

ESPECTROSCOPIA FT-IR DA SALIVA DE GÊMEOS DIZIGÓTICOS NO DIAGNÓSTICO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Maria Clara Simões Giovaneli Mendonça, Juliana Salgado Coelho Cotrin, Jader Manoel do Nascimento, Leandro José Raniero, Geraldo Magno Alves de Abreu, Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/Faculdade de Ciências da Saúde, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, mcsqm-11@hotmail.com; julianasalgadocoelho@gmail.com; jadermanumic2016@gmail.com; lraniero@univap.br; deabreumagno@gmail.com; mirela@univap.br.

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição do neurodesenvolvimento com diagnóstico baseado em avaliações clínicas comportamentais, que resultam em atraso no início das intervenções. Gêmeos dizigóticos são modelos ideais para estudos sobre o TEA, devido à semelhança na carga genética, permitindo investigar fatores epigenéticos e metabólicos presentes. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) surge como técnica promissora para identificar marcadores bioquímicos associados ao TEA de forma rápida, sensível e não invasiva. A saliva, fluido corporal, é uma amostra viável e de fácil coleta. Este estudo visa investigar fatores metabólicos que possam estar associados ao TEA, e permitam contribuir para seu diagnóstico seguro, específico e não invasivo. A metodologia envolveu coleta da saliva, preparo da amostra e análise espectral. Os resultados demonstraram que a espectroscopia FT-IR detectou alterações bioquímicas distintas entre o participante com TEA e o neurotípico, favorecendo a triagem com critérios específicos e incentivando a investigação de fatores epigenéticos e metabólicos que possam estar associados ao transtorno.

Palavras-chave: Autismo. FT-IR. Diagnóstico. Saliva. Gêmeos dizigóticos.

Área do Conhecimento: Odontologia

Introdução

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é classificado como um transtorno do neurodesenvolvimento, caracterizado por alterações que comprometem a comunicação e interação social, o aprendizado e o comportamento (American Psychiatric Association, 2014). O diagnóstico é multidisciplinar para seu correto estabelecimento, sendo necessário observar comportamentos e realizar comparações de acordo com diretrizes definidas no *DSM- 5*. Portanto, o diagnóstico do TEA é complexo, realizado por profissionais especializados, sendo essencialmente clínico e baseado na observação comportamental, em escalas padronizadas, o que pode atrasar a identificação precoce e o início das intervenções, resultando em diagnóstico tardio (Silva, 2022).

As pesquisas por métodos não invasivos vêm ganhando relevância na busca por marcadores bioquímicos, imunológicos e inflamatório em diferentes tipos de amostras biológicas, como sangue, urina, cabelo e saliva, na busca por diagnósticos específicos (Bjørklund *et al.*, 2018). A saliva, tem se destacado como excelente fluido biológico para diagnóstico. Além de atuar na proteção e limpeza da mucosa oral, apresenta ação antibacteriana e participa do início da digestão, contendo componentes biológicos que possibilitam detectar doenças bucais e sistêmicas (Zhang *et al.*, 2016). A coleta de saliva é relativamente fácil, em comparação a outros métodos invasivos, e causa menos ansiedade nos indivíduos, fator importante na atenção ao portador de TEA (Frazier *et al.*, 2021). Dessa forma, apresenta-se como amostra ideal para estudos diagnósticos dessa população, por ser de fácil obtenção, não invasiva e refletir o estado metabólico do organismo (Putnam *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) surge como uma técnica capaz de detectar alterações bioquímicas em fluidos biológicos com alta sensibilidade e especificidade (Baker, *et al.*, 2016). Estudos já demonstram o potencial do FT-IR como técnica de

análises bioquímicas na área da saúde, detectando vibrações de moléculas até mesmo para estudos de investigação em informações da composição de tecido, saliva, sangue e bactérias periodontais, expondo assim seu relevante papel nos estudos microbiológicos (De Abreu *et al.*, 2025, Pinto *et al.*, 2025).

Gêmeos dizigóticos tem relevância nesse estudo já que compartilham aproximadamente 50% do material genético, demonstrando ser um modelo valioso para investigar a contribuição de fatores ambientais e epigenéticos no TEA, adicionando a influência de fatores do Ambiente Não Compartilhado (ANC) entre pares de gêmeos (Robinson *et al.*, 2011). Estudos indicam que esses fatores podem alterar a genética comportamental, como demonstrado em testes com animais que evidenciaram a influência do ANC entre gêmeos, embora o número de estudos voltados para o TEA seja limitado (Bölte *et al.*, 2019; Tikhodeyev *et al.*, 2019). A epigenética, que busca identificar os efeitos do ambiente no genoma e no fenótipo, vêm se destacando em estudos atuais, apresentando relevante potencial como linha de investigação científica. Nesse contexto, busca-se identificar modificações epigenômicas relacionadas ao TEA, demonstrando não apenas fatores genéticos, mas também metabólicos e ambientais que contribuem para o futuro diagnóstico específico. Dessa forma, de acordo com Loke *et al.*, 2015, o potencial da epigenética, mesmo no estágio inicial, permitiria aprofundar a compreensão da etiologia do TEA e auxiliar na criação de biomarcadores para fins de diagnóstico (Loke *et al.*, 2015). Com base nessas premissas, este estudo visa investigar fatores epigenéticos e metabólicos que possam estar associados ao TEA, e permitam contribuir para o diagnóstico seguro, específico e não invasivo.

Metodologia

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob nº: CEP 7.069.519, CAAE: 69110423.5.0000.5503. O estudo foi desenvolvido com amostras de saliva provenientes de gêmeos dizigóticos, 15 anos de idade, um do sexo feminino, classificado como neurotípico, e um do sexo masculino, com diagnóstico de TEA. A coleta das salivas teve início após leitura, explicação e assinatura do Termo de Conhecimento Livre Esclarecido (TCLE), pelo responsável pelos participantes, bem como a leitura e assinatura do Termo de Assentimento (TA), pelos participantes. Todos foram orientados a respeitar um período de 2 horas sem ingestão de alimentos/líquidos, exceto água, evitando, ainda, a ingestão de alimentos com cafeína e a escovação dos dentes no período estipulado.

A coleta das amostras foi realizada em consultório odontológico, pelos membros da equipe de pesquisa, em atendimento individual. Após acomodação dos participantes, sentados confortavelmente, foi realizada a limpeza da cavidade bucal, com bochechos utilizando água filtrada, descartada na sequência. Os participantes foram orientados a manter a cabeça ligeiramente inclinada para a frente, permitindo o acúmulo da saliva não estimulada na cavidade bucal. Com o auxílio de pipeta Pasteur, foram coletados 1,5 mL de saliva, acondicionados em Eppendorf identificado e mantido em refrigeração até seu processamento. A saliva foi centrifugada (10min, 10.000 rpm, 20 °C) sendo o sobrenadante congelado a -80 °C até o momento da análise. Os espectros foram obtidos pelo espectrômetro FT-IR Spectrum Two da empresa PerkinElmer, acoplado a um ATR com cristal de diamante. As amostras de saliva foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas em agitador vórtex (30 s). Em seguida, 20 µL foram depositados no ATR de diamante, sendo desidratados por 10 minutos com fluxo de 1L/minuto de ar seco.

Figura 1- Equipamento utilizado para análise das amostras de saliva- Spectrum Two FT-IR (PerkinElmer).



Fonte: A autora (2025).

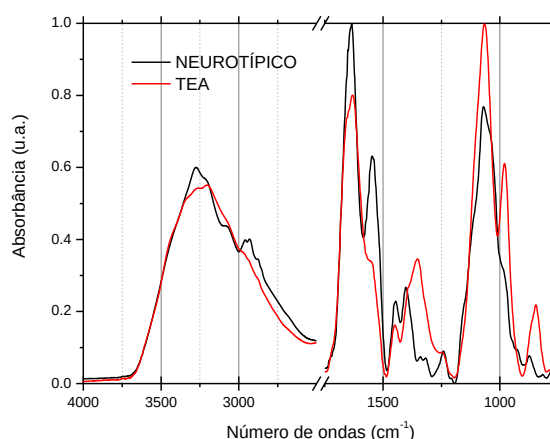
Os espectros foram obtidos por absorbância, no intervalo de 4000 a 750 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} . O background foi coletado com o cristal limpo, antes da obtenção de

cada espectro. Os dados obtidos foram processados no software OPUS (versão 4.2), permitindo comparação mais precisa entre os espectros.

Resultados

Os resultados obtidos mostraram diferenças na intensidade e/ou configuração das bandas de absorção ao longo de todo o espectro, como observado na Figura 2.

Figura 2- Espectros das amostras neurotípica e TEA.



Fonte: A autora (2025).

Na região entre 4000-3000 cm^{-1} observa-se, tanto para a amostra do TEA quanto da neurotípica, uma banda em $\sim 3250 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde a modos vibracionais de estiramento de grupos O-H de hidroxila, presentes principalmente na água, tendo contribuição de vibrações de carboidratos e proteínas em menor quantidade. São bandas bastante proeminentes e largas como visualizadas na figura 2. A região entre 3000-2900 cm^{-1} , na amostra neurotípica, apresenta bandas em 2962 e 2924 cm^{-1} , que correspondem a modos vibracionais de estiramento assimétrico de C-H em CH_3 e CH_2 respectivamente. Essas contribuições não foram detectadas na amostra TEA, observando-se perda de intensidade dos picos nesta região do espectro (Figura 2).

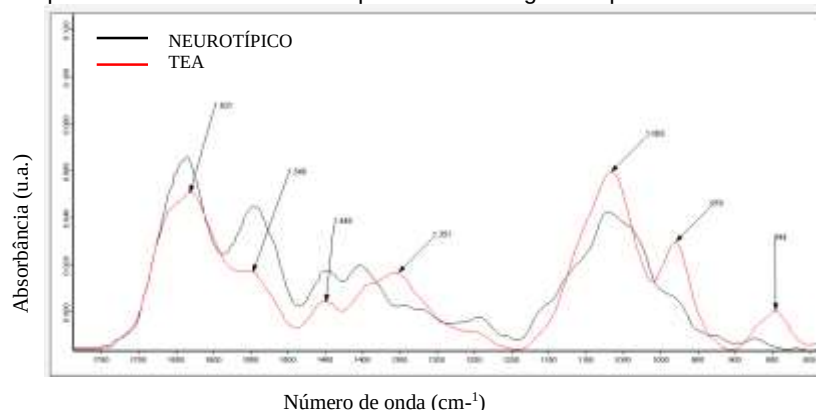
As principais diferenças entre as bandas são visualizadas na região espectral entre 1800-800 cm^{-1} , como demonstrado pela ampliação dessa região (Figura 3). Diferenças de intensidade e contorno de bandas podem ser observadas entre 1800 e 1500 cm^{-1} , que exibem vibrações de moléculas de amida I (1631 cm^{-1}) e amida II (1546 cm^{-1}) presentes em proteínas, ribossomos, inclusões e outras estruturas proteicas presentes na amostra. Nessa região, a amostra TEA exibiu perda de intensidade no pico 1631 cm^{-1} e ausência do pico em 1546 cm^{-1} (Figura 3).

A região entre 1500-1300 cm^{-1} apresentou vibrações de deformação de C-H de CH_2 e estiramento simétrico de C=O de COO^- , presentes em moléculas de lipídios e proteínas de apêndices proteicos. No entanto, em 1448 cm^{-1} , o espectro TEA apresentou perda da intensidade do pico em relação a amostra neurotípica, enquanto no comprimento de onda em 1351 cm^{-1} a amostra TEA exibiu uma banda que não está presente no espectro neurotípico.

As bandas na região de 1200-900 cm^{-1} estão relacionadas a estiramentos simétricos e assimétricos de vibrações P=O de grupos PO_2 de ligações fosfodiéster, presentes em ácidos nucleicos, e vibrações C—O—C, C—O—H, C—O, C—O—P e P—O—P de vários oligossacarídeos e polissacarídeos presentes na saliva. As diferenças identificadas nesta região podem ser interpretadas principalmente por diferenças de oligopolissacarídeos resultantes da quebra de carboidratos e presentes na amilase salivar.

Essa faixa espectral é conhecida como região de especificidade, principalmente entre 900-750 cm^{-1} , por apresentar picos exclusivos conforme a amostra estudada, conferindo identidade para a amostra. São picos altamente variáveis e muitas vezes com sobreposições de absorções de vibrações de diferentes moléculas.

Figura 3: Espectros das amostras neurotípico e TEA – região ampliada de 1800-800 cm^{-1} .



Fonte: A autora (2025).

Tabela 1- Valores de número onda em cm^{-1} e atribuição dos modos vibracionais das principais moléculas presentes na saliva do TEA, região ampliada de 1800-800 cm^{-1} .

Item Nº de onda (cm^{-1})	Modos Vibracionais	Moléculas Salivares
1631	$\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{NH})$ Amida I de estruturas folhas β -pregueadas	- Proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA). - Proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA).
1545	$\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CN})$ Amida II	-Proteínas (grupos metil); -Lipídios; -Hormônios (Cortisol).
1448	$\delta(\text{CH}_3)$ $\delta(\text{CH}_2)$	- Proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA). - Hormônios (cortisol, testosterona). - Carboidratos
1351	$\nu(\text{COO}^-)$, $\delta(\text{CH}_2)$	- Fosfatos inorgânicos, fosfolipídios (lipídios de membrana) e grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos (esqueleto açúcar-fosfato).
1065	$\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$, $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$, $\delta(\text{COH})$ $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$, $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CO-O-C})$	- Fosfatos inorgânicos; - Ácidos nucleicos e proteínas.
978	$\nu(\text{PO}_2^-)$ $\nu(\text{PO}_4)$, $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CH}_2\text{OH})$	Alterações na composição de proteínas, lipídios, glicoconjugados
844	$\nu(\text{COC})$	

Legenda: ν = vibrações de estiramento; δ = vibrações de deformação angular; s = vibrações simétricas; as = vibrações assimétricas. Para as atribuições dos modos vibracionais foram utilizadas as seguintes referências: (Pinto *et al.*, 2021.)

Fonte: A autora (2025).

Discussão

Os resultados mostram diferenças nos espectros salivares de indivíduos TEA e neurotípicos como demonstrado em pesquisas anteriores (Pinto *et al.*, 2025), corroborando com os resultados do presente estudo e salientando o potencial da ferramenta FT-IR como método para diagnóstico precoce desse transtorno (Pinto, 2022). Na região entre 4000-3000 cm^{-1} , pode-se observar menor intensidade do pico e perda do contorno de banda na amostra TEA em relação ao neurotípico. Essa região correspondente a modos vibracionais de estiramento de grupos O-H de hidroxila, provenientes principalmente da água presente na amostra, sugerindo que a amostra TEA teve menor quantidade no teor de água em relação ao neurotípico. Essa condição da redução da hidratação na saliva é recorrente em portadores do TEA,

nos quais a solubilidade da saliva é comprometida por xerostomia, desidratação, menor concentração de água disponível, uso contínuo de medicamentos, alterações hormonais e gastresofágicos (De Sousa Moreira, 2025; Bel'skaya *et al.*, 2020).

Na região espectral 1631 cm^{-1} (Amida I), e entre 1545 cm^{-1} (Amida II), foram observadas menores intensidades nos picos da amostra TEA quando comparada a amostra neurotípica, indicando possível redução no conteúdo proteico da saliva no TEA ou alteração de estruturas proteicas específicas como a folha-beta de estrutura secundária, uma vez que esta é uma região de vibrações moleculares de peptídeos de proteínas (Pinto *et al.*, 2021). Outro fator, presente em ambas as regiões, e que pode estar relacionado com a menor intensidade dos picos no grupo TEA, é a redução da Imunoglobulina A secretora (SIgA), anticorpo fundamental para a saúde sistêmica, que atua na primeira linha de defesa da saliva, formando uma barreira imunológica. Estudos revelam níveis séricos reduzidos desse anticorpo durante a disbiose gastrointestinal, apresentando níveis significativamente baixos em pacientes com TEA, representando relevante valor de diagnóstico para essa população (Gong *et al.*, 2021; Bel'skaya *et al.*, 2020).

No comprimento de onda de 1351 cm^{-1} observa-se o pico proeminente na amostra TEA atribuído fortemente à deformação simétrica do CH_3 e que está presente na amostra neurotípica de forma discreta e com perda do contorno do pico. Essa região está relacionada a vibrações moleculares de proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas) e de resíduos de aminoácidos de cadeia laterais contendo grupos metil (alanina, valina, leucina, isoleucina), presentes na saliva e que podem ter contribuído na intensidade do pico. O aumento da intensidade e as variações no pico da amostra TEA também podem ter sofrido contribuição de vibrações moleculares relacionadas ao hormônio testosterona e cortisol, o que é relevante neste estudo, dado que a amostra analisada é do indivíduo TEA do sexo masculino (Bel'skaya *et al.*, 2020).

O aumento de oligopolissacarídeos decorrentes da quebra de carboidratos pela amilase salivar, pode ter contribuído na variação de intensidade dos picos observados na faixa entre $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$. A fermentação dos oligossacarídeos promove acidificação da cavidade bucal, colonização de bactérias e aumento no risco de cárie dentária (Scannapieco, Torres e Levine, 1993) justificando maior prevalência de placa bacteriana e elevados índices de gengivite no indivíduo com TEA (Barbosa *et al.*, 2022).

Acresce que, na banda em 1065 cm^{-1} observa-se aumento da intensidade na amostra TEA em relação à neurotípica, região de vibração de estiramento simétrico do grupo fosfato (P=O) do esqueleto de DNA, RNA e de fosfolípidios, estando diretamente relacionado com o material genético e membranas celulares, podendo ser interpretado como assinatura vibracional da amostra analisada. Esse pico pode ser usado como biomarcador para o TEA, embora sejam necessários estudos futuros com número amostral significativo para sua validação como biomarcador (Rekha *et al.*, 2018; Bel'skaya *et al.*, 2020).

Uma hipótese para as diferenças detectadas entre os picos das amostras TEA e neurotípica, em 978 cm^{-1} , podem ser relacionadas às diferenças metabólicas e de expressão gênica de cada indivíduo. O estresse oxidativo, em níveis elevados, e o metabolismo alterado dos portadores de TEA podem levar a alterações no metabolismo e danos ao DNA/RNA, principalmente na espinha dorsal dos ácidos nucleicos, região de ligação P-O-C , que conecta essas unidades e que vibram neste comprimento de onda. Nucleotídeos livres, como o ATP, também vibram nessa região e podem ter contribuído com o pico intenso na amostra TEA (Rekha *et al.*, 2018; Bel'skaya *et al.*, 2020). O pico em 978 cm^{-1} também se destaca como potencial biomarcador para o TEA.

Os resultados também mostraram diferenças em contorno, intensidade e posição exata do pico no comprimento de onda 844 cm^{-1} , que podem estar associadas a diferenças no padrão de expressão ou na estrutura de biomoléculas. Estudos mostram que diferenças significativas nessa região sugerem alteração na concentração ou no tipo de glicoproteínas presentes na saliva ou, ainda, alteração no perfil da glicosilação, na forma como os açúcares se ligam as proteínas, processo esse que tem papel preponderante na função proteica, incluindo sinalização celular e interações imunológicas, alteradas no indivíduo portador de TEA (Rekha *et al.*, 2018; Bel'skaya *et al.*, 2020).

Assim, de acordo com a análise dos resultados, foi possível identificar variações de intensidade e/ou forma dos picos analisados. Essas diferenças podem servir como indicadores espectroscópicos de possíveis alterações na composição e estrutura de importantes biomoléculas na saliva de indivíduos com TEA. Diante disso, é possível compreender que futuros estudos para aprofundar a investigação são necessários, confirmando que a espectroscopia por FT-IR da saliva permite reduzir distorções e sustentar o perfil do TEA com particularidades metabólicas ligadas a esse transtorno.

Conclusão

A análise da saliva por espectroscopia FT-IR demonstra potencial como ferramenta adjuvante de baixo custo no diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista, identificando alterações metabólicas associadas a essa alteração, permitindo contribuir para seu diagnóstico seguro, específico e não invasivo.

Referências

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. American psychiatric association, 2013.

BAKER, M.J., et al. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. **Chemical Society Reviews**. 2016;45(7):1803–1818

BARBOSA, Mainara Alves et al. Autistic spectrum disorder children and adolescents' oral health characteristics—scoping review. **International Journal of Developmental Disabilities**, v. 70, n. 3, p. 329-342, 2024.

BJØRKLUND, Geir et al. Diagnostic and severity-tracking biomarkers for autism spectrum disorder. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 66, n. 4, p. 492-511, 2018.

BÖLTE, S.; GIRDLER, S.; MARSCHIK, P.B. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 1275–1297, 2019.

DA SILVA, Natália Matos. Dificuldade no diagnóstico precoce do Transtorno do Espectro Autista. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v. 16, p. e11000-e11000, 2022.

DE SOUSA MOREIRA, Carolina Cerqueira. Condições bucais clínicas de pacientes com diferentes necessidades especiais: revisão integrativa de literatura. **Revista Contemporânea**, v. 5, n. 3, p. e7629-e7629, 2025.

FRAZIER, Thomas W. et al. Evidence-based use of scalable biomarkers to increase diagnostic efficiency and decrease the lifetime costs of autism. **Autism Research**, v. 14, n. 6, p. 1271-1283, 2021.

GONG, Wuyi et al. The alteration of salivary immunoglobulin A in autism spectrum disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, p. 669193, 2021.

LOKE, Yuk Jing; HANNAN, Anthony John; CRAIG, Jeffrey Mark. The role of epigenetic change in autism spectrum disorders. **Frontiers in neurology**, v. 6, p. 107, 2015.

PINTO JR, Mayara Moniz Vieira et al. Saliva diagnosis of autistic spectrum disorder by FT-IR spectroscopy. In: **Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications XIII**. SPIE, 2021. p. 15-21.

PUTNAM, Susan K. et al. Comparison of saliva collection methods in children with high-functioning autism spectrum disorders: acceptability and recovery of cortisol. **Child Psychiatry & Human Development**, v. 43, n. 4, p. 560-573, 2012.

ROBINSON, Elise B. et al. Evidence that autistic traits show the same etiology in the general population and at the quantitative extremes (5%, 2.5%, and 1%). **Archives of general psychiatry**, v. 68, n. 11, p. 1113-1121, 2011.

SCANNAPIECO, Frank A.; TORRES, Guillermo; LEVINE, Michael J. Salivary α -amylase: role in dental plaque and caries formation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 4, n. 3, p. 301-307, 1993.

SOCRATES, George. **Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts**. John Wiley & Sons, 2004.

TIKHODEYEV, Oleg N.; SHCHERBAKOVA, Olga V. The problem of non-shared environment in behavioral genetics. **Behavior genetics**, v. 49, n. 3, p. 259-269, 2019.

ZHANG, Chen-Zi et al. Saliva in the diagnosis of diseases. **International journal of oral science**, v. 8, n. 3, p. 133-137, 2016.