

DOUGLAS VIEIRA DE MOURA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA PARA
TRIAGEM DIAGNÓSTICA DA SEPSE PELA SALIVA BASEADA
EM ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

*Development of a biophotonic platform for salivary diagnosis of sepsis
based on artificial intelligence algorithms*

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

UBERLÂNDIA

2022

DOUGLAS VIEIRA DE MOURA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA PARA
TRIAGEM DIAGNÓSTICA DA SEPSE PELA SALIVA BASEADA
EM ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

*Development of a biophotonic platform for salivary diagnosis of sepsis
based on artificial intelligence algorithms*

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

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino Silva

Coorientador: Prof. Dr. Murilo Guimarães Carneiro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robinson Sabino Silva

Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Profa. Dra. Thaís Christina Cunha

UBERLÂNDIA

2022



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 416, PPGODONTO				
Data:	Quatorze de Dezembro de Dois Mil e Vinte e Dois	Hora de início:	16:30	Hora de encerramento:	18.20h
Matrícula do Discente:	12012ODO004				
Nome do Discente:	Douglas Vieira de Moura				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de plataforma biofotônica para triagem diagnóstica da sepse pela saliva baseada em algoritmos de inteligência artificial				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Processo de Reparo				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Processo de Reparo				

Reuniu-se em Web Conferência pela plataforma Zoom, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, assim composta: Professores Doutores: Priscilla Babosa Ferreira Soares (UFU); Thaís Christina Cunha (UNA); Robinson Sabino da Silva (UFU); orientador(a) do(a) candidato(a).

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

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

Aprovado.

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/12/2022, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais Christina Cunha, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4119263** e o código CRC **E47137C2**.

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

M929 2022	<p>Moura, Douglas Vieira de, 1995- DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA PARA TRIAGEM DIAGNÓSTICA DA SEPSE PELA SALIVA BASEADA EM ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL [recurso eletrônico] / Douglas Vieira de Moura. - 2022.</p> <p>Orientadora: Robinson Sabino Silva. Coorientadora: Murilo Guimarães Carneiro. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.653 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Odontologia. I. Silva, Robinson Sabino, 1981-, (Orient.). II. Carneiro, Murilo Guimarães, 1988-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p>CDU: 616.314</p>
--------------	--

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Cleuber e Márcia e ao meu irmão Diêgo, por serem a família que Deus me permitiu crescer, evoluir, por serem meu porto seguro, e por sempre me apoiarem nos meus sonhos.

Dedico aos meus avós paternos, maternos e toda minha família, que sempre me acompanharam em toda trajetória profissional dando apoio, e me fortalecendo cada dia mais.

Dedico aos meus alunos, amigos, e todos que me acompanharam durante este período, que me proporcionou uma evolução imensurável, e que vocês possam se inspirar pois nós somos o futuro, e através da educação e a pesquisa podemos colaborar para um crescimento mútuo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de viver, e me proporcionar uma família maravilhosa que tanto me ama e me encoraja a seguir meus sonhos, agradeço aos meus pais Cleuber e Márcia, ao meu irmão Diêgo, aos meus avós Anésio e Maria Aparecida, Eurípades e Ilaídes (a senhora não está mais presente entre nós mas esteve durante toda minha formação me apoiando e rezando sempre para que pudesse seguir cada dia mais firme e forte nos meus objetivos).

Agradeço aos meus amigos Nilson Neto, Kamilla França, que foram e sempre serão fundamentais durante esta carreira onde me acolheram e estiveram ao meu lado em um momento muito difícil, Frederico Neto, Iara Rodrigues, Sandro Henrique e Gyovanna vocês são minha família que pude escolher que posso contar que eu amo.

Agradeço ao meu orientador Professor Robinson, por todo conhecimento passado, pela paciência, pelo companheirismo e empatia que sempre teve por mim, o senhor foi e sempre será além de um orientador, eu o admiro muito.

Agradeço a toda a equipe que me ajudou durante todo desenvolvimento do trabalho Léia Cardoso, Douglas Caixeta, Marco por toda paciência e comprometimento que tiveram por mim, por me entender quando eu não podia e sempre dispostos a me ajudar, e encaixar nossos horários para que pudesse dar certo a pesquisa, gratidão sempre.

Agradeço toda equipe FOUFU, professora Priscilla por sempre desenvolver um trabalho com muita seriedade com nós pós-graduandos, as secretárias Brenda e Laís que sempre nos ajudam, nos orientam e nos mantêm calmos, as técnicas do ICBIM Simone e Isabela por todo conhecimento que me foi passado durante todo meu percurso, gratidão a vocês.

Agradeço toda minha família, tias, tios, primos e amigos que sempre estiveram ao meu lado me motivando, e não deixando eu desistir.

Agradeço por último a minha psicóloga Fernanda que durante essa trajetória foi fundamental para manutenção e minha saúde mental, me

aconselhando e tornando a jornada mais leve; e a uma família que sempre foi minha válvula de escape, onde eu pude aliviar a mente e manter me conectado corpo e mente CF MOVE, onde este box fez e faz total diferença na minha jornada de vida, aos meus coachs Lucas e Renan, aos meus amigos que ali pude conhecer, Tcheco, Tati, Leticia, Fernando, Mylena, Ana Flávia e todos que fazem parte desta grande família que eu amo e sou grato.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO / PALAVRAS-CHAVE.....	11
ABSTRACT / KEYWORDS.....	12
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2. CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1.....	16
a. Abstract.....	17
b. Introduction.....	18
c. Methods.....	19
d. Results.....	22
e. Discussion.....	27
f. Conclusion.....	29
g. Acknowledgements.....	29
h. References.....	30
REFERÊNCIAS - INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	34

RESUMO

Sepse é caracterizada como uma síndrome clínica resultante de uma resposta inflamatória sistêmica devido a um foco de infecção. A hipótese deste estudo foi de que a saliva pode ser utilizada como biofluido diagnóstico associada a uma plataforma biofotônica sustentável e rápida para o diagnóstico da sepsé. O objetivo foi desenvolver uma plataforma de diagnóstico pela saliva utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR) associada com análises univariadas, multivariadas e inteligência artificial. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar (~260g) foram divididos em controle (n=7) e sepsé (n=7). O grupo sepsé foi submetido a cirurgia de ligadura e punção cecal (CLP) e os controles à cirurgia SHAM. Após 24 horas, com o animal anestesiado a saliva foi coletada durante 7 minutos e analisada no ATR-FTIR. Foi observado por meio da análise de componentes principais (PCA) uma separação clara entre controles e sepsé. A soma de PC-1 e PC-2 foi responsável por 95,4% da variância total explicada entre as amostras. O modo vibracional CH₂ derivado de lipídios reduziu no grupo sepsé (2933cm⁻¹) baseado na análise de segunda derivada, evidenciando possíveis alterações do metabolismo de lipídios em decorrência da sepsé. A análise pelo algoritmo de máquina de vetores de suporte (SVM) apresentou sensibilidade 0,72%, especificidade 100% e acurácia 0,87%. A análise pelo algoritmo de Análise Discriminante Linear (LDA) apresentou sensibilidade de 0,67%, especificidade de 0,95% e acurácia de 0,82%. **Conclusão:** Portanto, a utilização da plataforma ATR-FTIR acoplada com algoritmos de inteligência artificial pode ser uma ferramenta alternativa para triagem diagnóstica da sepsé por meio da saliva.

Palavras-Chaves: Saliva, Sepsé, Diagnóstico, ATR-FTIR, Inteligência Artificial

ABSTRACT

Sepsis is characterized as a clinical syndrome resulting from a systemic inflammatory response due to a focus of infection. The hypothesis of this study was that saliva can be used as a diagnostic biofluid associated with a sustainable and rapid biophotonic platform for the diagnosis of sepsis. The aim of present study was to develop a diagnostic platform using Fourier transformed infrared spectrometry with total saliva reflectance (ATR-FTIR) associated with univariate and multivariate equipment and artificial intelligence. Materials and Methods: Wistar rats (~260g) were divided into control (n=7) and sepsis (n=7). The sepsis group underwent cecal ligation and puncture surgery (CLP) and controls underwent SHAM surgery. After 24 hours, with the animal anesthetized, saliva was collected for 7 minutes and analyzed in the ATR-FTIR. A clear separation between controls and sepsis was observed through principal component analysis (PCA). The sum of PC-1 and PC-2 was responsible for 95.4% of the total explained variance between samples. The vibrational mode of CH₂ of lipids was reduced in the sepsis group (2933cm⁻¹) by second derivative analysis, showing possible alterations in lipid metabolism as a result of sepsis. Analysis by the Support Vector Machine (SVM) algorithm showed sensitivity of 0.72%, specificity of 100% and accuracy of 0.87%. Analysis using the Linear Discriminant Analysis (LDA) algorithm showed a sensitivity of 0.67%, specificity of 0.95% and accuracy of 0.82% Conclusion: Therefore, the use of the ATR-FTIR platform coupled with artificial intelligence algorithms can be an alternative tool for diagnostic screening of sepsis using saliva.

Key words: Saliva, Sepsis, Diagnosis, ATR-FTIR, Artificial intelligence

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS), a sepse é uma resposta sistêmica decorrente de infecção por bactérias, vírus, fungos ou protozoários. A sepse pode se manifestar em diferentes estádios clínicos, o que torna o diagnóstico médico complexo e é considerada um grande problema de saúde pública (1). A sepse apresenta alta taxa de mortalidade e gera altos custos com seu tratamento para os setores público e privado. Sabe-se que a detecção precoce pode favorecer um melhor prognóstico e reduzir custos de tratamento (2). Dados do ILAS registraram 398.000 casos e 227.000 mortes em 2003 relacionado a sepse no Brasil, gerando cerca de R\$17,34 bilhões ao tratamento, devido a necessidade de equipamentos sofisticados, medicações e equipes especializadas. Desde o ano de 2020, o conceito de sepse passou a ser caracterizado por uma disfunção orgânica ocasionada por uma resposta alterada do hospedeiro frente à uma infecção (3), assim foi estabelecido uma nova nomenclatura: sepse e choque séptico. Estima-se que a ocorrência anual de aproximadamente 670 mil casos por ano de sepse, sendo que em média 50% vão a óbito, o que corresponde a cerca de 30,2% de ocupação dos leitos em Unidades de Terapia Intensiva (2). No período de 2005-2020 foram registrados 120.166 casos de sepse, já o ano de 2021 foi notificado 12.458 casos no Brasil (4).

A sepse pode gerar um dano mitocondrial, o que justifica como uma das principais causas de distúrbios do metabolismo celular dos pacientes infectados. Estes danos acontecem devido as constantes mudanças do metabolismo de todos macronutrientes afeta também o metabolismo lipídico, gerando lipólise na região adiposa o que pode gerar um aumento no nível sanguíneo de ácidos graxos e triglicérides. Este quadro de infecção se desenvolve através de fungos, bactérias, vírus ou protozoários e que pode resultar a falência múltiplas dos órgãos ou choque séptico que ocorre devido a um quadro de hipotensão persistente ou hiperlactemia independente da ressuscitação volêmica (5)

O processo inflamatório é crucial para a eliminação de patógenos e manutenção da homeostase tecidual. Mas é importante ressaltar que se a progressão de eventos patofisiológicos progredir de forma exacerbada, devido à presença de estímulos pró-inflamatórios, o processo pode ter uma evolução para um estado de inflamação crônica associada com secreção contínua de citocinas e outros fatores que podem gerar uma contínua destruição dos tecidos e do seu equilíbrio (6). Durante o processo inflamatório/infeccioso da sepse ocorre a formação de citocinas pró-inflamatórias relevantes tais como: interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de crescimento tumoral (TNF).

Os tratamentos para esta infecção são limitados a administração de antibióticos direcionados à fonte infecciosa e cuidados de suporte para a disfunção orgânica, o tratamento empregado de antibioticoterapia muitas vezes pode ser ineficaz devido a não especificidade da medicação com o seu foco infeccioso o que pode levar alguns dias para conduta específica, devido o diagnóstico tardio (7).

Os exames laboratoriais bioquímicos no sangue são solicitados tradicionalmente para o diagnóstico e monitoramento de diversas doenças sistêmicas, inclusive a sepse. Por outro lado, a saliva tem sido sugerida como um biofluido promissor como alternativa para diagnósticos e monitoramento de patologias. A saliva é um fluido biológico complexo, derivada em sua maior parte da estimulação de células acinares de glândulas salivares, além dos contribuintes exócrinos como: células epiteliais descamadas e proteínas derivados do plasma sanguíneo e fluido gengival crevicular (8). Sendo assim a utilização da saliva como fluido diagnóstico apresenta como vantagens sua auto-coleta indolor, de forma simples, custo reduzido e mais segura ao paciente e equipe médica. Além disto, a saliva é permite múltiplas coletas ao longo dia e pode apresentar potenciais biomarcadores de doenças sistêmicas, o que permite diagnóstico aplicado a medicina e odontologia de precisão (9). A detecção precoce da infecção desempenha um papel crucial no sucesso da terapia. Quando se trata de sepse quanto antes diagnosticado e iniciado o tratamento maiores serão as probabilidades de reversão do quadro e assim evitando o óbito do paciente, desta doença que causa tanta mortalidade a nível mundial.

A utilização da técnica de espectroscopia infravermelho com transformada em Fourier (ATR-FTIR) para análise de amostras biológicas de tecido é uma área de pesquisa com grande expansão, pois é possível estudar composição molecular das amostras e a proporção de seus compostos de forma rápida e com baixa quantidade de recursos em cada amostra (10).

A ATR-FTIR é uma tecnologia sustentável devido aos processos que não utilizam o uso de reagentes, o que proporciona uma abordagem abrangente que pode ser aplicada para diagnóstico e monitoramento de doenças. Os modos vibracionais espectrais de IR de amostras biológicas como saliva, podem ser considerados como impressões digitais bioquímicas que se está ligada diretamente com a presença ou ausência de doenças. Já reflectância total atenuada (ATR) é uma técnica de amostragem usada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho que permite a análise das amostras de forma rápida, com alta sensibilidade e com análise de baixo custo, pois não necessita o uso de reagentes (10).

Desta forma, o presente trabalho buscou desenvolver uma plataforma biofotônica sem uso de reagentes, sustentável, rápida e de adequado custo-benefício para o diagnóstico da sepse por meio de um biofluido não-invasivo por meio da saliva.

2. CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1

Development of a biophotonic platform for salivary diagnosis of sepsis based on artificial intelligence algorithms

Moura, D.V.¹, Cardoso-Sousa L.¹, Caixeta D.C.¹, Lima-Filho R.B.², Carneiro M.G.², Sabino-Silva R.¹.

¹Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

² Computer Science College, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

***Corresponding Author:**

Robinson Sabino-Silva
Federal University of Uberlandia (UFU)
Institute of Biomedical Sciences (ICBIM)
Av. Pará, 1720, Umuruama Campus
38400-902
Uberlandia, MG, Brazil
E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract word count: 228

Total word count: 2676

Total number of tables/figures: 4

Number of references: 24

Key words: Saliva, Sepsis, Diagnosis, ATR-FTIR, Artificial Inteligence

ABSTRACT

Sepsis is characterized as a clinical syndrome resulting from a systemic inflammatory response due to a focus of infection. The hypothesis of this study was that saliva can be used as a diagnostic biofluid associated with a sustainable and rapid biophotonic platform for the diagnosis of sepsis. The aim of present study was to develop a diagnostic platform using Fourier transformed infrared spectrometry with total saliva reflectance (ATR-FTIR) associated with univariate and multivariate equipment and artificial intelligence. Materials and Methods: Wistar rats (~260g) were divided into control (n=7) and sepsis (n=7). The sepsis group underwent cecal ligation and puncture surgery (CLP) and controls underwent SHAM surgery. After 24 hours, with the animal anesthetized, saliva was collected for 7 minutes and analyzed in the ATR-FTIR. A clear separation between controls and sepsis was observed through principal component analysis (PCA). The sum of PC-1 and PC-2 was responsible for 95.4% of the total explained variance between samples. The vibrational mode of CH₂ of lipids was reduced in the sepsis group (2933cm⁻¹) by second derivative analysis, showing possible alterations in lipid metabolism as a result of sepsis. Analysis by the support vector machine (SVM) algorithm showed sensitivity of 0.72%, specificity of 0.86% and accuracy of 0.79%. Conclusion: Therefore, the use of the ATR-FTIR platform coupled with artificial intelligence algorithms can be an alternative tool for diagnostic screening of sepsis using saliva.

INTRODUCTION

Sepsis is inflammatory organ dysfunction related to an excessive and dysregulated host response to infection (Fleischmann-Struzek et al. 2020). SOFA score has been used to detect organs dysfunction, and sepsis is confirmed when is detected in two or more organs. The late diagnosis and absence of therapeutic management promptly can induce septic shock, systemic organs damage and death (Cardoso-Sousa et al. 2019; Rudd et al. 2020). The prevalence of sepsis worldwide is difficult to ascertain, the expected occurrence by year is around ~50 million cases with 11 million deaths caused by sepsis, representing sepsis-related deaths worldwide, which accounted for up to 20% of all deaths in the world (Rudd et al. 2020). In this context, it was evidenced a substantial disparity in the regional incidence and mortality rates with up to 85% of sepsis cases and global deaths related to sepsis in low- and middle-income countries (Rudd et al. 2020).

Saliva contains thousands of peptides due to the action of enzymes derived from more than 3000 proteins, thousands of mRNA, dozens of microRNAs, hundreds of metabolites, carbohydrates, lipids, and more than 600 species of microorganisms, including viruses, bacteria, and fungi. The secretions of each component can be changed by specific disease reflecting both oral and systemic pathophysiological conditions (Dawes and Wong 2019; Caixeta et al. 2021). The non-invasive salivary collection is simple, permits self-collection, is a non-aerosol generating procedure, painless, and, compared to blood, permits a more sustainable collection, more adequate to store, and no risk of clotting. In this context, the real-time monitoring of salivary components could be an attractive alternative for screening and monitoring systemic (Caixeta et al. 2020; Caixeta et al. 2021).

Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FITR) spectroscopy is a valuable analytical approach to measure biological molecules in biofluids (Ojeda and Dittrich 2012). ATR-FTIR spectroscopy is a accurate and highly reproducible approach capable to identify molecules based on infrared absorption (Ojeda and Dittrich 2012). Each biofluid component present a unique structure, exhibiting a unique infrared spectrum with specific vibrational modes

profile derived of structural bonds of biofluid components (Severcan et al. 2010; Ojeda and Dittrich 2012). Among the attractive green technologies, ATR-FTIR is remarkable by the complete elimination of hazardous elements in the procedure to detect diseases (Caixeta et al. 2020; Muraoka et al. 2022). The salivary infrared spectre is able to recognize a biochemical fingerprint that correlate directly with the presence or absence of specific components or diseases, allowing the monitoring of systemic diseases (Caixeta et al. 2020; Muraoka et al. 2022).

We hypothesized that biophotonic infrared approach is determine alteration in vibrational modes of saliva to be used as a screening tool for sepsis. In the present study, ATR-FTIR was applied coupled with univariate analysis, chemometrics, and artificial intelligence algorithms to discriminate salivary spectra of rats with cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis compared to Sham control rats to develop a non-invasive and label-free platform for sepsis screening.

METHODS

Animal procedures

All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (Approval No. #0034/20). The male Wistar rats with body weight between 230g and 260g received randomly (i) cecal ligation and puncture surgery (CLP) to trigger polymicrobial sepsis and (ii) simulated surgery without cecal ligation and puncture (Siempos et al. 2014; Pereira et al. 2017). Body temperature was maintained at $36.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ with heating blanket during subsequent surgical procedures. In the procedures for sepsis induction by CLP model, rats were anesthetized with intraperitoneal administration of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) (Cardoso-Sousa et al. 2019). Subsequently, an aseptic midline laparotomy was performed for the exteriorization of a portion of the cecum which was placed outside of abdominal cavity to a partially ligation without complete intestinal

obstruction in the region of ileo cecal valve using a 3.0 silk tie (Pinheiro et al. 2020). This region of cecum was perforated 9 times using a 22-gauge needle associated with a gently squeezed to extrude feces from the induced perforation, allowing the presence of fecal components in abdominal cavity when cecum returned to the peritoneal region. A careful suture was performed to close the previous incision. Sham animals underwent the same procedure; however, cecum was not ligated and perforated (Walley et al. 1996; Pereira et al. 2017). After the surgical procedure, both sepsis and sham animals were injected with tramadol 5mg/300g as analgesic medication, which was reapplied every 12 hours until euthanasia

All rats were caged and allowed with free access to standard diet for rodents (Nuvilab CR-1; Nuvital, Curitiba, Brazil) and water. The rats were checked every six hours for 24 hours after the CLP (24h-Sepsis) or Sham procedures. Twelve hours after the CLP or Sham procedures all rats received a subcutaneous injection of Tramadol 5 mg/kg allowing ethical procedures and aiding analgesia. Both CLP and Sham rats were studied 24 hours after induction of sepsis (Cardoso-Sousa et al. 2019; Pinheiro et al. 2020). During the analysis of the behavior of the animals after the surgery, we checked if the animal presented 2 or more signs of suffering as hunched posture, vocalization, ataxia, tremor, cyanosis or piloerection. In case of presence of suffering, a humane endpoint should be considered. However, we did not detect any signal of suffering in both 24h-Sepsis and Sham animals (Cardoso-Sousa et al. 2019).

Saliva and Blood Collection

Twenty-four hours after CLP and Sham procedures, 7 rats from 24h-Sepsis and Sham groups were anesthetized with ketamine and xylasin (90mg/kg and 10 mg/kg, respectively) and subsequently stimulated saliva was collected under a muscarinic receptor agonist stimulation with pilocarpine (2mg/kg). The parasympathetic-stimulated saliva was collected directly from the oral cavity into polypropylene flasks for 7 min. Thus, saliva was stored at -80°C for further processing and analysis (Sabino-Silva et al. 2013).

Subsequently, the blood was collected under cardiac puncture and pro-inflammatory cytokines were performed to identify the severity of sepsis in each animal. (Cardoso-Sousa et al. 2019).

Cytokine analyses

Plasma samples were simultaneously measured to reduce variation in different assays. Pro-inflammatory cytokines TNF- α , Interleucin 1-beta (IL-1 β) and IL-6 of plasma were measured. Ten microliters of plasma were placed in a microplate and the absorbance after the immunoassay was performed in a GENESYS 10S UV-VIS spectrophotometer in a wavelength of 595nm. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to measure TNF- α , IL-1 β and IL-6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in plasma according to the manufacturer's protocol. Results were interpolated from a standard curve using recombinant cytokines (pg/mL).

Chemical profile in stimulated saliva by ATR-FTIR spectroscopy

Salivary spectra were recorded between 3700 cm^{-1} to 800 cm^{-1} regions using a portable ATR-FTIR Cary 630 spectrophotometer (Agilent Technologies) and the MicroLab software (Agilent Technologies) coupled to attenuated total reflectance (ATR) component. In the ATR-crystal the infrared beam is reflected at the interface toward the sample. Stimulated saliva was dried in room temperature on the crystal for 6 min until the measurement of salivary spectra. The spectra of the air were used as a background in infrared analysis. Both salivary and the background was collected with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans (Rodrigues et al. 2019; Ferreira et al. 2020).

Spectra data evaluation procedures

Each original spectrum was normalized by mean vector and applied baseline using using Origin 9.1 software. To perform the second derivative, the

Savitzky-Golay filter (with polynomial of second order and eleven-point window) was applied using Origin 9.1 software. The second derivative parameters were set as 2 for polynomial order and 20 for points of window. In this context, the second derivative provide valleys (negative peaks) related with bands in original spectrum. The intensity of each component was calculated based on the height of valleys with respective ROC curve in the second derivative. To perform principal component analysis (PCA), principal component was calculated with scores (deviation in sample orientation) and loadings (variance in the wavenumber direction) using Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, United States). The Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine algorithms were applied with different pre-processing to discriminate salivary samples of 24h-Sepsis from controls.

Statistical analysis

All other analyses were realized using the software GraphPad Prism (GraphPad Prism 7.00, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using Student-T test. Only values of $p < 0.05$ were considered significant and the results were expressed as mean \pm S.D.

RESULTS

TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in plasma of 24h-Sepsis rats were higher ($p < 0.05$) compared with control Sham rats.

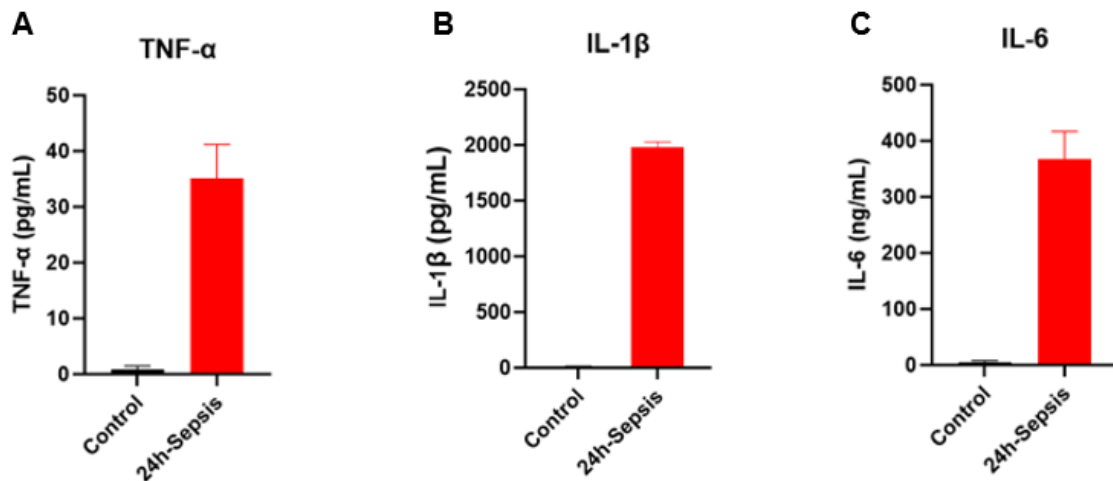


Figure 1. TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) measured by Elisa in plasma samples of 24h-Sepsis and Control rats.

The mean infrared original spectrum of saliva in region (3800 – 800 cm^{-1}) from 24h-Sepsis and control Sham rats depicted the superposition of several salivary components as lipids, proteins, DNA/RNA, and carbohydrates (Figure 2.A.). The mean second-derivative spectrum of saliva in region 3000 – 800 cm^{-1} (representing lipid components) from 24h-Sepsis and control Sham rats is presented in Figure 2.B.

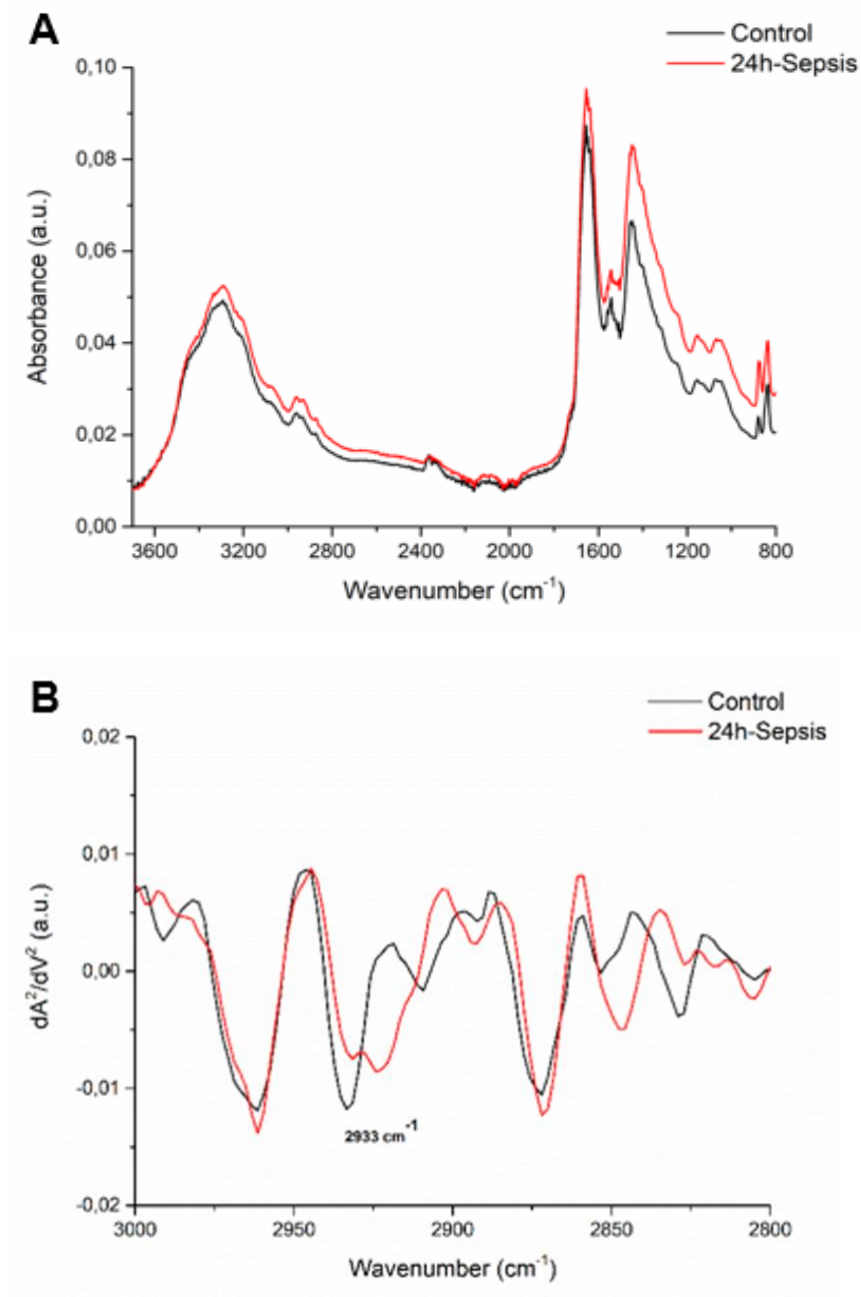


Figure 2. Representative average ATR-FTIR original spectra (3800–800 cm⁻¹) (A) and second derivative mean spectra (3000 – 800 cm⁻¹) (B) in saliva of 24h-Sepsis and control Sham rats.

The average of second derivative infrared spectrum of saliva in 24h-Sepsis and control Sham rats is represented in Figure 3A. The height of valleys (amplitude) in saliva samples were reduced ($p < 0.05$) in 2933 cm⁻¹ in 24h-Sepsis compared with control Sham rats (Figure 3B). The ROC curve of 2933 cm⁻¹

vibrational mode presented 83.3% sensitivity and 71.4% specificity for animal with sepsis compared to control Sham rats. The AUC of this vibrational mode was 0.809 (Figure 3C).

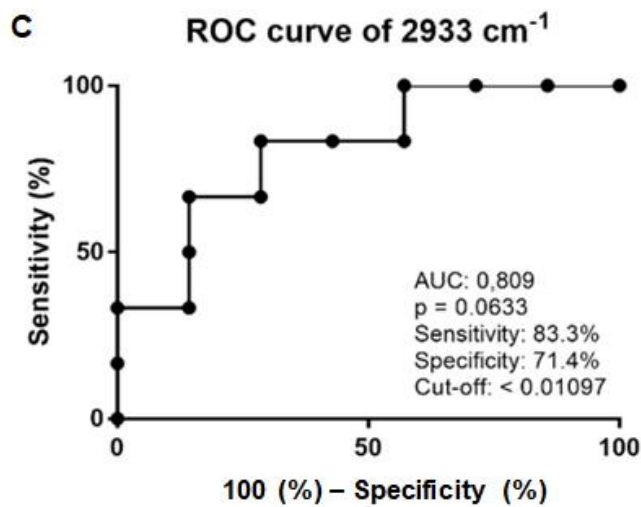
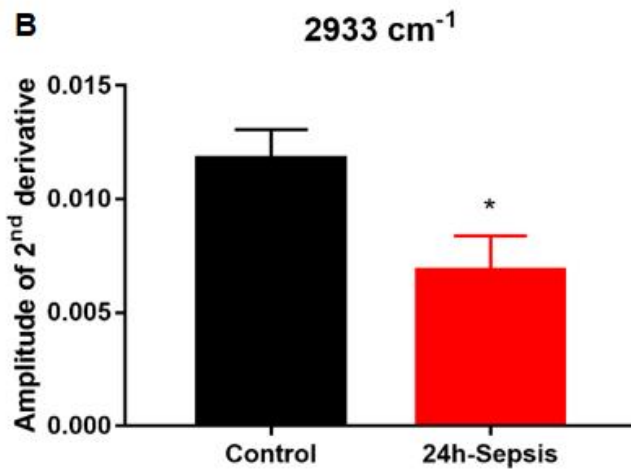
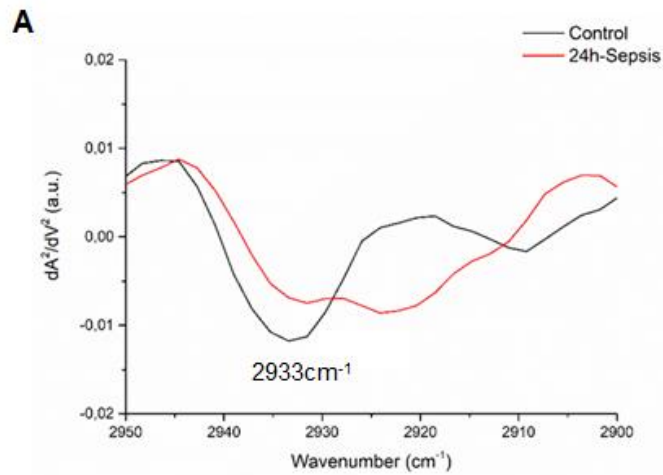


Figure 3. Representative average ATR-FTIR second derivative spectra (2950–2900 cm^{-1}) in saliva of 24h-Sepsis and control Sham rats (A). Amplitude of second derivative at 2933 cm^{-1} . (B). ROC curve analysis at 2933 cm^{-1} in the second derivative spectra (C). Results are mean \pm SEM of 7 24h-Sepsis rats and 7 control Sham rats.

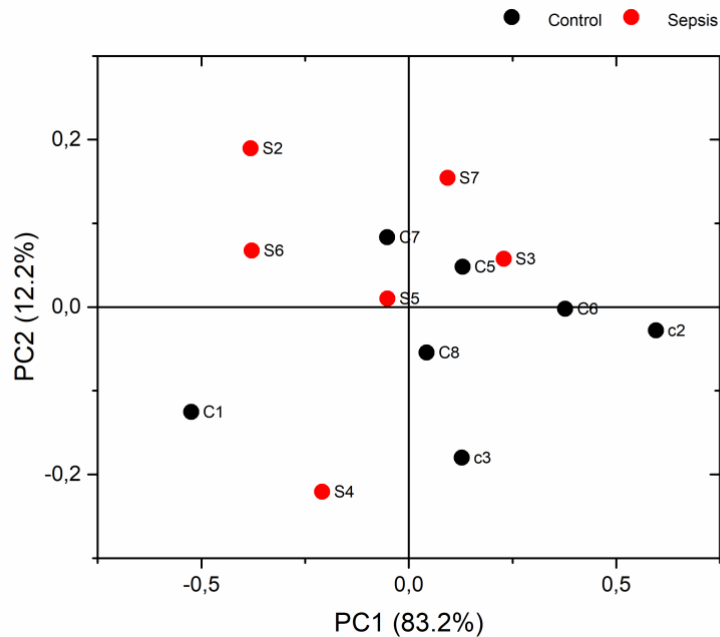


Figure 4. Represents the analysis of the PCA (Principal Component Analysis), which demonstrated the separation of the sepsis groups from the sham group in a very effective way

The classification of LDA and SVM algorithms indicated discrimination of salivary ATR-FTIR spectra applied in 24h-Sepsis rats compared to Sham rats. The best discrimination of the LDA algorithm was obtained using the 1800-900 cm^{-1} with 67% of sensitivity, 95% of specificity, and 82% of accuracy. The best discrimination of the SVM algorithm was also obtained using 1800-900 cm^{-1} with 72% of sensitivity, 100% of specificity, and 87% of accuracy (Table 1).

Table 1. Machine learning algorithms are applied in salivary spectra to classify samples from rats with sepsis and controls Sham rats.

Algorithm	Rubberband+Amida1	Accuracy	Sensitivity	Specificity
Linear Discriminant Analysis	4000-650 cm ⁻¹	0,61	0,61	0,62
	1800-900; 3050-2800 cm ⁻¹	0,72	0,72	0,71
Support Vector Machine	1800-900 cm ⁻¹	0,82	0,67	0,95
	4000-650 cm ⁻¹	0,74	0,72	0,76
	1800-900; 3050-2800 cm ⁻¹	0,82	0,72	0,90
	1800-900 cm ⁻¹	0,87	0,72	1,00

DISCUSSION

The advances in the implementation of innovative, fast, and non-invasive approaches for the precision diagnosis of sepsis are critical to avoid the pitfalls of late diagnosis and false-positive sepsis diagnosis. Although the clinical examination of the patient is associated with some clinical tests in blood, liver or kidney function, and imaging tests can indicate the presence of sepsis fastly, the confirmation of the diagnosis frequently requires a lengthy and invasive process with blood cultures to identify the pathogen that caused infection (Iregbu et al. 2022). In this context, a novel non-invasive approach based on the rapid analysis of infrared spectral salivary constituents would allow a more precise, reproducible, affordable, and fast diagnosis in clinical units. Both univariate analysis and learning machine algorithms were able to discriminate sepsis based on salivary spectra using ATR-FTIR spectra, the best discrimination of the SVM algorithm reached 72% of sensitivity, 100% of specificity, and 87% of accuracy. Although additional studies are needed to assess the screening diagnostic relevance in humans, the present study is a pioneer to indicate the potential of ATR-FTIR to detect sepsis, specially using a non-invasive fluid as saliva.

Inflammatory cytokines can modulate host immunological response to infection. The host immune response is pathogen-dependent and also related with the infected tissue (Commins et al. 2010). Proinflammatory cytokines include TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 and interferon-gamma. The diagnostic potential of IL-6 has been widely investigated in sepsis. The B and T lymphocytes are stimulated to produce IL-6 in the acute phase of infection (Hodge et al. 2004). However, these cytokines are also increased in several other inflammatory diseases. In saliva of inpatients with sepsis. As expected in the sepsis state, here we showed higher levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in plasma in rats with sepsis compared with control Sham rats. These inflammatory data, confirm the presence of sepsis in the classic CLP model for in vivo studies in animal models in accordance with other research groups (Rittirsch et al. 2009; Pereira et al. 2017; Guo et al. 2022 Jun 30) and with our previous studies using CLP model (Cardoso-Sousa et al. 2019; Pinheiro et al. 2020). In saliva of inpatients with sepsis, C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), and nitric oxide (NO) were unchanged, however, IL-6 levels were higher in saliva in patients with sepsis (Galhardo et al. 2020).

Activated endothelial cells can trigger disruption of permeability barrier, leukocyte production, and platelet adhesion. Besides, both coagulation and anticoagulant factors are activated and also occur a propagating of proinflammatory signaling. These changes lead to the release of toxic leukocyte-derived proinflammatory biomarkers (Opal and van der Poll 2015). Changes in lipid metabolism are critical in microvasculature inflammation in sepsis. Some of these lipids can reflect systemic alterations in a septic patient, thus can be used as a early biomarker in sepsis (Amunugama et al. 2021).

Alteration of lipid metabolism in sepsis infection and activation of lipid signaling pathways are components of underlying sequelae of the pathophysiology of sepsis, and lipid mediator play an important role in anti-inflammatory, pro-inflammatory and counter-regulatory changes in the microvasculature in sepsis (Amunugama et al. 2021).

In this context, the vibrational mode at 2933 cm^{-1} was reduced in animal with sepsis, with an intermediate accuracy as a diagnostic test (83.3% sensitivity and 71.4% specificity).

CONCLUSION

More robust discrimination techniques based on learning machine algorithms are required to identify unique features in complex datasets as salivary infrared spectrum. An ATR-FTIR platform is of great interest, as if it was possible to detect sepsis at an early stage in rapid, reagent-free, and non-invasive manner. The implementation of this method can also be cost-effective for the private and public health services. Both LDA and SVM algorithms were effective to discriminate sepsis in biofingerprint region with accuracy with levels higher than 80%.

Here, we showed that salivary ATR-FTIR spectroscopy could discriminate sepsis from control rats. The best discrimination of the LDA algorithm was obtained using the $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ with 82% of accuracy, 67% of sensitivity, and 95% of specificity. The best discrimination of the SVM algorithm was also obtained using $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ with 87% of accuracy, 72% of sensitivity, and 100% of specificity.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author contributions: authors Moura, D.V. and Sabino-Silva R. contributed to conception, design, data acquisition and interpretation, drafted and critically revised the manuscript. The authors Cardoso-Sousa L.; Caixeta D.C.; Lima-Filho R.B.; and Carneiro M.G. contributed to design, drafted and critically revised the manuscript. All authors gave their final approval and agree to be accountable for all aspects of the work

REFERENCES

Amunugama K, Pike DP, Ford DA. 2021. The lipid biology of sepsis. *J Lipid Res.* 62:100090. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100090>

Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS, Raniero L, Crosara KTB, Baker MJ, Siqueira WL, et al. 2020. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One.* 15(3). [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>

Caixeta DC, Oliveira SW, Cardoso-Sousa L, Cunha TM, Goulart LR, Martins MM, Marin LM, Jardim ACG, Siqueira WL, Sabino-Silva R. 2021. One-Year Update on Salivary Diagnostic of COVID-19. *Front Public Health.* 9. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.589564>

Cardoso-Sousa L, Aguiar EMG, Caixeta DC, Vilela DD, Costa DP da, Silva TL, Cunha TM, Faria PR, Espindola FS, Jardim AC, et al. 2019. Effects of salbutamol and phlorizin on acute pulmonary inflammation and disease severity in experimental sepsis. *PLoS One.* 14(9):e0222575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222575>

Commins SP, Borish L, Steinke JW. 2010. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125(2):S53-S72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>

Dawes C, Wong DTW. 2019. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res.* 98(2):133-141. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/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, et al. 2020. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *J Oncol.* 2020. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>

Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, Cassini A, Rudd KE, Schlattmann P, Allegranzi B, Reinhart K. 2020. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 46(8):1552-1562. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06151-x>

Galhardo LF, Ruivo GF, de Oliveira LD, Parize G, Santos SSF dos, Pallos D, Leão MVP. 2020. Inflammatory markers in saliva for diagnosis of sepsis of hospitalizes patients. *Eur J Clin Invest.* 50(5):e13219. <https://doi.org/10.1111/eci.13219>

Guo J, Wang R, Min F. 2022 Jun 30. Ginsenoside Rg1 ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting ferroptosis in renal tubular epithelial cells. *J Leukoc Biol.* <https://doi.org/10.1002/JLB.1A0422-211R>

Hodge G, Hodge S, Han P, Haslam R. 2004. Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection. *Clin Exp Immunol.* 135(1):125-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02346.x>

Iregbu K, Dramowski A, Milton R, Nsutebu E, Howie SRC, Chakraborty M, Lavoie PM, Costelloe CE, Ghazal P. 2022. Global health systems' data science approach for precision diagnosis of sepsis in early life. *Lancet Infect Dis.* 22(5):e143-e152. [accessed 2022 Oct 16]. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00645-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00645-9)

Muraoka MY, Justino AB, Caixeta DC, Queiroz JS, Sabino-Silva R, Espindola FS. 2022. Fructose and methylglyoxal-induced glycation alters structural and functional properties of salivary proteins, albumin and lysozyme. PLoS One. 17(1). [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262369>

Ojeda JJ, Dittrich M. 2012. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. Methods Mol Biol. 881:187-211. [accessed 2022 Oct 16]. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8

Opal SM, van der Poll T. 2015. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. J Intern Med. 277(3):277-293. <https://doi.org/10.1111/joim.12331>

Pereira RS, Bertoncheli CM, Adefegha SA, Castilhos LG, Silveira KL, Rezer JFP, Doleski PH, Abdalla FH, Santos KF, Leal CAM, et al. 2017. Sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP) alters nucleotidase activities in platelets of rats. Microb Pathog. 111:345-351. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.047>

Pinheiro GVV da S, Sabino-Silva R, de Araujo MR, Gomes SP, Oliveira SW, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Gonzaga CC, Claudino M. 2020. Experimental Acute Sepsis Reduced Number of Osteocalcin Immunolabeled Cells in Periodontal Ligament. Braz Dent J. 31(2):143-151. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202003024>

Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc. 4(1):31-36. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214>

Rodrigues RPCB, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CCFV, Siqueira WL, Maia YCP, Cardoso SV, Sabino-Silva R. 2019. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz Dent J.* 30(5):437-445. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902228>

Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara D v, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, et al. 2020. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 395(10219):200-211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)

Sabino-Silva R, Okamoto MM, David-Silva A, Mori RC, Freitas HS, Machado UF. 2013. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. *Diabetol Metab Syndr.* 5(1). [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-64>

Severcan F, Bozkurt O, Gurbanov R, Gorgulu G. 2010. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. *J Biophotonics.* 3(8-9):621-631. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>

Siempos II, Lam HC, Ding Y, Choi ME, Choi AMK, Ryter SW. 2014. Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice. *J Vis Exp.*(84). [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.3791/51066>

Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. 1996. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun.* 64(11):4733-4738. [accessed 2022 Oct 16]. <https://doi.org/10.1128/iai.64.11.4733-4738.1996>

REFERÊNCIAS - INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1. INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE SEPSE (ILAS). Sepsis: um problema de saúde pública [Internet]. Brasília: Conselho Federal de Medicina. 2015. Disponível em: <http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2015/10/livro-um-problema-de-saude-publica.pdf>. Acessado em: 20 de outubro de 2022.

2. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. Rev Bras Ter Intensiva. 2006 mar;18(1):9-17. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2006000100003>.

3. Font MD, Thyagarajan B, Khanna AK. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. Med Clin North Am. 2020 jul 1;104(4):573-85. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.02.011>.

4. INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE SEPSE (ILAS). Relatório Nacional: Ano de Referência - 2021 [Internet]. Brasília: Conselho Federal de Medicina. 2021. Disponível em: <http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2015/10/livro-um-problema-de-saude-publica.pdf>. Acessado em: 20 de outubro de 2022.

5. Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, Cassini A, Rudd KE, Schlattmann P, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. Intensive Care Med. 2020 ago 1;46(8):1552-62. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06151-x>.

6. O'Keefe RJ, Mao J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic--an overview. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011 dez 1;17(6):389-92. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0475>.
7. Amunugama K, Pike DP, Ford DA. The lipid biology of sepsis. *J Lipid Res.* 2021;62. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100090>.
8. Lundberg JO. Nitrate transport in salivary glands with implications for NO homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 ago 8;109(33):13144. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210412109>.
9. Chojnowska S, Baran T, Wilińska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, Knaś M. Human saliva as a diagnostic material. *Adv Med Sci.* 2018 mar 1;63(1):185-91. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.11.002>.
10. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc.* 2014;9(8):1771-91. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>.