 2021Jun19];13:70-7. Available from: <https://www.jomfp.in/text.asp?2009/13/2/70/57673>

Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG, Santos DW, Goulart LR, Sabino-Silva R, Maia YCP. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *J Oncol*. 2020 Feb 10;2020:4343590. doi: 10.1155/2020/4343590. PMID: 32104176; PMCID: PMC7035572.

Küchler EC, Pecharki GD, Castro ML, Ramos J, Barbosa F Jr, Brancher JA, Vieira AR, Gerlach RF, Trevilatto PC. Genes Involved in the Enamel Development Are Associated with Calcium and Phosphorus Level in Saliva. *Caries Res*. 2017;51(3):225-230. doi: 10.1159/000450764. Epub 2017 Apr 11. PMID: 28395292; PMCID: PMC5505636.

Gadhia K, McDonald S, Arkutu N, Malik K. Amelogenesis imperfecta: an introduction. *Br Dent J*. 2012 Apr 27;212(8):377-9. doi: 10.1038/sj.bdj.2012.314. PMID: 22538897.

Davidovich E, Aframian DJ, Shapira J & Peretz B. A comparison of the sialochemistry, oral pH, and oral health status of down syndrome children to healthy children. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2010; 20: 235–241

<https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2010.01045.x>

Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res.* 2019 Feb;98(2):133-141. doi: 10.1177/0022034518816961. PMID: 30782091; PMCID: PMC6900436.

Hoppenreijts TJ, Voorsmit RA, Freihofer HP. Open bite deformity in amelogenesis imperfecta. Part 1: An analysis of contributory factors and implications for treatment. *J Craniomaxillofac Surg.* 1998 Aug;26(4):260-6. doi: 10.1016/s1010-5182(98)80023-1. PMID: 9777506.

Jon O. Lundberg. Nitrate transport in salivary glands with implications for NO homeostasis. *PNAS* 2012;109:13144-13145.

Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017;242:459-472.

Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V. & Tonevitsky, A. Non-invasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *The Analyst* 135.2010;3183-3192. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>

Rodrigues VP, Franco MM, Marques CP, de Carvalho RC, Leite SA, Pereira AL, et al. Salivary levels of calcium, phosphorus, potassium, albumin and correlation with serum biomarkers in hemodialysis patients. *Arch Oral Biol* 2016;62:58-63.

Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. *Clin Oral Invest* .2005;9:26–29.<https://doi.org/10.1007/s00784-004-0282-3>

Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 27(5): 202-5, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1754-4505.2007.tb00347.x>

Sousa MC, Vieira RB, Santos DS, Carvalho CAT, Camargo SEA, Mancini MNG. Antioxidants and biomarkers of oxidative damage in the saliva of patients with Down's syndrome. *Archives of oral biology*. 2015;60:600-605. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.09.013>

Smith CEL, Poulter JA, Antanaviciute A, Kirkham J, Brookes SJ, Inglehearn CF, Mighell AJ. Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways. *Front Physiol*. 2017 Jun 26;8:435. doi: 10.3389/fphys.2017.00435. PMID: 28694781; PMCID: PMC5483479.

Wang L, Middleton CT, Zanni MT, Skinner JL. Development and validation of transferable amide I vibrational frequency maps for peptides. *J Phys Chem B*. 2011 Apr 7;115(13):3713-24. <https://doi.org/10.1021/jp200745>

Weber ML, Hsin HY, Kalay E, Brožková DS, Shimizu T, Bayram M, Deeley K, Küchler EC, Forella J, Ruff TD, Trombetta VM, Sencak RC, Hummel M, Briseño-Ruiz J, Revu SK, Granjeiro JM, Antunes LS, Antunes LA, Abreu FV, Costa MC, Tannure PN, Koruyucu M, Patir A, Poletta FA, Mereb JC, Castilla EE, Orioli IM, Marazita ML, Ouyang H, Jayaraman T, Seymen F, Vieira AR. Role of estrogen related receptor beta (ESRRB) in DFN35B hearing impairment and dental decay. *BMC Med Genet*. 2014 Jul 15;15:81. doi: 10.1186/1471-2350-15-81. PMID: 25023176; PMCID: PMC4112727.

Vieira A; Modesto A. Amelogenesis Imperfecta Enamel Changes, Amelogenin, and Dental Caries Susceptibility. *Frn Dent Med* 30 Nov 2020. <https://doi.org/10.3389/fdmed.2020.613851>

6 DISCUSSÃO

Esse estudo piloto mostrou a primeira indicação de que as alterações moleculares da saliva de indivíduos AI e controles pareados apresentam potencial para serem detectadas usando um sistema livre de reagentes e sustentável baseado em espectroscopia ATR-FTIR. Um padrão infravermelho consistente de mudanças espectrais nos modos vibracionais foi demonstrado nas amostras salivares de AI (Figura 1).

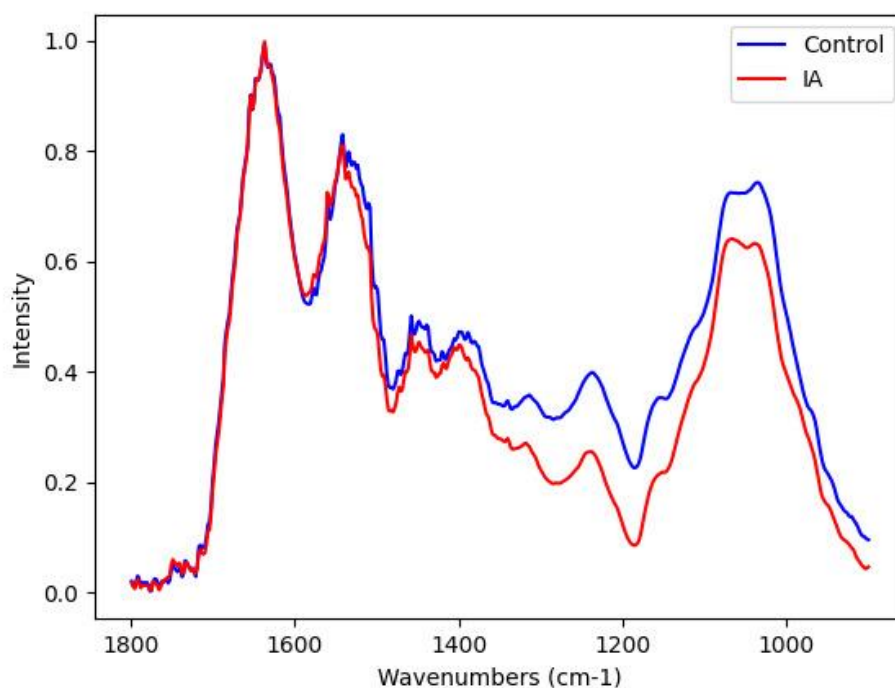


FIGURA 1

Espectros originais ATR-FTIR médios representativos (1800–800 cm-1) em amostras de controle (azul) e AI (vermelho).

Embora o estudo tenha sido realizado em um cenário limitado, os resultados sugerem fortemente que as mudanças consistentes nos espectros de infravermelho salivar da AI estão ligados a alterações moleculares da doença na saliva. Os participantes tinham idade variando entre 12 e 25 anos com características fenotípicas diferentes e ainda assim se destaca a

similaridade de amostras de controle pareadas com a mesma média de idade e percentual de gênero em ambos os grupos (Tabela 1).

TABELA 1: Descrição dos participantes diagnosticados clínica e radiograficamente com AI e os respectivos controles saudáveis pareados por idade e sexo.

Indivíduo afetado (AI)	Fenótipo Provável	Nome	Idade	Provável Padrão Herança	Controle Pareado
D1	AI Tipo Hipomineralizado	F	12	Autossômica Dominante	Garota de 12 anos de idade sem AI
D2	AI Tipo Hipoplásico	M	12	Autossômica recessiva	Garoto de 12 anos de idade sem AI
D3	AI Tipo Hipoplásico	M	13	Não determinado	Garoto de 13 anos de idade sem AI
D4	AI Tipo Hipoplásico	F	25	Autossômica recessiva	Mulher de 24 anos de idade sem AI
D5	AI Tipo Hipomineralizado	F	15	Autossômica recessiva	Garota 15 anos de idade sem AI
D6	AI Tipo Hipomáduro	M	19	Autossômica recessiva	Homem de 20 anos de idade sem AI

Amostras	Pacientes	Idade	Gênero
AI1	AI	12	F
AI 2	AI	12	M
AI 3	AI	13	M
AI4	AI	25	F
AI 5	AI	15	F
AI 6	AI	19	M
C1	Control	12	F
C2	Control	12	M
C3	Control	13	M
C4	Control	24	F
C5	Control	15	F

C6	Control	20	M
----	---------	----	---

TABELA 1 Idade e sexo de pacientes diagnosticados com AI e controles saudáveis pareados por idade e sexo.

O potencial da saliva em conter biomarcadores identificáveis tem sido descrito na literatura como uma ferramenta promissora, despertando cada vez mais atenção na comunidade científica (Soo-Quee et al., 2007; Zhang et al. 2013). Por ser um constituinte fundamental na vida dos seres humanos possui potencial hidrogeniônico (pH) normal estabelecido entre 6,5 e 7 e diversos componentes eletrolíticos como: Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺), Cálcio (Ca²⁺), Magnésio (Mg²⁺), Cloreto (Cl⁻), Fosfato do hidrogênio (HPO₄²⁻), Carbonato de hidrogênio (HCO₃⁻), muco além de compostos que regularizam as funções antibacterianas e inúmeras enzimas (Bhattacharai e colaboradores (2018)). Dessa forma, pode ter um papel importante no monitoramento de doenças bucais e sistêmicas, avaliações de tratamentos realizados, mediante estudo do fluxo salivar e biomarcadores correlacionados com diversas condições de saúde, como a doença periodontal, doenças hereditárias, sistêmicas e autoimunes, cárie dentária, câncer oral, diabetes, Síndrome de Sjogren, câncer de mama, marcadores tumorais, dentre outros (FERREIRA et al. 2020, LIMA et al. 2020, STUANI et al. 2017, KORTE & KINNEY 2016, RATHNAYAKE et al. 2016, LIU & DUA 2012, MARTÍ-ÁLAMO et al. 2012, MITTAL et al.. 2011; KAUFMAN et al. 2002).

De acordo com Cross e Ruhl (2018), os relevantes empasses observados no diagnóstico salivar encontram-se na necessidade de estabelecimento de um padrão para todos os profissionais no ato da coleta salivar, na manipulação e investigação para transformar o diagnóstico final mais fiel.

Segundo Burleigh e colaboradores (2018), o colhimento salivar pode ser feito através de dois processos, a forma mais convencional que é sem estimulação ou com bioestimuladores salivares, com pastilha almofadadas e ou parafinas. Nesse estudo optou-se pela coleta passiva, da saliva total sem estimulação, utilizando-se tubetes de plástico estéreis

pelo “passive drooling”, conseguindo pela atividade de cuspir. Após a coleta as amostras foram armazenadas congeladas até o momento de serem analisadas no FTIR.

Outro aspecto importante foi descrito por Nunes e colaboradores (2015), que pontuaram que o recolhimento do fluxo salivar deve ser feito com o paciente em jejum. Isso se deve ao fato de alguns alimentos alterarem a quantidade de saliva expelida pelas glândulas, diminuir o nível do pH da cavidade bucal, principalmente ingestão tanto de bebidas alcoólicas e de alimentos ácidos, aumentando as chances das amostragens possuírem um alto nível de contaminação bacteriana. Se o paciente não estiver em jejum é necessário pedir para o mesmo fazer uma limpeza na cavidade oral com água destilada e esperar um período de 30 minutos para obter um nivelamento do pH o mais habitual possível.

A metodologia escolhida nesse estudo associou a análise da saliva a espectroscopia ATR-FTIR. Segundo Rodrigues e colaboradores (2019), a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) de reflexão total atenuada é uma ferramenta de análise físico-química rápida, altamente sensível e reproduzível, capaz de identificar moléculas orgânicas e inorgânicas por absorção no infravermelho. Os autores demonstraram que espectroscopia ATR-FTIR possibilitou discriminar pacientes com doença renal crônica de um grupo sem doença renal crônica, com alta precisão e sem a necessidade de reagentes específicos. Bel'skaya e Sarf (2021) destacaram o potencial promissor do método FTIR, para a análise de tecidos e fluidos biológicos de diversas partes do corpo humano, em particular nas doenças da cavidade oral, diabetes mellitus, doenças oncológicas, doenças de pele, doenças renais e para detecção de doenças infecciosas, como o COVID-19.

Biomarcadores de saliva usando tecnologia biofotônica sem reagentes foram investigados como estratégia para detecção precoce de câncer de mama por Ferreira e colaboradores (2020). Segundo os autores, embora a utilização da saliva como rastreamento desse tipo de câncer ainda seja incipiente, o FTIR pode efetivamente fornecer informações sobre a estrutura e composição química de amostras biológicas em nível molecular e, em seguida, a caracterização de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos. O estudo mostrou que o FTIR também foi sensível para detectar mudanças nas composições moleculares de acordo com o estado da doença, fornecendo impressões digitais de amostras biológicas, como tecidos, células e fluidos biológicos. A geração e progressão da malignidade em nível molecular nas células ocorrem antes das alterações morfológicas no câncer, dessa

forma a espectroscopia FTIR é capaz de mostrar alterações nos modos vibracionais relacionados à carcinogênese para diversos cânceres humanos.

O potencial do diagnóstico salivar da AI foi explorado nesse estudo, investigando por ATR-FTIR os possíveis marcadores da doença a partir da sua impressão digital espectroquímica. A tecnologia permitiu extrair pelos algoritmos LDA (Análise Linear Discriminante), Random Forest e SVM (Máquina de Vetor de Suporte) importantes assinaturas espectroquímicas de biomoléculas-chave, relacionadas a regiões de proteínas (modo vibracional a 1570 cm^{-1} , 1504 cm^{-1} e 1400 cm^{-1}), fosfato (modo vibracional a 1209 cm^{-1}) e carboidratos (modo vibracional em 1005 cm^{-1} e 994 cm^{-1}). Isso demonstra que além das mudanças estruturais na qualidade do esmalte dentário, a AI pode provocar também mudanças na saliva que refletem a sua composição protéica e iônica. Curiosamente, a discrepância do gráfico de carregamento em uma região de fosfato pode estar relacionada a mudanças nos níveis de cálcio e fósforo salivar dos indivíduos com AI (PMID: 28395292). Neste contexto, lembramos a expressão do gene ESRRB tanto no tecido da glândula salivar quanto durante o desenvolvimento do esmalte (PMID: 25023176), sugerindo uma conexão entre genes clássicos relacionados ao esmalte com uma expressão não canônica desses genes em glândulas salivares.

A AI é uma condição clínica de ampla variação fenotípica e genética, resultado de mutações nos genes que codificam as proteínas e proteinases do esmalte, proteínas da adesão celular, o transporte de cálcio, a detecção de pH, genes com função promotora de transcrição e variantes cuja função ainda não foi elucidada (Yu et al. 2021, Smith et al. 2017a, Kim et al. 2017, Kim et al. 2019, Ji et al. 2021, Smith et al. 2020, Kim et al. 2021). Seu diagnóstico é realizado pela característica buco-dentária aliada ao exame radiográfico e investigação da condição sistêmica e história familiar. A maioria dos casos não são diagnosticados geneticamente pela falta de acesso aos testes de altos custos e a necessidade de conhecimento especializado, na maioria das vezes na expertise apenas de pesquisadores. Nesse estudo inédito e preliminar, a utilização da saliva analisada por ATR-FTIR mostrou ser uma ferramenta diagnóstica precisa, com índices de especificidade e sensibilidade promissores, capazes de identificar indivíduos com e sem essa doença rara. Destacamos também que a facilidade da coleta salivar durante os atendimentos odontológicos e a análise por inteligência artificial e sem a necessidade de reagentes específicos desponta essa

tecnologia como uma “POC-T” de ampla aplicabilidade na área da saúde. Além disso, contribuições no diagnóstico precoce e no entendimento molecular das variações clínicas podem abrir perspectivas para desenvolvimento de biomateriais e tratamentos mais eficazes e duradouros que permitam a preservação dos dentes e a melhor qualidade de vida dos indivíduos afetados.

7 CONCLUSÃO

O estudo permitiu concluir que as alterações moleculares da saliva de indivíduos AI e controles pareados apresentam potencial para serem detectadas por espectroscopia ATR-FTIR com base em algoritmos SVM, com sensibilidade de 100%, especificidade de 83% e precisão de 92%.

Os modos vibracionais usados como marcadores espectrais infravermelhos de AI foram associados a alterações relacionadas a regiões de proteínas, ao fosfato e a carboidratos. A área espectral entre 1300 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} pode ser considerada uma área espectral de infravermelho salivar pré-validada como um potencial biomarcador para triagem de AI.

A espectroscopia ATR-FTIR acoplada a algoritmos de aprendizado de máquina pode ser considerada uma tecnologia verde emergente usada em amostras de saliva para discriminar a AI e pode ser explorada como uma ferramenta de triagem adicional para AI em ambientes odontológicos.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados desse estudo inédito e preliminar despertam perspectivas promissoras na ampliação do diagnóstico precoce e molecular da Amelogênese Imperfeita e de outras condições de interesse da Odontologia, utilizando-se uma tecnologia “POC-T” de ampla aplicabilidade na área da saúde. Nesse estudo piloto, a utilização da saliva analisada por ATR-FTIR mostrou ser uma ferramenta diagnóstica precisa, com índices de especificidade e sensibilidade promissores, capazes de identificar indivíduos com e sem essa doença rara. Novos estudos deverão ser realizados para ampliação do entendimento molecular das variações clínicas da AI e também da saliva que envolve dentes estruturalmente alterados, podendo abrir perspectivas para estudos translacionais com desenvolvimento de biomateriais e tratamentos mais eficazes e duradouros para os indivíduos afetados.

Por se tratar de uma doença rara, o desenvolvimento de plataforma biofotônica integrada a outros centros de assistência odontológica podem propulsionar pesquisas com banco de dados compartilhados para promoção e intercâmbio de informações e maior amostragem da doença.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAIXETA DC, AGUIAR EMG, CARDOSO-SOUSA L, COELHO LMD, OLIVEIRA SW, ESPINDOLA FS, RANIERO L, CROSARA KTB, BAKER MJ, SIQUEIRA WL, SABINO-SILVA R. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One*. 2020 Mar 17;15(3):e0223461. doi: 10.1371/journal.pone.0223461. PMID: 32182246; PMCID: PMC7077825.

CHAUDHARY M, DIXIT S, SINGH A, KUNTE S. Amelogenesis imperfecta: Report of a case and review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol [serial online]* 2009 [cited 2021Jun19];13:70-7. Available from: <https://www.jomfp.in/text.asp?2009/13/2/70/57673>

COUTO, ANA CLAUDIA FRANCO et al. Amelogênese imperfeita: Revisão da literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, vol. 1, p. 34-40, 2012.

CRAWFORD,P.J.M.; ALDRED, M.;BLOCH-ZUPAN,A. Amelogenesis imperfecta *Orphanet journal of rare diseases*,v.2,n.1, p. 1-11, 2007.

DAWES C AND WONG DTW (2019) Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res* 98:133-141. doi: 10.1177/0022034518816961

FERREIRA ICC, AGUIAR EMG, SILVA ATF, SANTOS LLD, CARDOSO-SOUSA L, ARAÚJO TG, SANTOS DW, GOULART LR, SABINO-SILVA R, MAIA YCP. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *J Oncol*. 2020 Feb 10;2020:4343590. doi: 10.1155/2020/4343590. PMID: 32104176; PMCID: PMC7035572.

KHAN RS, KHURSHID Z, YAHYA IBRAHIM ASIRI F. Advancing Point-of-Care (PoC) Tests Using Human Saliva as a Liquid Biopsy. *Diagnosis*. 2017; 7(3):39. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7030039>

LILLO T, MORAIS CLM, ASHTON KM, PARDILHO A, DAVIS C, DAWSON TP, GURUSINGHE N AND MARTIN FL (2020) Spectrochemical differentiation of meningioma tumours based on attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 412:1077-1086. doi: 10.1007/s00216-019-02332-w

MANTON, D. J.; CROMBIE, F.;SCHWENDICKE, F. Enamel Defects. In: PERES, M. A.; ANTUNES, J.L.F; WATT, R.G. (Ed.) . *Oral Epidemiology*. Cham: Springer,p. 169-191, 2020.1

MORGADO, CÁTIA LOURENÇO; AZUL, ANA CRISTINA. A Amelogênese Imperfeita: Uma Revisão da Literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 50, n. 4, p. 243-50, 2009

NG, Fk ; MESSER, L.B. *Odontopediatria*, Ed. Academias Americana de Odontopediatria Volume 31, número 1, Janeiro/Fevereiro 2009, pp.20-30 (11) *Journal of Nephrology* (2022) 35:1339–1367

PARASKEVAIDI M, MORAIS CLM, RAGLAN O, LIMA KMG, PARASKEVAIDIS E, MARTIN-HIRSCH PL, KYRGIU M AND MARTIN FL (2018) Aluminium foil as an alternative substrate for the spectroscopic interrogation of endometrial cancer. *J Biophotonics* 11:e201700372. doi: 10.1002/jbio.201700372

RODRIGUES JFS, DA SILVA LCM, CARDOSO-SOUSA L, CAIXETA DC, LÜCKEMEYER DD, HENRIQUE AS, PONTES JP, DA SILVA LMG, MACEDO JSS, CARVALHO JÚNIOR PS, SILVA E SILVA C, MARTINS MMRS, MONTEIRO-NETO V, GRISOTTO MAG, FERNANDES AMR, FERREIRA J, CALIXTO JB, SABINO-SILVA R, FERNANDES ES. Monitoring of Peripheral Blood Leukocytes and Plasma Samples: A Pilot Study to Examine Treatment Response to Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceuticals* (Basel). 2021 Jan 29;14(2):106. doi: 10.3390/ph14020106. PMID: 33573015; PMCID: PMC7910893.

RODRIGUES RPCB, VIDIGAL MTC, VIEIRA WA, NASCIMENTO GG; · ROBINSON SABINO-SILVA R, BLUMENBERG C, SIQUEIRA MF, SIQUEIRA WL, PARANHOS LR. Salivary changes in chronic kidney disease and in patients undergoing hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Nephrology* (2022) 35:1339–1367. <https://doi.org/10.1007/s40620-022-01274-4>

RUHL S (2012) The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. *Expert Rev Proteomics* 9:85-96. doi: 10.1586/epr.11.80

SABINO-SILVA R, CERONI A, KOGANEZAWA T, MICHELINI LC, MACHADO UF AND ANTUNES VR (2012) Baroreceptor-mediated activation of sympathetic nerve activity to salivary glands. *Physiol Behav* 107:390-6. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.09.012.

SALA A, ANDERSON DJ, BRENNAN PM, BUTLER HJ, CAMERON JM, JENKINSON MD, RINALDI C, THEAKSTONE AG AND BAKER MJ (2020) Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection. *Cancer lett* 477:122-130. doi: 10.1016/j.canlet.2020.02.020

SMITH CEL, POULTER JA, ANTANAVICIUTE A, KIRKHAM J, BROOKES SJ, INGLEHEARN CF, MIGHELL AJ. Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways. *Front Physiol.* 2017 Jun 26;8:435. doi: 10.3389/fphys.2017.00435. PMID: 28694781; PMCID: PMC5483479.

TABAK, LA Os diagnósticos no local de atendimento entram na boca. *Ana NY Acad. Sci.* 2007 , 1098 , 7-14. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

WEI, F.; WONG, DTW Plataformas Point-of-care para diagnóstico salivar. *Queixo. J. Dent. Res.* 2012 , 15 , 7-15. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]

YIP, H.; SMALES, R. Oral rehabilitation of young adults with amelogenesis imperfecta. *Int J Prosth.* v. 16, n. 4, p. 345-349, 2003.

ZHANG, L. et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. e15573, Dec 31 2010. ISSN 1932-6203.

ANEXOS:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (maiores de 18 anos)

1/2

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Saliva como método de diagnóstico e monitoramento de condições bucais”**. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte desse material biológico humano. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos analisar a saliva e relacioná-la com certas condições bucais, como a formação alterada dos dentes e a periodontite (um tipo de doença que causa perda de osso em volta dos dentes e inflamação da gengiva).

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo iremos coletar 3 ml da sua saliva em frasco individual e levá-la para ser analisada em laboratório. Este procedimento pode levar até 10 minutos, em média e poderá causar algum desconforto como timidez, por exemplo. Você vai ser orientado como fazer e terá o tempo necessário para realizar a coleta de forma individualizada em local reservado e ventilado. O material coletado será levado para o Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, onde ficará armazenado em um biorrepositório até ser analisado. Após as análises a saliva restante será descartada em água corrente.

Essa pesquisa contribuirá para compreender o papel da saliva nas doenças bucais e alterações dentárias e ajudar os pesquisadores a tentar encontrar métodos diagnósticos mais simples e menos dispendiosos.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr. (a) tem assegurado o direito à indenização. Caso necessário, será garantido o direito à assistência integral e gratuita ao participante, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.3.1 e II.3.2).

O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízo, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir da sua saliva, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Um dos riscos relacionados á pesquisa é a quebra de sigilo e confidencialidade dos dados. Para minimizar este risco, será realizada a codificação do seu nome em número, ou seja, seu nome não aparecerá no banco de dados eletrônicos. O banco de dados ficará armazenado no computador da coordenadora da pesquisa, o qual é protegido por senha.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos na

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

sala 3333 da Faculdade Odontologia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarã a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“Saliva como método de diagnóstico e monitoramento de condições bucais: um estudo piloto “** de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Pesquisador Responsável: Profa. Celia Regina Moreira Lanza Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 – Faculdade de Odontologia - Sala 3333. CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG Telefones: (31) 99698-1602 (31)3409-2427 E-mail: celiamlanza@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Pesquisador Orientador: Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 – Laboratório de Genética Celular e Molecular – Bloco Q3 – sala 259 - Depto Genética, Ecologia e Evolução - ICB – UFMG CEP:31270-901 / Belo Horizonte – MG Telefones: (31) 3409-2610 E-mail: vasco@icb.ufmg.br

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG Av. Presidente Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901. Telefone: (031) 3409-4592 Horário de atendimento de 09:00 as 11:00 e de 14:00 as 16:00 h. E-mail: coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Responsável por menor de 18 anos)

O seu (a) filho (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Saliva como método de diagnóstico e monitoramento de condições bucais”**. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte desse material biológico humano. A utilização do material biológico seu (a) filho (a) está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos analisar a saliva e relacioná-la com certas condições bucais, como a formação alterada dos dentes e a periodontite (um tipo de doença que causa perda de osso em volta dos dentes e inflamação da gengiva).

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Caso você concorde que seu (a) filho (a) participe do estudo iremos coletar 3 ml da saliva dele(a) em frasco individual e levá-la para ser analisada em laboratório. Este procedimento pode levar até 10 minutos, em média e poderá causar algum desconforto como timidez, por exemplo. Ele (a) vai ser orientado (a) como fazer e terá o tempo necessário para realizar a coleta de forma individualizada em local reservado e ventilado. O material coletado será levado para o Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, onde ficará armazenado em um biorrepositório até ser analisado. Após as análises a saliva restante será descartada em água corrente.

Essa pesquisa contribuirá para compreender o papel da saliva nas doenças bucais e alterações dentárias e ajudar os pesquisadores a tentar encontrar métodos diagnósticos mais simples e menos dispendiosos.

Para participar deste estudo o Sr. (a) e seu (a) filho (a) não terão nenhum custo, nem receberão qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o seu (a) filho (a) tem assegurado o direito à indenização. Caso necessário, será garantido o direito à assistência integral e gratuita ao participante, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.3.1 e II.3.2).

O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízo, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A participação do seu (a) filho (a) é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que ele(a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a identidade de seu (a) filho (a) com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir da sua saliva, estarão à sua disposição quando finalizada. O nome do seu filho (a) ou o material que indique a participação não será liberado sem a sua permissão. O seu (a) filho (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável

por um período de 5 (cinco) anos na sala 3333 da Faculdade Odontologia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do responsável: _____

2

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“Saliva como método de diagnóstico e monitoramento de condições bucais”** de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o material biológico do meu (a) filho (a) seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o material biológico do meu (a) filho (a) possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo que meu filho(a) participe desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do responsável

Data

Assinatura do responsável

Nome completo do participante (menor)

Data

Assinatura do participante (menor)

Pesquisador Responsável: Celia Regina Moreira Lanza. Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 – Faculdade de Odontologia - Sala 3333 CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG Telefones: (31) 99698-1602 (31)3409-2427 E-mail: celiamlanza@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Pesquisador Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 – Laboratório de Genética Celular e Molecular – Bloco Q3 – sala 259 - Depto Genética, Ecologia e Evolução - ICB –UFMG CEP:31270-901 / Belo Horizonte – MG Telefones: (31) 3409-2610 E-mail: vasco@icb.ufmg.br

Em caso de dúvidas sobre os aspectos éticos da pesquisa, você pode entrar em contato com:

Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP-UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627.Unidade Administrativa II - 2º andar – sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901. **Tel: 3409-4592.**

Horário de atendimento de 09:00 as 11:00 e de 14:00 as 16:00 h . E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (de 10 a 12 anos de idade)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“Saliva como método de diagnóstico e monitoramento de condições bucais”**

POR QUE FUI CONVIDADO? Você foi convidado porque seus dentes têm as características que estamos querendo estudar na saliva.

O QUE É ASSENTIMENTO? O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de crianças, da sua faixa de idade para participar de uma pesquisa. Pode ser que esse documento contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou a equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda.

QUAL O OBJETIVO DA PESQUISA?

Com essa pesquisa, nós, que somos os pesquisadores vamos estudar a saliva e tentar descobrir se a saliva pode prejudicar os dentes ou provocar problemas em volta dos dentes com alterações. Sua participação pode ajudar os pesquisadores compreender melhor o papel da saliva na boca e ajudar os pesquisadores a achar maneiras mais simples e mais rápidas de descobrir algumas doenças bucais.

O QUE TEREI QUE FAZER?

Para participar desse estudo, você precisa nos dar permissão para coletarmos um pouco da sua saliva, o que pode levar algum tempo. Mas esperaremos o tempo que for necessário. Você deverá cuspir em um tubo individual. Sua saliva será levada para um laboratório da UFMG, guardada e analisada. Após o estudo, a saliva restante será jogada fora em água corrente.

SE VOCÊ NÃO QUIZER PARTICIPAR, NÃO TEM PROBLEMA, VOCÊ NÃO TERÁ NENHUM PREJUÍZO EM SEU TRATAMENTO.

Se você não quiser mais participar, a qualquer momento, poderá vir na Faculdade de Odontologia, ou telefonar para os pesquisadores e informar. Você tem direito de saber tudo sobre seus exames. Você não pagará nada nem receberá nenhum tipo de pagamento para participar da pesquisa.

PARTICIPAR DO ESTUDO TRAZ BENEFÍCIOS? Sim. O maior benefício será contribuir para aumentar os conhecimentos sobre as alterações dentárias e tratamento, contribuindo para melhorar a qualidade dos tratamentos.

QUAIS SÃO OS RISCOS DA PESQUISA? Riscos são coisas que podem acontecer durante a pesquisa que não são boas. Este estudo tem risco de você se sentir desconfortável e tímido na hora de cuspir a saliva, mas você terá o tempo necessário que precisar e ficará em local tranquilo e ventilado. Se isso acontecer, por favor nos comunique para você decidir se quer continuar. Para evitar o risco de seu nome aparecer e saberem quem você é, guardaremos as informações em local seguro, na Faculdade de Odontologia da UFMG, e a sua saliva vai ser identificada por um número e não terá o seu nome. Ninguém além dos pesquisadores e dos seus responsáveis vai ficar sabendo que você está participando da pesquisa porque seu nome não vai aparecer.

Rubrica participante _____

Rubrica pesquisador _____

Pg 2/2

Se você tiver alguma dúvida sobre a pesquisa, entre em contato com: Profa. Célia Regina Moreira Lanza (3409-2427, 31 99698-1602) que é a responsável pelo estudo. Email celiamlanza@gmail.com

OUTRA PESSOA PARA CONTATO: Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (31) 3409-2610 E-mail: vasco@icb.ufmg.br

Persistindo alguma dúvida dos aspectos éticos da pesquisa você **poderá** contatar o COEP-UFMG – Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG– Av. Antônio Carlos, 6627.Unidade Administrativa II - 2º andar – sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901. **Tel: 3409-4592.** **Horário de atendimento de 09:00 as 11:00 e de 14:00 as 16:00 h .** E-mail: coep@prpq.ufmg.br

POR FAVOR FAÇA UM CÍRCULO EM TODAS AS RESPOSTAS QUE VOCÊ CONCORDA PARA AS PERGUNTAS A SEGUIR:

Você leu ou alguém leu pra você este termo?	Sim	Não
Você entendeu sobre o que trata esta pesquisa?	Sim	Não
Você fez todas as perguntas que teve vontade?	Sim	Não
Suas perguntas foram respondidas de forma clara para você?	Sim	Não
Você entendeu que poderá desistir de participar deste estudo a qualquer momento?	Sim	Não

Você concorda em participar?	Sim	Não
------------------------------	-----	-----

Se qualquer resposta for não ou se você não quiser participar, não assine seu nome.

Se você deseja participar do estudo, por favor, escreva seu nome e a data de hoje.

Nome do menor

Assinatura do menor

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (de 13 anos a 17 anos)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“Saliva como método de diagnóstico e monitoramento de condições bucais”**

POR QUE FUI CONVIDADO? Você está sendo convidado porque apresenta uma das condições bucais que estamos estudando.

QUAL O OBJETIVO DA PESQUISA?

O objetivo deste estudo é analisar como é a saliva nas pessoas que apresentam alterações na formação dos dentes. Sua participação pode ajudar os pesquisadores compreender melhor o papel da saliva nas doenças bucais e alterações dentárias e ajudar os pesquisadores a tentar desenvolver no futuro métodos diagnósticos mais simples e menos dispendiosos.

O QUE TEREI QUE FAZER?

Caso você concorde em participar do estudo iremos coletar 3 ml de sua saliva. Este procedimento (coleta material) pode levar até 10 minutos. Você deverá salivar em um tubo estéril individual. O material coletado será levado para um laboratório da UFMG, armazenado e analisado. Após as análises a saliva restante será descartada em água corrente.

SE VOCÊ NÃO QUISER PARTICIPAR, NÃO TEM PROBLEMA, VOCÊ NÃO TERÁ NENHUM PREJUÍZO EM SEU TRATAMENTO.

Se você não quiser mais participar, a qualquer momento, poderá vir na Faculdade de Odontologia, ou telefonar para os pesquisadores e informar. Você tem direito de saber tudo sobre seus exames. Você não pagará nada nem receberá nenhum tipo de pagamento para participar da pesquisa.

QUAIS OS RISCOS DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA?

A coleta da saliva pode causar algum desconforto como a timidez, mas você terá o tempo necessário para fazê-lo em local tranquilo e ventilado. Para evitar o risco de seu nome aparecer e saberem quem você é, guardaremos as informações em local seguro, na Faculdade de Odontologia da UFMG, e a sua saliva vai ser identificada por um número e não terá o seu nome.

COMO FUNCIONA O USO DO MEU MATERIAL EM PESQUISA?

Toda pesquisa que usar a sua saliva e suas informações será aprovada por um grupo de pessoas que avalia se a pesquisa é séria, chamado de Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

A pesquisa não irá divulgar o seu nome, mas será utilizada para divulgação em congresso, livros e revistas científicas. Sua família e você receberão todas as orientações a respeito do resultado.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Pg 2/2

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento ou dúvida que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa nos telefones: Celia Regina Moreira Lanza -

(31) 99698-1602, Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo (31) 3409-2610.

ESTE TERMO DEVERÁ SER ASSINADO EM DUAS VIAS IGUAIS, SENDO QUE UMA FICARÁ COM VOCÊ E OUTRA FICARÁ COM O PESQUISADOR.

EU _____, IDADE _____, CONCORDO EM PARTICIPAR DESSA PESQUISA NA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFMG.

ASSINATURA DA CRIANÇA OU ADOLESCENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA OU ADOLESCENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL PELA PESQUISA

Em caso de dúvidas sobre os aspectos éticos da pesquisa, você pode entrar em contato com:
COEP UFMG - Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, AV. Presidente Antônio Carlos,
6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901, Unidade Administrativa II - 2º Andar -
Sala: 2005, Telefone: (031) 3409-4592 - E-mail: coep@prpq.ufmg.br