

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA PARA
DETECÇÃO PLASMÁTICA DA SEPSE: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO
DE PROVA DE CONCEITO**

Glauciane Silva Vilarinho

UBERLÂNDIA – MG

2023

Glauciane Silva Vilarinho

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA PARA
DETECÇÃO PLASMÁTICA DA SEPSE: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO
DE PROVA DE CONCEITO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Robinson Sabino da Silva

Co-orientador: Douglas Carvalho Caixeta

UBERLÂNDIA – MG

2023

=Z_X: Xkcf^i} ZX F ece\ f j j kd X [\`9 Ycf kZxj [X L=L
Zfd [X[fj ~e] fid X[fj `g\cf Zz`gi" gi f Zz`Xl kfi Zz%

M.O. Mxi`e_f#> xl Z`Xe\`j`mX#(O/. \$
)')* ; <J<EMF CM@<EK F ; <`GC8K8=F I D8`9@ =F Kë E @8`G8I 8
; <K<: F`GC8JDãK@8; 8`J<GJ<T<JKL; F`GI y\$ Cæ@F ; <
GI F MB; <: F E: <@F`R\ZI ij f`dãk•e ZfT&> xl Z`Xe\`j`mX
Mxi`e_f%\$)') *%

Fi`lek[fiXTI fY`ej fe`J XY`ef`[X`J`mX`J XY`ef%
: ffi`lek[fiXT; fl`^dj : XinX`f : X`o\k : XinX`f%
; j`j\iX` f`Z`D`j`kX[f`z`\$L e`m`ij [X[\`= \[\iXc[\\
LY`ice[`X`G`j`\$`iX[I X` f`d : `a eZ`Xj [X`J`X` [\\
Df[f[\ `XZ`j`j`f`T`@`k`ie`k%
; j`gfe`Š`m`c`d`T`kg`f`%`i`^`&`%`+`O`&`I`%`%`') *%) /
@Zd`Y`Ycf`iX`X%

(% `a eZ`Xj`d`t[`ZXj`%`XY`ef`#I fY`ej fe`J XY`ef`[X
J`mX`#(O/(\$`Z`fi`lek`%`%` XinX`f`#; fl`^dj : XinX`f
: X`o\k`#(O) \$`Z` ffi`lek`%`%`L e`m`ij [X[\`= \[\iXc
[\LY`ice[`X`G`j`\$`iX[I X` f`d : `a eZ`Xj [X`J`X` [\\
K`Š`f`%

: ; L T-(

9`Ycf`kZ} i`f`j`i`j`g`f`ej` }`m`j`g`l`d`j`k`i`k`iX`[\`XZfi[f`Zfd`f`88: I) 1
>`q`d` : i`j`k`e`l`E`l`e`j`[`f` : fl`k`\$: I 9- & ' O(
E`l`g`f`e`D`Xi`Z`f`j`=`i`i`l`i`X`\$: I 9- & ' . +



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 09/PPCSA				
Data:	18.08.2023	Hora de início:	13:00h	Hora de encerramento:	14:33h
Matrícula do Discente:	11912CSD008				
Nome do Discente:	Glauciane Silva Vilarinho				
Título do Trabalho:	DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA PARA DETECÇÃO PLASMÁTICA DA SEPSE: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE PROVA DE CONCEITO				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	2: Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico das Doenças e Agravos à Saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de Plataformas Diagnósticas pela saliva				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Microsoft Teams, 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 Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Renata Pereira Georjutti (UNITRI), Emília Maria Gomes Aguiar e Robinson Sabino da Silva (UFU) orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da 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):

Aprovada.

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 18/08/2023, às 14:33, 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 **Emília Maria Gomes Aguiar, Usuário Externo**, em 18/08/2023, às 14:36, 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 **Renata Pereira Georjutti, Usuário Externo**, em 18/08/2023, às 14:36, 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 **4687158** e o código CRC **3E13D021**.

Glauciane Silva Vilarinho

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA PARA
DETECÇÃO PLASMÁTICA DA SEPSE: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO
DE PROVA DE CONCEITO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora:

Presidente da Banca: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

1º Membro: Renata Pereira Georjutti - UNITRI

2º Membro: Emília Maria Gomes Aguiar - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho.

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr Robinson e ao Prof. Dr Douglas, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigado por acreditarem em mim, pela paciência em aguardar e ajudar integralmente durante todo o processo. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o apoio de vocês. Foram e estão sendo muito mais que orientadores e sim Doutores de toda sabedoria e empatia.

Por fim, a palavra se resume em gratidão.

RESUMO

A sepse é uma resposta sistêmica com diferentes estágios clínicos contra um agente infeccioso como bactérias, vírus, fungos ou protozoários. Atualmente, o diagnóstico precoce apresenta um desafio clínico para diminuir sua elevada taxa de mortalidade, além de gerar um alto custo de tratamento nos setores público e privado. Nesse contexto, o presente estudo pretende identificar potenciais biomarcadores plasmáticos baseados em uma tecnologia biofotônica por ATR-FTIR visando o rastreamento ou diagnóstico da sepse em um estudo pré-clínico. Para isto, um modelo murino com sepse foi estabelecido por ligadura e punção cecal (CLP). Dezesesseis ratos foram divididos aleatoriamente em grupos controle (n=8) e sepse (n=8). Os animais foram eutanasiados 24h após a indução da sepse e o sangue foi coletado. O plasma sanguíneo foi analisado usando uma plataforma ATR-FTIR e análises univariadas foram usadas para selecionar potenciais biomarcadores espectrais da sepse no plasma. A presença de sepse foi confirmada pelo aumento ($p < 0.05$) da concentração da proteína C reativa em comparação aos controles. No espectro de absorvância a banda $2945-2888\text{ cm}^{-1}$ foi reduzida ($p < 0.05$) em animais sepse comparado com controles. A análise da área da banda $2945-2888\text{ cm}^{-1}$ indicou sensibilidade de 87,5% e especificidade de 75%. No espectro da segunda derivada o modo vibracional 1513 cm^{-1} também foi reduzida ($p < 0.05$) em animais sepse comparado com controles. A análise da altura do vale em 1513 cm^{-1} indicou sensibilidade de 75% e especificidade de 87,5%. Em conclusão, esses resultados indicam que a espectroscopia ATR-FTIR acoplada à análise univariada tem o potencial de fornecer alternativa para detecção da sepse sem uso de reagentes, de forma sustentável e rápida utilizando amostras de plasma sanguíneo.

Palavras chave: ATR-FTIR, biomarcadores plasmáticos, sepse, triagem, diagnóstico

ABSTRACT

Sepsis is a systemic response with different clinical stages against an infectious agent such as bacteria, viruses, fungi, or protozoa. Currently, early diagnosis presents a clinical challenge to reduce its high mortality rate, in addition to generating a high cost of treatment in public and private health sectors. In this context, the present study search to identify potential plasmatic biomarkers based on a biophotonic technology by ATR-FTIR aiming at screening or diagnosing sepsis in a preclinical study. For this, a murine model of sepsis was established by cecal ligation and puncture (CLP). Sixteen rats were randomly divided into control (n=8) and sepsis (n=8) groups. The animals were euthanized 24h after sepsis induction and blood was collected. Blood plasma was analyzed using an ATR-FTIR platform and univariate and multivariate analyzes were used to screen for potential spectral biomarkers of sepsis in plasma. The presence of sepsis was confirmed by an increase ($p < 0.05$) in C-reactive protein concentration compared to controls. In the absorbance normalized spectrum, the band area between $2945\text{-}2888\text{ cm}^{-1}$ was reduced ($p < 0.05$) in animals with sepsis compared to controls. The analysis of the band area in the region $2945\text{-}2888\text{ cm}^{-1}$ indicated a sensitivity of 87.5% and a specificity of 75%. In the second derivative spectrum, the vibrational mode at 1513 cm^{-1} was also reduced ($p < 0.05$) in animals with sepsis compared to controls. Analysis of the height of the valley at 1513 cm^{-1} indicated a sensitivity of 75% and specificity of 87.5%. In conclusion, these results indicate that ATR-FTIR spectroscopy supported with univariate analysis has the potential to provide an alternative for the detection of sepsis without the use of reagents, sustainably, and rapidly using blood plasma samples.

Keywords: ATR-FTIR, plasmatic biomarkers, sepsis, screening, diagnosis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índice de Avaliação Sequencial de Falência Orgânica (SOFA).....	13
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACCP/SCCM: American College of Chest Physicians e Society of Critical Care Medicine
- ATR-FTIR: Espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier
- ESICM: European Society of Intensive Care Medicine
- ILA: Instituto Latino Americano de Sepsis
- IV: Espectroscopia de infravermelho
- SCCM: Society of Critical Care Medicine
- SIRS: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
- SPREAD: Sepsis Prevalence Assessment Database
- SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
- UTI: Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1. Fundamentação Teórica.....	11
2.1 Sepsis – aspectos gerais.....	11
2.2 Diagnóstico da Sepsis.....	13
2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	14
2. Objetivo.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
3. Artigo.....	18
4. Referências Bibliográficas.....	37

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Sepsis – aspectos gerais

Sepsis pode ser considerada como uma síndrome clínica provocada por uma infecção que desencadeia uma reação inflamatória sistêmica com diversos graus de severidade (REZENDE et al., 2008). Observa-se que a sepsis, presente nas Unidades de Tratamentos Intensivos (UTIs) de hospitais públicos e privados, bem como, nas unidades de emergências representam um grave problema de saúde pública que está relacionado com elevadas taxas de morbimortalidade e acarreta altos custos de tratamento (BOECHAT; BOECHAT, 2010).

O termo sepsis advém da antiga denominação Septicemia (infecção na corrente sanguínea), cuja mudança desta nomenclatura foi realizada pelo Consenso das Sociedades Americanas de Terapia Intensiva, que padronizou a terminologia e estabeleceu o caráter evolutivo da doença dentro da mesma condição fisiopatológica (SILVA, PINHEIRO, JÚNIOR, 2004).

No ano de 1992, em Consenso do *American College of Chest Physicians e Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM), novos conceitos de Sepsis foram definidos, servindo de base para estudos epidemiológicos e facilitaram o diagnóstico na prática clínica (BONE, et al., 1992).

Os novos conceitos de Sepsis definidos neste consenso, foram:

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) é uma resposta do organismo a uma variedade de agressões, infecciosas ou não (trauma, pancreatite, grande queimado, infecção sistêmica). A caracterização de envolvimento sistêmico é estabelecida por pelo menos duas ou mais alterações; Temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; Taquicardia - frequência cardíaca > 90 bpm; Taquipneia - frequência respiratória > 20 inspirações por minuto ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg; Leucocitose ou leucopenia > 12.000 cels/mm³ ou $> 10\%$ das formas imaturas; Sepsis - quando dois ou mais sinais de SIRS ocorre em decorrência de um processo infeccioso. Sepsis grave é uma resposta inflamatória sistêmica à infecção secundária, associada com a disfunção orgânica, caracterizada por hipoperfusão, acidose láctica, oligúria ou rebaixamento do nível de consciência. Choque séptico consiste em hipotensão induzida pela sepsis, refratária à reposição volêmica e necessidade de agentes vasopressores (BONE, et al., 1992).

Posteriormente, no ano de 2001, em nova reunião de Consenso com as mesmas sociedades participantes no ano de 1992, deixou-se mais evidentes as definições e abrangeu a especificidade do diagnóstico, acrescentando sinais e sintomas identificados no paciente com sepse (LEVY et al., 2003). Em 2016, novas definições foram propostas pelas *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e a *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), baseadas em um estudo com uma grande base de dados, ocorrendo assim, uma mudança conceitual da doença (SINGER et al, 2016).

Atualmente a sepse é definida como disfunção orgânica potencialmente fatal, ocasionada por uma resposta desregulada frente ao agente infeccioso, causando a disfunção de um ou mais órgãos (SINGER et al., 2016; KAWASAKI, 2017). Baseado nestes novos conceitos, Rhodes (2017) definiu a sepse como uma disfunção orgânica decorrente de uma resposta desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso.

Destaca-se que o desenvolvimento de sepse após lesão orgânica não é determinado somente pelo agente agressor e/ou pela virulência do patógeno, mas, também pelos caracteres genéticos do indivíduo e o somatório destes fatores, culminando em uma série de eventos imunológicos, metabólicos e hemodinâmicos que definem a sepse (NAMATH; PATTERSON, 2009; BOECHAT; BOECHAT, 2010).

A sepse é atualmente uma das principais causas de mortes em hospitais públicos e privados de todo mundo, sendo um grave problema de saúde pública, com elevadas taxas de morbimortalidade e altos custos de tratamento. O estudo multicêntrico denominado SPREAD - *Sepsis Prevalence Assessment Database*, conduzido pelo ILAS (Instituto Latino Americano de Sepse), com o objetivo de avaliar tanto a prevalência como a letalidade por sepse grave e choque séptico em UTI brasileiras, apresentou uma ocorrência de mortalidade por sepse de 55% em UTIs brasileiras. Tornando esse cenário mais estarrecedor, cerca de 1/3 (29,6%) dos leitos de UTI do país estão ocupados com pacientes com sepse grave e choque (MACHADO et al, 2017).

Apesar disso, é sabido que a realização de triagem por meio de programas de melhoria de qualidade, a implementação de protocolos para o diagnóstico e tratamento precoce tem auxiliado na redução da mortalidade por sepse (ILAS, 2015; RHODES et al, 2017).

1.2 Diagnóstico da Sepses

Para identificação dos sinais e sintomas de sepsis, foi adotado as definições sugeridas pela *Sepsis Definition Conference* em 2003 (LEVY et al., 2003), que se trata de um guia apropriado ao diagnóstico da sepsis baseado na avaliação da presença de uma das disfunções relacionados abaixo, sem outros sinais e sintomas (ILAS, 2005;LEVY et al., 2003).

- hipotensão (PAS < 90 mmHg ou PAM < 65 mmHg ou queda de PA > 40 mmHg)
- oligúria ($\leq 0,5$ mL/Kg/h) ou elevação da creatinina (>2mg/dL);
- relação PaO₂/FiO₂ < 300 ou necessidade de O₂ para manter SpO₂ > 90%;
- contagem de plaquetas < 100.000/mm³ ou redução de 50% no número de plaquetas em relação ao maior valor registrado nos últimos 3 dias;
- lactato acima do valor de referência;
- rebaixamento do nível de consciência, agitação, delirium;
- aumento significativo de bilirrubinas (>2X o valor de referência).

No ano de 2016, 32 sociedades científicas se reuniram de forma concomitante para atualizarem as novas definições para o diagnóstico de Sepses que ficaram conhecidas como SEPSI-3. Nessa mudança, a sepsis passou a ser destinada como “presença de disfunção orgânica ameaçadora a vida secundária à resposta desregulada do organismo à infecção”. A partir disso, o diagnóstico de sepsis também sofreu alterações e passou a ter novo score, denominado *Sequential Organ Failure Assessment* – SOFA (Shankar-Hari et al., 2016). Essa alteração pontual no índice de SOFA ≥ 2 reflete risco de morte de cerca de 10%.

Segue abaixo a tabela discriminando os scores SOFA para o diagnóstico da Sepsis-3:

Tabela 1. Índice de Avaliação Sequencial de Falência Orgânica (SOFA)

SOFA score	1	2	3	4	5
Respiração PaO ₂ / FiO ₂ (a)	> 400	> 400	< 300	< 200 (a)	< 100
Coagulação Plaquetas 10 ³ / mm ³	> 150	> 150	< 100	< 50	< 20
Hipotensão Cardiovascular (b)	PAM > 70	PAM > 70	Dopamina ≤ 5 ou Dobutamina, qualquer dose	Dopamina > 5 ou Epinefrina ≤ 0.1 ou Norepinefrina ≤ 0.1	Dopamina > 15 ou Epinefrina > 0.1 ou Norepinefrina > 0.1
Fígado bilirrubina mg / dl	< 1.2	1.2 a 1.9	2.0 a 5.9	6.0 a 11.9	> 12
SNC escala de coma de Glasgow	> 14	13 a 14	10 a 12	6 a 9	< 6
Renal creatinina ou débito urinário	< 1.2	1.2 a 1.9	2.0 a 3.4	3.5 a 4.9 < 500	> 5 a < 200

Foi definido que após realização da triagem por meio dos sinais e sintomas clínicos, e definindo-se por adotar o protocolo de sepse, a equipe médica deve efetuar a coleta de exames laboratoriais para a pesquisa de disfunções orgânicas: gasometria e lactato arterial, hemograma completo, creatinina, bilirrubina e coagulograma. Contudo, é importante destacar que os exames laboratoriais não permitem o diagnóstico apropriado de sepse, e o custo destes exames geralmente são elevados e nem sempre o diagnóstico de sepse será confirmado (ILAS, 2015; Shankar-Hari et al., 2016).

Ainda de acordo com ILAS (2015), o diagnóstico da sepse pode ser impreciso devido as alterações leucocitárias promovendo redução da acurácia em pacientes com SIRS devido a outras causas e também são limitados na capacidade de fazer esta discriminação. Sugere-se a verificação de presença de hiperlactatemia como componente obrigatório para a definição da sepse, o que pode dificultar o diagnóstico em locais desprovidos de equipamentos ou com poucos recursos para compra de reagentes para realização de exames (Schubert et al., 2020).

Pacientes graves, cujas doenças são complexas e com frequente uso de antimicrobianos trazem dificuldades adicionais para o diagnóstico da sepse, e caso já tenham um foco infeccioso, seu diagnóstico correto é dificultado pela presença dos sinais de resposta inflamatória em resposta a um agente infeccioso anterior (BOECHAT; BOECHAT, 2010; ILAS, 2015). Nesse sentido, fica evidente que o desenvolvimento de novas alternativas de diagnóstico, triagem ou monitoramento da sepse que permitam a detecção em plataformas de forma sustentável, sem uso de reagentes, com redução drástica de custos de análises e que permitam liberação de resultados de forma rápida podem permitir a detecção da sepse de forma mais abrangente em populações desfavorecidas e também permitir a detecção precoce para potencializar um maior sucesso do tratamento da sepse usando antibiótico adequado.

1.3 Espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) pode mensurar a frequência e a intensidade que uma determinada amostra absorve a radiação infravermelha, portanto, ela representa, por meio de bandas de absorção, a frequência de vibração dos átomos constituintes do material, identificando os componentes químicos da amostra (HEINEN, 2006).

Esta definição, corrobora com Silva (2020) enfatizando que a espectroscopia de IV mensura qualitativamente e quantitativamente esses modos vibracionais e os relacionam à composição química, ou seja, representa a impressão digital da amostra através das frequências de vibrações entre as ligações dos átomos, desta forma, permite a identificação de materiais e componentes químicos/biológicos.

A espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) é uma técnica analítica vibracional que se refere ao estudo da absorção de ondas eletromagnéticas na região do IV médio ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) (ANDREW CHAN; KAZARIAN, 2016) e possibilita fornecer informações detalhadas em análise de múltiplos componentes presentes na amostra. Esta análise ocorre de forma rápida, livre de reagentes, com volume reduzido de amostras, e pode apresentar alta especificidade, o que é fundamental para aplicação clínica (BAKER et al., 2014; KHAUSTOVA et al., 2010; KHAUSTOVA et al., 2009). A aplicação da tecnologia ATR-FTIR permite a utilização de biofluidos e tecidos biológicos associados com análises univariadas e de

quimiometria, o que pode contribuir para sua aplicação como ferramenta alternativa de triagem ou avaliação diagnóstica desses materiais biológicos (BAKER et al., 2014; SCHULTZ, 2002).

O infravermelho tem sido utilizado nas últimas décadas em diversas áreas do conhecimento, e o material a ser analisado pode ser líquido, gás, filme seco, em pó e *in natura*. Os componentes bioquímicos (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos) possuem modos vibracionais na região do infravermelho médio ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) e são usualmente indicados como marcadores na identificação de alterações metabólicas decorrentes de diversas patologias (BALAN; MIHAI; COJOCARU; URITU *et al.*, 2019; BUNACIU; FLESCIN; HOANG; ABOUL-ENEIN, 2017). Estudos realizados utilizando o ATR-FTIR identificaram o potencial da saliva como fluido diagnóstico da doença renal crônica, do câncer de mama e diabetes (RODRIGUES et al., 2019, CAIXETA et al., 2020, FERREIRA et al. 2020; SILVA, 2020). A espectroscopia ATR-FTIR também foi utilizada para avaliar a saliva de ratos não diabéticos (ND), diabéticos (D) e diabéticos tratados com insulina (D+I) para identificar potenciais biomarcadores salivares relacionados ao monitoramento da glicose e demonstrou que os biomarcadores salivares espectrais descobertos, usando análise univariada e multivariada, podem fornecer uma nova alternativa robusta para monitoramento de diabetes (CAIXETA et al., 2020).

A análise de componentes salivares em pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) e controles pareados baseado na tecnologia ATR-FTIR demonstrou que os modos vibracionais de 2052 cm^{-1} e 924 cm^{-1} foram capazes de discriminar pacientes com DRC de indivíduos saudáveis. Sugere-se que após validação por meio de estudos multicêntrico em maior escala, estes modos vibracionais relacionados a detecção da DRC na saliva possam ser utilizados em ferramenta de triagem ou diagnóstico para DRC (RODRIGUES et al., 2019).

O ATR-FTIR também foi utilizado com o objetivo de estabelecer modos vibracionais salivares específicos para detectar impressões digitais de câncer de mama adequadas ao diagnóstico e demonstrou que a espectroscopia ATR-FTIR pode ser usada em amostras de saliva para discriminar pacientes com câncer de mama dos pacientes benignos e indivíduos saudáveis. Os resultados sugerem que a análise salivar por espectroscopia ATR-FTIR é uma ferramenta promissora para o diagnóstico de câncer de mama (FERREIRA et al., 2020).

Nesse contexto, a espectroscopia ATR-FTIR é uma técnica emergente para desenvolvimento de novas plataformas biofotônicas para realizar a triagem, monitoramento e diagnóstico de diversas doenças utilizando pequeno volume de biofluidos. Isto poderá permitir a detecção da sepse de forma mais sustentável, sem utilização de reagentes, com redução evidentes dos custos de processamento das amostras e com liberação mais célere dos resultados para equipe médica, permitindo melhoria da terapêutica da sepse.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar potenciais biomarcadores plasmáticos analisados por espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) para detecção da sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil espectral de infravermelho para detectar componentes biológicos da sepse no sangue;
- Comparar os componentes plasmáticos por ATR-FTIR em ratos controles e sepse induzida por CLP para identificar potenciais biomarcadores para diagnóstico ou triagem da sepse.

3. ARTIGO

DEVELOPMENT OF A BIOPHOTONIC PLATFORM FOR PLASMA DETECTION OF SEPSIS: A PRECLINICAL PROOF-OF-CONCEPT STUDY

Glauciane Vilarinho¹, Léia Cardoso-Sousa¹; Emilia Maria Gomes Aguiar¹; Marco Guevara-Vega¹, Vivian Azevedo², Thúlio Marquez Cunha³; Luiz Ricardo Goulart^{4,†}; Douglas Carvalho Caixeta^{1*}; Robinson Sabino-Silva^{1*}.

¹ Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

² School of Physiotherapy, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³ Department of Pulmonology, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

†in memoriam

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

&

Douglas Carvalho Caixeta; Federal University of Uberlandia (UFU); e-mail: caixetadoug@gmail.com

Abstract

Sepsis is a systemic response with different clinical stages against an infectious agent such as bacteria, viruses, fungi, or protozoa. Currently, early diagnosis presents a clinical challenge to reduce its high mortality rate, in addition to generating a high cost of treatment in public and private health sectors. In this context, the present study search to identify potential plasmatic biomarkers based on a biophotonic technology by ATR-FTIR aiming at screening or diagnosing sepsis in a preclinical study. For this, a murine model of sepsis was established by cecal ligation and puncture (CLP). Sixteen rats were randomly divided into control (n=8) and sepsis (n=8) groups. The animals were euthanized 24h after sepsis induction and blood was collected. Blood plasma was analyzed using an ATR-FTIR platform and univariate analyzes were used to screen for potential spectral biomarkers of sepsis in plasma. The presence of sepsis was confirmed by an increase ($p < 0.05$) in C-reactive protein concentration compared to controls. In the absorbance normalized spectrum, the band area between $2945\text{-}2888\text{ cm}^{-1}$ was reduced ($p < 0.05$) in animals with sepsis compared to controls. The analysis of the band area in the region $2945\text{-}2888\text{ cm}^{-1}$ indicated a sensitivity of 87.5% and a specificity of 75%. In the second derivative spectrum, the vibrational mode at 1513 cm^{-1} was also reduced ($p < 0.05$) in animals with sepsis compared to controls. Analysis of the height of the valley at 1513 cm^{-1} indicated a sensitivity of 75% and specificity of 87.5%. In conclusion, these results indicate that ATR-FTIR spectroscopy supported with univariate analysis has the potential to provide an alternative for the detection of sepsis without the use of reagents, sustainably, and rapidly using blood plasma samples.

Keywords: ATR-FTIR, plasmatic biomarkers, sepsis, screening, diagnosis

INTRODUCTION

Sepsis is a clinical condition that represents a dysregulated host response to an infection that may lead to systemic inflammation and multiple organ damage [1]. Sepsis and septic shock are closely related to higher mortality rates in hospitalized patients. Sepsis is the most frequent systemic cause of admission in the intensive care unit (ICU) [1]. World Health Organization (WHO) data inform that sepsis affected around 49 million cases and ~11 million sepsis-related deaths in 2017. These data suggest sepsis is related to ~20% of all global deaths [2].

Although early detection and appropriate therapeutical management in the initial stage of sepsis significantly improve outcomes in septic patients, the diagnosis of sepsis is currently performed based on clinical criteria associated with biomarkers of multiple organ dysfunction with the incorporation of SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score prediction [3]. SOFA is a widely validated tool to assess acute parameters of morbidity in critical illness patients and an extending application has been applied in the diagnosis of sepsis [4]. This diagnostic test with clinical criteria highlights the difficulty and lack of a gold standard diagnostic test, which limits prompt diagnosis and appropriate treatment. SOFA is considered a valuable screening tool for sepsis detection, however, the SOFA application should be applied with caution for clinical decision-making in patients with suspected sepsis during the ICU course [1,3,4]. The identification of novel diagnostic platforms applied to the early detection of sepsis that are innovative, safe, and effective is critical to successful sepsis treatment using adequate broad-spectrum antibiotics [1,3,4]. In preclinical studies, the classical and reproducible model of sepsis induction is performed via cecal ligation and puncture (CLP). Higher levels of C-reactive protein (CRP) in plasma samples is a clinical biomarker to confirm sepsis-induction and bacteremia [5,6].

Among the vibrational spectroscopy tools, infrared (IR) spectroscopy is a high-sensitive analytical platform capable to detect biochemical components in biofluids, such as blood, plasma, serum, and urine. The detection of functional groups of each biofluid molecular component using an attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectrometry is a sustainable and reagent-free platform. ATR-FTIR platforms can offer an economically viable opportunity to perform screening and/or diagnostic analysis [7]. The ATR-FTIR analysis is performed with a low sample volume for each analysis with simple preparation. A notable benefit of the ATR-FTIR analysis is the feasibility to investigate simultaneously the presence of functional groups from lipids,

peptides, carbohydrates, metabolites, DNA, and RNA, as well as searching for unique disease biomarkers contained in each sample [8]. As biochemical changes are frequently described in plasma samples in diseases related to bacterial infections, the adoption of ATR-FTIR can reveal these differences at a molecular level and could serve as a novel screening and/or diagnostic tool [9-10].

Here, we tested the hypothesis that infrared spectral vibrational modes in blood are differentially expressed in rats with sepsis than controls and it can be used as a novel plasmatic biomarker for sepsis detection. Thus, our study aimed to identify an infrared profile to detect sepsis signatures in blood plasma that are suitable for screening or diagnosis of this highly prevalent disease in ICUs.

METHODS

Animal procedures

The research staff received special training in animal care or handling at the Rebir/PROPP/ Federal University of Uberlandia (UFU). All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the UFU (Approval No. 45/2015). In this study were used 16 male Wistar rats weighing between 230 and 290 g. Unless otherwise stated, animals were housed under ethical standard conditions including ad-libitum access to food and water.

The cecal ligation and puncture surgery (CLP) was performed in 8 male Wistar rats (weighing ~ 260g) to trigger sepsis-induced (n=8). For CLP procedures, rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Rats underwent an aseptic midline laparotomy, and the portion of the cecum was exteriorized and placed outside of the abdominal cavity. The cecum was partially ligated using a 4.0 silk tie, perforated nine times with a 22-gauge needle, and then gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation. The cecum was returned into the abdominal cavity and the laparotomy was closed using a 4.0 silk sutures. The other 8 control animals underwent the same procedure; however, the cecum was not ligated and perforated [11, 12]. Animals were caged and allowed free access to water and a standard rodent chow diet (Nuvilab CR-1; Nuvital, Curitiba, Brazil). The animals were observed for twenty-four hours after surgery. Animals were kept in dorsal recumbence throughout the experimental procedures. Body temperature was maintained at $37.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ with a heating blanket. Control and CLP-Sepsis rats were studied 24 hours after sepsis induction.

Blood was obtained from anesthetized rats. Blood was collected into vials containing citrate-phosphate-dextrose anticoagulant and centrifuged at 1,000xg for 10 min. The plasma in the supernatant was stored in aliquots for C-reactive protein (CRP) analysis at -80°C [13]. All efforts were made to minimize animal suffering. The methods were carried out following the approved guidelines. We considered a humane endpoint with specific criteria: 1) in the cases of ruffled fur and ocular discharge is indicated careful monitoring; and 2) in cases of ataxia, tremor, and cyanosis is indicated euthanasia. However, probably due to the short period of sepsis, it was not necessary to perform humane endpoint euthanasia in animals [14,15].

C-reactive protein concentration in plasma

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to measure C-reactive protein (CRP) in blood according to the manufacturer's protocol. Results were presented in ng/mL [14].

Chemical profile in blood by ATR-FTIR Spectroscopy

Blood infrared spectra were captured using a Vertex 70 ATR-FTIR spectrophotometer (Bruker Optics) coupled to a micro-attenuated total reflectance (ATR) tool in OPUS v.6.5 software, Bruker). Two μl of blood samples were applied directly on ATR-crystal and these samples were dried using a dry airflow for 5 minutes. The blood biofilm spectra of each sample were collected in triplicate using a spectral resolution of 4 cm^{-1} with 32 scans. All samples analysis were performed with a controlled temperature ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) and humidity. The air spectrum was used as a background [9].

Spectra data procedures

The absorbance spectra were normalized by vector and baseline was performed using OPUS software. The second derivative order was applied in the absorbance spectra to discriminate overlapping adjacent vibrational modes. The second derivative order offers frequently improved resolution of overlapping vibrational modes and permits refined analysis of spectral changes between two classes [16]. Second order derivative technique was carried out in the absorbance spectra using the Savitzky-Golay method in Origin 9.1 software. The parameters were set as 5 for polynomial order and 20 for points of the window. The second-order derivative provides some valleys (negative peaks) based

on bands from the absorbance spectra. Therefore, the level and ROC curve data we calculated based on the height of valleys in the second derivative [17].

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was applied to assess the normality of variables. Comparisons of the means were performed by Student's t-tests (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For all spectral biomarkers candidates, we constructed the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All values are reported as mean \pm SEM. The number of animals used in each analysis is described in legends.

RESULTS

As expected, control and sepsis rats did not demonstrate a change in body weight ($p > 0.05$; data not shown).

Effect of sepsis in protein C (PCR) reactive on the blood of rats with sepsis

The plasmatic level of a clinical biomarker of sepsis was analyzed to confirm sepsis induction. As expected, CRP levels in blood plasma were higher ($p < 0.05$) in rats with sepsis compared to control rats (Figure 1).

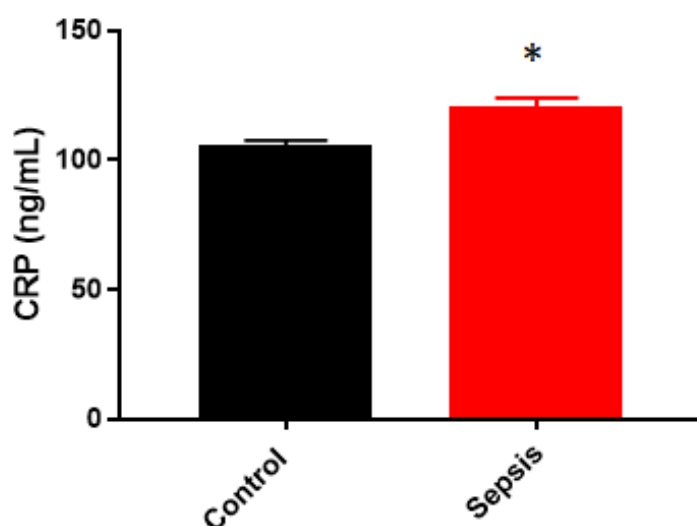


Fig 1. C-reactive protein (PCR) in plasma of rats with sepsis and control rats. Results are mean \pm SEM of 8 animals per group; * $p < 0.05$ vs. Control.

These pre-processed spectra in the plasma of rats with sepsis and controls were analyzed by two main univariate analyses, as follows: band area from absorbance spectra and the height of valleys (amplitude) in the second derivative spectra.

Univariate analysis based on band area of normalized absorbance spectra of plasma samples

The representative infrared spectrum of blood evaluated in the 3000 – 900 cm^{-1} range in rats with sepsis and controls can indicate several blood components such as lipids, proteins, DNA/RNA, and carbohydrates (Fig 2A). Twelve infrared band areas were measured in the plasma analyzed in rats with sepsis and controls, however, only the band area at 2945 – 2888 cm^{-1} was changed ($p < 0.05$) in rats with sepsis than controls (Fig 2B). The ROC curve analysis was carried out in the band area at 2945 – 2888 cm^{-1} to indicate the area under the curve (AUC), sensitivity, specificity, and accuracy of discrimination between rats with sepsis compared to controls. The selected cutoff value was 0.1345 a.u. to the band area at 2945 – 2888 cm^{-1} and it indicates an AUC of 0.8594. Besides, this band area showed a sensitivity and specificity of 87.5% and 75%, respectively ($p < 0.05$; Fig 2C).

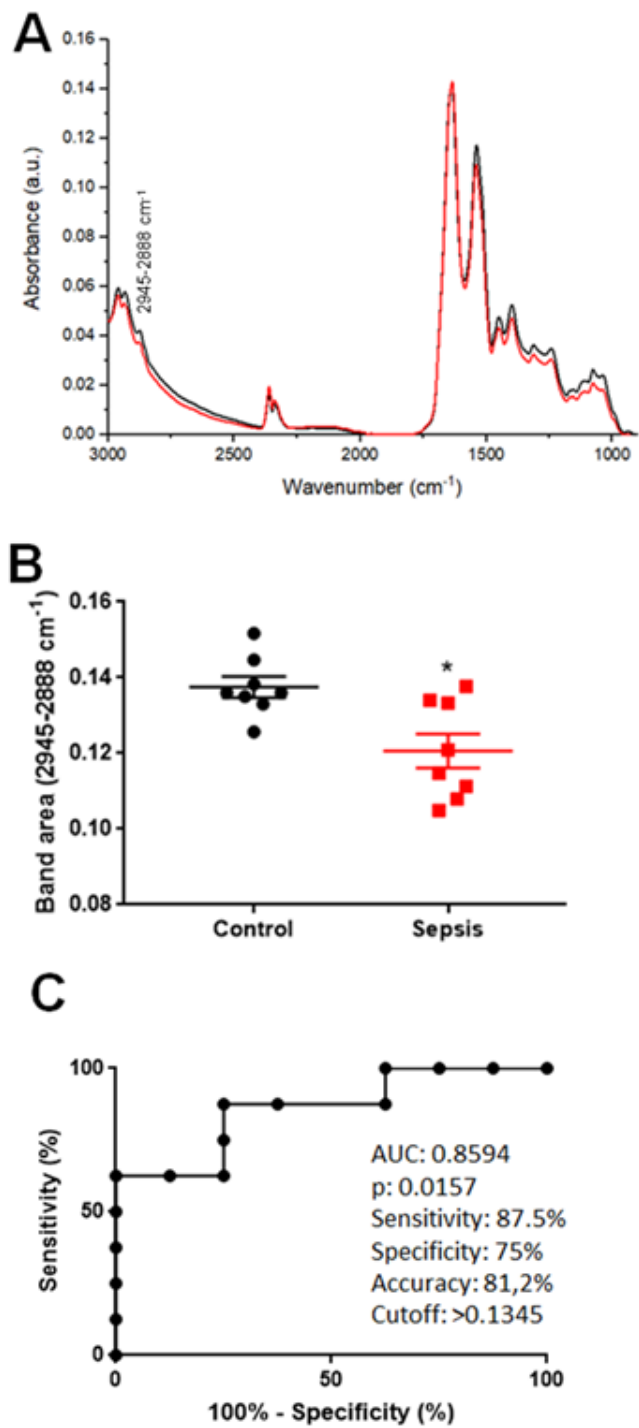


Fig 2. Representative infrared spectra (3000–900 cm^{-1}) in plasma of rats with sepsis than controls (A). Band area at 2945–2888 cm^{-1} (B). ROC curve analysis of band area at 2945–2888 cm^{-1} in absorbance spectra (C). Results are mean \pm SEM of 8 rats per group; * $p < 0.05$ vs controls.

Univariate analysis based on The height of the valley of second derivative infrared spectra in plasma samples

The representative second derivative infrared spectra of blood samples in rats with sepsis than controls indicate a superposition of several bands (Fig 3).

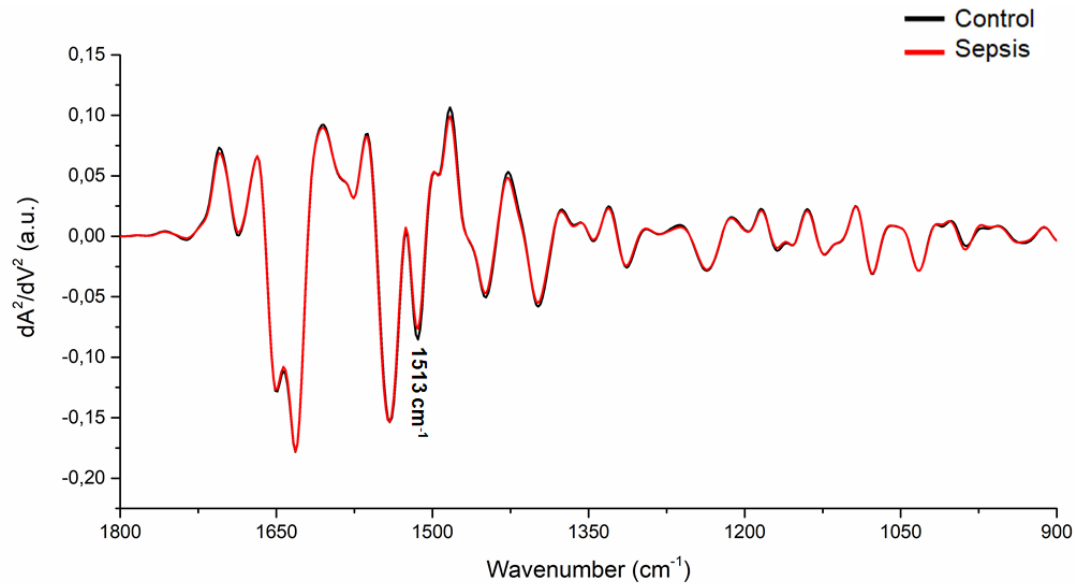


Fig 3. Representative infrared second derivative spectra (1800–900 cm^{-1}) in blood saliva of rats with sepsis and control rats.

Considering the changes in the spectrum of the vibrational mode at 1513 cm^{-1} this region was amplified in Fig 4A. In this context, the height of valleys (amplitude) was reduced ($p < 0.05$) in blood samples from rats with sepsis compared to control rats (Fig 4B). The ROC curve of vibrational mode at 1513 cm^{-1} presented a sensitivity of 87.5%, a specificity of 75%, and an accuracy of 81.2% to discriminate rats with sepsis than controls. The AUC of the vibrational mode at 1513 cm^{-1} was 0.80 ($p: 0.046$; Fig 4C).

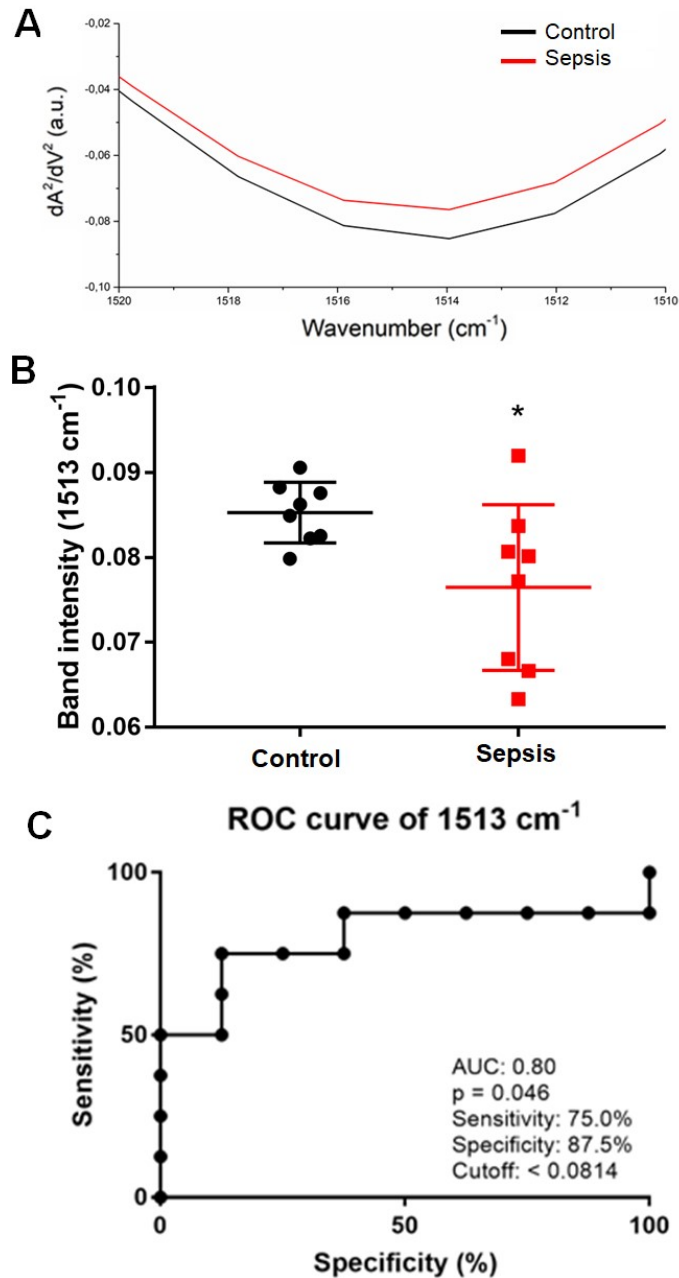


Fig 4. Representative infrared second derivative spectra ($1520\text{--}1510 \text{ cm}^{-1}$) in plasma of rats with sepsis and controls (A). The amplitude of the second order derivative at 1513 cm^{-1} in blood (B). ROC curve analysis of 1513 cm^{-1} in the second order derivative spectra (C). Results are mean \pm SEM of 8 per group. * $p < 0.05$ vs controls.

DISCUSSION

The implementation of fast, reagent-free, and sustainable tests developed for the early detection of sepsis are critical to successful sepsis treatment from a public health perspective. In this context, the present study is a pioneer as a pre-clinical proof-of-

concept study to assess the potential implementation of an ATR-FTIR platform for sepsis detection in plasma samples of rats. This biophotonic platform coupled with univariate analysis showed a reduction in the band area between 2945-2888 cm^{-1} of plasma in animals with sepsis compared to controls. Besides, this band area had a sensitivity of 87.5% and a specificity of 75%. In the second derivative spectrum, the vibrational mode at 1513 cm^{-1} was also reduced in animals with sepsis compared to controls. The height of the valley at 1513 cm^{-1} presented a sensitivity of 75% and specificity of 87.5%. Although second derivative order frequently can improve the resolution of overlapping vibrational modes to refined analysis to discriminate two classes, the accuracy performance was similar to the absorbance spectra. Thus, the spectral region between 2945-2888 cm^{-1} and the vibrational mode at 1513 cm^{-1} of plasma were responsible for the discrimination of sepsis condition, suggesting that changes can occur in lipid and amide II. Taken together, the present data suggest indicating a significant potential for infrared spectroscopy to discriminate sepsis from controls using plasma samples.

Sepsis is characterized by a set of intensive systemic reactions in response to an infection that failed to be locally contained by the host. Currently, sepsis accounts for 1 in 5 deaths globally [2]. To understand sepsis at various levels it is crucial to have a suitable and comprehensive animal model that reproduces the clinical course of the disease. Several models have contributed significantly to our understanding of host defense mechanisms during infection [19]. This is important because the characterization of the pathophysiological mechanisms could indicate molecular changes during sepsis, as well as supply profitable conditions for testing screening and diagnostic tools [20].

The model to induce in the present study was cecal ligation and puncture (CLP) which is the most widely used in pre-clinical studies [21,22]. This model fulfills the human condition that is clinically relevant. Compared to other animal models of sepsis, CLP could be performed in any rodent strain, of different ages and sex [21-24]. It is a relatively easy and inexpensive surgical procedure [5,6, 25]. Although confirmation of sepsis is not required in the CLP induction protocol, the presence of higher levels of CRP in the plasma of septic animals can be used as a biomarker to confirm sepsis induction [5,6]. In this CLP model, the grade of severity has a direct impact on the percentage of survival. The length of the ligation, the thickness of the needle, and the number of punctures are parameters that can be controlled to modulate the severity/mortality of CLP [14,23].

In this context, FTIR spectral data analysis was capable to detect changes in the plasma of rats with sepsis. The difference observed in the absorbance spectral profile at 2945-2888 cm^{-1} indicates changes in lipids and fatty acids (stretching C–H, N–H symmetric stretching vibration of CH₃ of acyl chains) [26]. A proteomic study emphasizes changes in metabolism related to lipids as one of the main plasma disorders associated with sepsis [27]. Lipid fractions play an important role in the clearance of pathogen toxins, such as LPS, and in the modulation of inflammatory responses [28, 29]. It has been described that sepsis decreases HDL levels, and promotes hypocholesterolemia, with a reduction in total cholesterol, LDL levels, and free fatty acids (FFAs) [30-33]. The imbalance in lipid metabolism aggravates the sepsis condition [34], and low LDL levels have been associated with the presence of fever and sepsis in hospitalized patients [35]. Furthermore, cholesterol levels have been associated with the risk of acquiring nosocomial infection [36]. In this context, our findings on the FTIR spectral peak decrease, associated with lipids and fatty acids (2945-2888 cm^{-1}), are consistent with the pathogenesis of sepsis, reinforcing the importance of lipid metabolism as a therapeutic target and possible detection of specific changes in sepsis that can offer an early potential screening, as observed by the ROC curve with 81.2% accuracy.

To better identify the contributing spectral characteristics, we performed a second-order derivative analysis of the spectrum. It was possible to observe a decrease in the peak intensity (amplitude) in 1513 cm^{-1} referring to amide II (proteins) [26]. Proteins are the actual players in biological systems; hence, proteome changes have been investigated in clinical and experimental sepsis revealing that biological pathways, such as inflammatory (i.e., kininogen, complement C3, alpha 1-acid glycoprotein, hemopexin, transthyretin, actin, SAA, Apo A-I4, and A-IV), acute phase response, coagulation (i.e., fibrinogen, antithrombin II), complement, mitochondrial energy metabolism, apoptosis (i.e., alpha2-HS glycoprotein) and oxidative stress (i.e., GST M1) pathways are altered at the protein level [37,38]. Previous studies of serum proteomics from a sepsis model (CLP) identified differences in serum protein expression in the first 24 hours after surgery and resulted in 40 differentially expressed proteins [39]. Many of these protein changes point to the involvement of the acute phase response, lipid metabolism, and chaperone proteins. Acute phase response proteins represent the most substantial changes [37, 39]. Thus, the change observed in the protein region by second derivative analysis corroborates previous studies on changes in the protein profile of serum from animals and patients with sepsis in the

first 24 hours. Thus, vibrational mode 1513 cm^{-1} may be a screening biomarker indicative of septic syndrome with a sensitivity of 75% and specificity of 87.5%.

Although additional studies should be performed with a larger sample clinical, it was found a reduction in band area at $2945\text{-}2888\text{ cm}^{-1}$ in the absorbance normalized spectrum and a reduction in the valley height of the vibrational mode 1513 cm^{-1} in the second derivative spectrum of plasma samples from sepsis condition as well as an adequate accuracy to be used in alternative tests for sepsis detection. In this context, we assume that further confirmation in human clinical studies should be performed to indicate the performance of this photonic platform to detect sepsis in plasma samples. However, based on the present results this innovative tool reveals an attractive potential to detect sepsis using human plasma samples.

This study demonstrated that plasmatic infrared spectra are an attractive alternative to detect sepsis using a reagent-free ATR-FTIR platform. This biophotonic platform coupled with univariate analysis showed a reduction in the band area between $2945\text{-}2888\text{ cm}^{-1}$ of plasma in rats with sepsis compared to controls. Besides, this band area had a sensitivity of 87.5% and a specificity of 75%. In the second derivative spectrum, the vibrational mode at 1513 cm^{-1} was also reduced in rats with sepsis compared to controls. The height of the valley at 1513 cm^{-1} presented a sensitivity of 75% and specificity of 87.5%. In this perspective, the spectral region between $2945\text{-}2888\text{ cm}^{-1}$ and the vibrational mode at 1513 cm^{-1} of plasma were capable to detect sepsis, suggesting that alterations can occur in both lipid and amide II components of plasma induced by sepsis.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from CNPq, CAPES, the Federal University of Uberlandia, and FAPEMIG. Our best regards to the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0).

REFERENCES

1. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, Lemeshow S, Osborn T, Terry KM and Levy MM (2017) Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *The New England journal of medicine* 376:2235-2244. doi: 10.1056/NEJMoa1703058.
2. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kisoona N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL and Naghavi M (2020) Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 395:200-211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
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;104(4):573-585. doi: 10.1016/j.mcna.2020.02.011. Epub 2020 May 12. PMID: 32505253.
4. Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care.* 2019 Nov 27;23(1):374. doi: 10.1186/s13054-019-2663-7. PMID: 31775846; PMCID: PMC6880479.
5. Soni H, Adebisi A. Early septic insult in neonatal pigs increases serum and urinary soluble Fas ligand and decreases kidney function without inducing significant renal apoptosis. *Ren Fail.* 2017 Nov;39(1):83-91. doi: 10.1080/0886022X.2016.1244082. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27767365; PMCID: PMC6014332.
6. Kieslichova E, Rocen M, Merta D, Kudla M, Splichal I, Cap J, Viklicky O, Gürlich R. The effect of immunosuppression on manifestations of sepsis in an animal model of cecal ligation and puncture. *Transplant Proc.* 2013 Mar;45(2):770-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.07.159. PMID: 23498819.
7. Duckworth E, Mortimer M, Al-Sarireh B, Kanamarlapudi V, Roy D. Frontline clinical diagnosis-FTIR on pancreatic cancer. *Cancer Med.* 2023 Jul 19. doi: 10.1002/cam4.6346. Epub ahead of print. PMID: 37466344.
8. Crocco MC, Moyano MFH, Annesi F, Bruno R, Pirritano D, Del Giudice F, Petrone A, Condino F, Guzzi R. ATR-FTIR spectroscopy of plasma supported by multivariate

analysis discriminates multiple sclerosis disease. *Sci Rep.* 2023 Feb 13;13(1):2565. doi: 10.1038/s41598-023-29617-6. PMID: 36782055; PMCID: PMC9924868.

9. Rodrigues JFS, da Silva LCM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Luckemeyer DD, Henrique AS, Pontes JP, da Silva LMG, Macedo JSS, Carvalho Junior PS, Silva ESC, Martins M, Monteiro-Neto V, Grisotto MAG, Fernandes AMR, Ferreira J, Calixto JB, Sabino-Silva R and Fernandes ES (2021) Monitoring of Peripheral Blood Leukocytes and Plasma Samples: A Pilot Study to Examine Treatment Response to Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceuticals* 14. doi: 10.3390/ph14020106.

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

11. Cardoso-Sousa L, Aguiar EMG, Caixeta DC, Vilela DD, Costa DPD, Silva TL, Cunha TM, Faria PR, Espindola FS, Jardim AC, Vieira AA, Oliveira TL, Goulart LR and Sabino-Silva R (2019) Effects of salbutamol and phlorizin on acute pulmonary inflammation and disease severity in experimental sepsis. *PloS one* 14:e0222575. doi: 10.1371/journal.pone.0222575.

12. Pinheiro G, Sabino-Silva R, Araujo MR, Gomes SP, Oliveira SW, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Gonzaga CC and Claudino M (2020) Experimental Acute Sepsis Reduced Number of Osteocalcin Immunolabeled Cells in Periodontal Ligament. *Brazilian dental journal* 31:143-151. doi: 10.1590/0103-6440202003024.

13. Cheng Y, Jope RS, Beurel E. A pre-conditioning stress accelerates increases in mouse plasma inflammatory cytokines induced by stress. *BMC Neurosci.* 2015 May 7;16:31. doi: 10.1186/s12868-015-0169-z. PMID: 25947540; PMCID: PMC4425917.

14. Li JL, Li G, Jing XZ, Li YF, Ye QY, Jia HH, Liu SH, Li XJ, Li H, Huang R, Zhang Y and Wang H (2018) Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. *The Journal of international medical research* 46:2410-2422. doi: 10.1177/0300060518764717.

15. Toscano MG, Ganea D and Gamero AM (2011) Cecal ligation puncture procedure. *Journal of visualized experiments : JoVE.* doi: 10.3791/2860.

16. Crocco MC, Moyano MFH, Annesi F, Bruno R, Pirritano D, Del Giudice F, Petrone A, Condino F, Guzzi R. ATR-FTIR spectroscopy of plasma supported by multivariate analysis discriminates multiple sclerosis disease. *Sci Rep.* 2023 Feb 13;13(1):2565. doi: 10.1038/s41598-023-29617-6. PMID: 36782055; PMCID: PMC9924868.
17. 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.
18. Caixeta DC, Lima C, Xu Y, Guevara-Vega M, Espindola FS, Goodacre R, Zzell DM, Sabino-Silva R. Monitoring glucose levels in urine using FTIR spectroscopy combined with univariate and multivariate statistical methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2023 Apr 5;290:122259. doi: 10.1016/j.saa.2022.122259. Epub 2022 Dec 17. PMID: 36584643.
19. Buras JA, Holzmann B and Sitkovsky M (2005) Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews Drug discovery* 4:854-65. doi: 10.1038/nrd1854
20. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR and Vincent JL (2016) Sepsis and septic shock. *Nature reviews Disease primers* 2:16045. doi: 10.1038/nrdp.2016.45
21. Godshall CJ, Scott MJ, Peyton JC, Gardner SA and Cheadle WG (2002) Genetic background determines susceptibility during murine septic peritonitis. *The Journal of surgical research* 102:45-9. doi: 10.1006/jsre.2001.6319
22. De Maio A, Torres MB and Reeves RH (2005) Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock* 23:11-7. doi: 10.1097/01.shk.0000144134.03598.c5
23. Turnbull IR, Wlzorek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM and Buchman TG (2003) Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock* 19:310-3. doi: 10.1097/00024382-200304000-00003

24. Diodato MD, Knoferl MW, Schwacha MG, Bland KI and Chaudry IH (2001) Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 14:162-9. doi: 10.1006/cyto.2001.0861
25. Kingir ZB, Ozdemir Kural ZN, Cam ME, Cilingir OT, Sekerler T, Ercan F, Bingol Ozakpinar O, Ozsavci D, Sancar M and Okuyan B (2019) Effects of dapagliflozin in experimental sepsis model in rats. *Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES* 25:213-221. doi: 10.5505/tjtes.2018.82826
26. Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D.I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43, 134 - 179.
27. Sharma NK, Ferreira BL, Tashima AK, Brunialti MKC, Torquato RJS, Bafi A, Assuncao M, Azevedo LCP and Salomao R (2019) Lipid metabolism impairment in patients with sepsis secondary to hospital acquired pneumonia, a proteomic analysis. *Clinical proteomics* 16:29. doi: 10.1186/s12014-019-9252-2
28. de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, Tabita-Martinez J, Wolfe ML, Badellino K, Pruscino L, Mehta NN, Asztalos BF and Reilly MP (2012) Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis* 222:390-4. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.032
29. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR and Grunfeld C (2004) Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of lipid research* 45:1169-96. doi: 10.1194/jlr.R300019-JLR200
30. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J and van Kessel KP (2003) Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Critical care medicine* 31:1359-66. doi: 10.1097/01.CCM.0000059724.08290.51
31. Pirillo A, Catapano AL and Norata GD (2015) HDL in infectious diseases and sepsis. *Handbook of experimental pharmacology* 224:483-508. doi: 10.1007/978-3-319-09665-0_15
32. Cirstea, M., Walley, K. R., Russell, J. A., Brunham, L. R., Genga, K. R., & Boyd, J. H. (2017). Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an early prognostic

marker for organ dysfunction and death in patients with suspected sepsis. *Journal of critical care*, 38, 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2016.11.041>

33. Wendel M, Paul R and Heller AR (2007) Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Intensive care medicine* 33:25-35. doi: 10.1007/s00134-006-0433-x

34. Chien, J. Y., Jerng, J. S., Yu, C. J., & Yang, P. C. (2005). Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Critical care medicine*, 33(8), 1688–1693. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000171183.79525.6b>

35. Shor R, Wainstein J, Oz D, Boaz M, Matas Z, Fux A and Halabe A (2007) Low serum LDL cholesterol levels and the risk of fever, sepsis, and malignancy. *Annals of clinical and laboratory science* 37:343-8.

36. Delgado-Rodriguez M, Medina-Cuadros M, Martinez-Gallego G and Sillero-Arenas M (1997) Total cholesterol, HDL-cholesterol, and risk of nosocomial infection: a prospective study in surgical patients. *Infection control and hospital epidemiology* 18:9-18. doi: 10.1086/647494

37. Cao Z and Robinson RA (2014) The role of proteomics in understanding biological mechanisms of sepsis. *Proteomics Clinical applications* 8:35-52. doi: 10.1002/prca.201300101

38. Sharma, N. K., & Salomao, R. (2017). Sepsis Through the Eyes of Proteomics: The Progress in the Last Decade. *Shock (Augusta, Ga.)*, 47(1S Suppl 1), 17–25. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000698>

39. Hinkelbein, J., Feldmann, R. E., Jr, Schubert, C., Peterka, A., Schelshorn, D., Maurer, M. H., & Kalenka, A. (2009). Alterations in rat serum proteome and metabolome as putative disease markers in sepsis. *The Journal of trauma*, 66(4), 1065–1075. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181958ad7>

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW CHAN, K. L.; KAZARIAN, S. G. Attenuated total reflection Fouriertransform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chemical Society Reviews*, London, v. 45, n. 7, p. 1850-1864, Apr 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5CS00515A>.

BAKER, M. J, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, London, v. 9, n. 8, p. 1771-1791, July 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2014.110>.

BALAN, V.; MIHAI, C. T.; COJOCARU, F. D.; URITU, C. M. et al. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials (Basel)*, 12, n. 18, Sep 6 2019.

BOECHAT, A. L.; BOECHAT, N. O. Sepsis: diagnóstico e tratamento. *Rev. Bras. Clin. Med.*, São Paulo, v. 8, n. 5, p. 420-7, 2010.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians /Society Critical Care Medicine. *Chest*, v. 101, n. 6, p. 1644-55, 1992.

BRUYNE, S.; SPEECKAERT, M. M.; DELANGHE, J. R. Applications of midinfrared spectroscopy in the clinical laboratory setting. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*, London, v. 55, n. 1, p.1-20, Dec. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408363.2017.1414142>.

BUNACIU, A. A.; FLESCHEAN, Ș.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Vibrational Spectroscopy in Body Fluids Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47, n. 1, p. 67-75, 2017/01/02 2017.

CAIXETA, D. C.; AGUIAR, E. M. G.; CARDOSO-SOUSA, L.; et al. (2020) Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. PLoS ONE, v. 15, n. 3, p. e0223461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>

FERREIRA, I. C. C.; AGUIAR, E. M. G.; SILVA, A. T. F.; et al. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy analysis of saliva for breast cancer diagnosis. Journal Of Oncology, Cairo, v. 2020, p. 1-11, 2020. Hindawi Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4343590>.

HEINEN, P. E. T. Estudo das Alterações Mitocondriais Provocadas na Sepse por Espectroscopia de Infravermelho pela Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. 70 p.

ILAS - Instituto Latino-Americano de Sepse. Sepse: um problema de saúde pública. Brasília: CFM, 2015. 90 p.

KAWASAKI, T. Update on pediatric sepsis: a review. Journal of Intensive Care, London, v. 5, n. 1, p. 47, July 2017.

KHAUSTOVA, S. A. et al. Assessment of biochemical characteristics of the saliva using Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. Bulletin Of Experimental Biology And Medicine, New York, v. 148, n. 5, p.841-844, Nov. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-010-0831-5>.

KHAUSTOVA, S. et al. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. The Analyst, Cambridge, v. 135, n. 12, p.3183-3192, Dec. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c0an00529k>

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C. et. al 2001SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med., v. 29, p. 530–538, 2003. DOI 10.1007/s00134-003-1662-x

MACHADO, F. R.; et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1180-1189, nov. 2017. Elsevier BV

NAMATH, A.; PATTERSON, A. J. Genetic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Clin.*, v. 25, n. 4, p. 835-56, 2009.

REZENDE, E.; JUNIOR, J. M. S.; ISOLA, A. M.; CAMPOS, E. V.; AMENDOLA, C. P.; ALMEIDA, S. L. Epidemiology of severe sepsis in the emergency department and difficulties in the initial assistance. *Clinical Sciences*, v. 63, n. 4, 2008.

RHODES, A.; et al. Surviving Sepsis Campaign. *Critical Care Medicine*, [s.l.], v. 45, n. 3, p.486-552, mar. 2017.

RODRIGUES, R. P. C. B.; AGUIAR, E. M. G.; SOUSA, L. C.; et al. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATRFTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Brazilian Dental Journal*, v. 30, n. 5, p. 437-445, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201902228>

SCHUBERT, D.; KITAJIMA, P; ARDITTI, B.; et al. *Sepse 2019/2020: o que há de novo no diagnóstico, tratamento e abordagem prática*. 3. Ed., PebMed: Rio de Janeiro, 2020, 42 p.

SCHULTZ, C. P. The Potential Role of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Imaging in Cancer Diagnosis Incorporating Complex Mathematical Methods. 1, n. 2, p. 95-104, 2002.

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS, G. S.; LEVY, M. L.; et al. Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 775-87, 2016. doi: 10.1001/jama.2016.0289. PMID: 26903336; PMCID: PMC4910392.

SILVA, E.; PINHEIRO, C.; JÚNIOR, V. M. Consenso Brasileiro de sepse - Epidemiologia. Rev. Bras. Terap. Intens., v.16, n. 2, 2004.

SILVA, S. F. P. Avaliação de Biomarcadores Salivares para Diagnóstico de Transtorno de Espectro Autista Por Espectroscopia ATR-FTIR. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2020. 59 p. <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.407>

SINGER, M.; DEUSTSCHMAN, C. S; SEYMOUR, C. W. et. al The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). Jama, Chicago, v. 315, n. 8, p. 801-810, Feb 2016. DOI:10.1001/jama.2016.0287