UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

KARIN REGINA KOLBE

Avaliação da inflamação e apoptose em tecido renal em modelo experimental de doença meningocócica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade

(Versão corrigida, Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

KARIN REGINA KOLBE

Avaliação da inflamação e apoptose em tecido renal em modelo experimental de doença meningocócica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kolbe, Karin Regina
Avaliação da inflamação e apoptose em tecido renal em modelo experimental de doença meningocócica / Karin Regina Kolbe. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Doença meningocócica 2.Lesão renal aguda 3.Apoptose 4.Inflamação 5.Sepse 6.Modelo experimental

USP/FM/DBD-401/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: KOLBE Karin Regina

Título: Avaliação da inflamação e apoptose em tecido renal em modelo experimental de doença meningocócica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimento especial ao meu marido Tiago, minha orientadora Profa. Dra. Lúcia, Talita, Letícia, Elza e Fábio.

RESUMO

Kolbe KR. *Avaliação da inflamação e apoptose em tecido renal em modelo experimental de doença meningocócica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A doença meningocócica permanece como problema de saúde pública mundial devido à sua alta morbi-mortalidade. A clínica varia desde quadro puramente meníngeo até choque séptico, quando a mortalidade chega a 40%. Diversos estudos demonstraram o envolvimento de TLR-2, -4 e -9 para o desenvolvimento da doença, assim como a ação das citocinas no sangue e em diversos tecidos. A sepse por si só seria capaz de explicar a injúria renal aguda que pacientes sofrem num quadro de meningoccocemia, entretanto, não havia sido determinado se a ação do meningococo era local ou se acontecia devido à liberação de toxinas. Diante disso, optamos por estudar o tecido renal na doença meningocócica, através do modelo murino. Para isso, 30 camundongos foram divididos em três grupos, sendo 10 no SHAM, 10 num grupo baixa dose de inóculo e 10 no grupo alta dose de inóculo. Após a inoculação intraperitoneal, os animais foram observados por 24h e após a eutanásia o sangue e rim foram utilizados para análise. No pool de soro dos animais dosou-se citocinas, sendo que todas as testadas (TNFα, IFNγ, IL1B, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12 e GM-CSF) estavam consideravelmente aumentadas em relação ao Grupo SHAM, o que corrobora o achado no tecido renal de aumento de neutrófilos ($p<0,01$) e linfócitos. Na análise histológica foram evidenciadas micro-colônias bacterianas no interstício e possivelmente intracelular e intratubular, sem necrose tubular aguda, e a presença da bactéria foi confirmada através de imunofluorescência. Para avaliação da via de ativação da inflamação e apoptose, dosamos TLR-2 ($p<0,05$) e TLR-4 no tecido renal, que também se mostraram aumentadas em relação ao grupo SHAM. Por fim, dosamos a expressão de fatores de apoptose (p53, citocromo c, caspase 3 e caspase 9) no tecido renal, assim como presença de DNA fragmentado pela técnica de TUNEL, evidenciando aumento de apoptose nos grupos doentes. A função tubular foi avaliada através da dosagem da concentração urinária de sódio e potássio, no qual pode-se perceber diminuição da concentração desses íons, inferindo alteração da função tubular. Os achados corroboram outros já relatados na literatura de alteração renal no quadro séptico, entretanto esse é o primeiro relato de visualização do meningococo no tecido renal do qual temos conhecimento e a ativação dos marcadores de apoptose também no rim. Mais estudos são necessários para a completa avaliação das vias de ativação desses mecanismos.

Descritores: Doença meningocócica. Lesão Renal Aguda. Apoptose. Inflamação. Sepse. Modelo experimental.

ABSTRACT

Kolbe KR. *Evaluation of inflammation and apoptosis in renal tissue in an experimental model of meningococcal disease* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

The meningococcal disease remains a public health concern due to its high morbi-mortality. The clinic of the disease varies from pure meningitis to septic shock, this with a mortality rate of 40%. Many studies demonstrated the involvement of TLR-2, -4 and -9 for the disease manifestation, as well as cytokines in blood and other tissues. Sepsis itself could explain kidney injury in patients with severe disease, however it would not have been determined if it was a direct action from the meningococcus or a released toxin. Therefore, we decided to evaluate the renal tissue under meningococcemia in a murine model. Thirty mice were divided in three groups: 10 of SHAM, 10 in low dose and 10 in high dose of inoculum of meningococcus. After the intraperitoneal inoculation the animals were observed for 24h and blood and kidneys were collected after euthanasia. The cytokines (NFα, IFNγ, IL1B, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12 and GM-CSF) were dosed in sera and they were significantly higher than control and this finding corroborates with the augmentation of neutrophils ($p<0,01$) and lymphocytes in kidney interstice. Microcolonies of meningococcus were found in renal tissue through histological analysis. The colonies were in interstice and, possibly, intracellular and intratubular, without acute tubular necrosis, and the bacterium was characterized in kidney by immunofluorescence. In order to analyse activation of inflammation and apoptosis pathways, TLR-2 ($p<0,05$) and -4 were evaluated in renal tissue, leading to augmentation of p53, cytochrome c, caspase -3 and -9 and DNA fragmentation, this one evaluated by TUNEL. We also dosed sodium and potassium concentrations in urine which were diminished in experimental groups, probably due to a tubular defect. These findings corroborate others described in literature of acute kidney injury in sepsis. However, to the best of our knowledge this is the first time that the meningococcus is characterized and apoptosis activation in renal tissue. More studies are needed to the complete evaluation of the pathways involved.

Descriptors: Meningococcal Infections. Acute Kidney Injury. Apoptosis. Inflammation. Sepsis. Experimental model.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição de Sorogrupos de Meningococo 17
Figura 2- Notificações de Casos de Doença Meningocócia por estado entre 2008 e 2018. 17
Figura 3 - Sinalização via TLR-4 dependente de MyD88 21
Figura 4- Sinalização Independente de MyD88 22
Figura 5 - Vias de Ativação do Inflamossoma 23
Figura 6 - Vias de Apoptose 25
Figura 7- Análise histológica de rim de animal do Grupo SHAM 36
Figura 8 - Análise histológica de rim de animal do Grupo SHAM 36
Figura 9 - Análise histológica de rim de animais dos grupos infectados 38
Figura 10 - Análise histológica de rim de animal do grupo infectado 38
Figura 11 - Análise histológica de rim de animal do grupo infectado 39
Figura 12 - Análise histológica de rim de animal do grupo infectado 39
Figura 13 - Avaliação por imunofluorescência da presença de meningococo - Grupo SHAM 40
Figura 14 - Avaliação por imunofluorescência da presença de meningococo - Grupos infectados 40
Figura 15 - -Avaliação por imunofluorescência da presença de meningococo - Grupos infectados 41
Figura 16 - Avaliação do infiltrado leucocitário (IHC) - marcação de neutrófilos 42
Figura 17 - Avaliação do infiltrado linfocitário (IHC) 43
Figura 18 - Expressão de TLR-2 e TLR-4 em células do tecido renal 44
Figura 19 – Definição dos gates dos Grupos LD e HD, respectivamente 46
Figura 20 - Avaliação de fragmentação do DNA pelo método de TUNEL – Grupo SHAM 48
Figura 21 - Avaliação de fragmentação do DNA pelo método de TUNEL - grupos infectados 49

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de sobrevida dos animais durante a fase experimental 35
Gráfico 2 - Distribuição de micro-colônias no tecido renal 37
Gráfico 3 - Contagem de células marcadas para MPO 42
Gráfico 4 - Contagem de células marcadas para CD3 43
Gráfico 5 - Citocinas pró-inflamatórias 45
Gráfico 6 - Citocinas anti-inflamatórias 46
Gráfico 7 - Avaliação dos marcadores de apoptose da via intrínseca por citometria de fluxo 47
Gráfico 8 - Contagem de células marcadas - método de TUNEL 50
Gráfico 9 - Concentrações de sódio e potássio urinários 50

ABREVIAÇÕES

AIM2	*Absent in melanoma2*
Apaf-1	Fator ativador de protease 1
ASC	*Apoptosis-associated speck-like protein*
ATP	Adenosina trifosfato
CLP	Ligadura e punção cecal
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DM	Doença Meningocócica
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GSMD	Gasdermina D
HD	*High dose*
HE	Hematoxilina e Eosina
IF	Imunofluorescência
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IHC	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IRA	Injúria Renal Aguda
LA	Lipídeo A
LD	*Low dose*
LOS	Lipooligossacárides
LRR	*Leucine-rich repeat*
MPO	Myeloperoxidase
MyD88	*Myeloid differentiation factor 88*
NFκB	*Nuclear fator kappa b*
NLR	*NOD-like receptor*
NOD	*nucleotide-binding oligomerization domain*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	*Pathogen-associated molecular patterns*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PRR	*Patterns recognitions receptors*
PYD	Pirina

TLR-2	*Toll-like receptor-2*
TLR-4	*Toll-like receptor-4*
TRIF	TIR domain containing adaptor inducing IFN-β
TUNEL	*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*
WB	*Western Blotting*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Agente Etiológico 16
1.2 Epidemiologia 16
1.3 Clínica 18
1.4 Patogênese 18
1.5 Resposta Imune Inata e Apoptose 20
2 OBJETIVOS DO ESTUDO 26
3 METODOLOGIA 27
3.1 Comitê de Ética 27
3.2 Estudo Experimental 27
3.3 Citometria de Fluxo 28
3.4 Detecção de citocinas inflamatórias pela técnica de Luminex® 29
3.5 Histologia 30
3.6 Bioquímica Urinária 31
3.7 Expressão de proteínas em tecido renal pela técnica de *Western blotting* (WB) 31
3.8 Avaliação de apoptose no tecido renal pela técnica de Tunel (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 32
3.9 Detecção de proteína tecidual pela técnica de imuno-histoquímica 32
3.10 Detecção de proteína tecidual pela técnica de imunofluorescência 33
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA 34
4 RESULTADOS 35
4.1 Sobrevida 35
4.2 Análise Histológica do Tecido 35
4.3 Pesquisa de Antígeno no tecido renal 39
4.4 Avaliação de Infiltrado Leucocitário 41
4.5 Expressão de TLR-2 e TLR-4 43
4.6 Análise de Citocinas Séricas 44
4.7 Avaliação de Marcadores de Apoptose em Tecido Renal 46
4.7.1 Citometria de Fluxo 46
4.7.2 TUNEL 47
4.8 Bioquímica Urinária 50
5 DISCUSSÃO 51

6 CONCLUSÃO.....55
REFERÊNCIAS.....56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agente Etiológico

A bactéria *Neisseria meningitidis* é um diplococo Gram negativo aeróbio, patogênico apenas para o ser humano e, assim como outras bactérias gram-negativas, é composta por uma membrana externa de lipídios, proteínas e lipooligossacárides (LOS - com destaque para o lipídeo A como parte da composição da molécula). Ainda, possui uma cápsula polissacarídica externa que identifica os treze sorogrupos do meningococo(1,2), dos quais apenas seis causam doença meningocócica invasiva: A, B, C, W-135, X e Y(3).

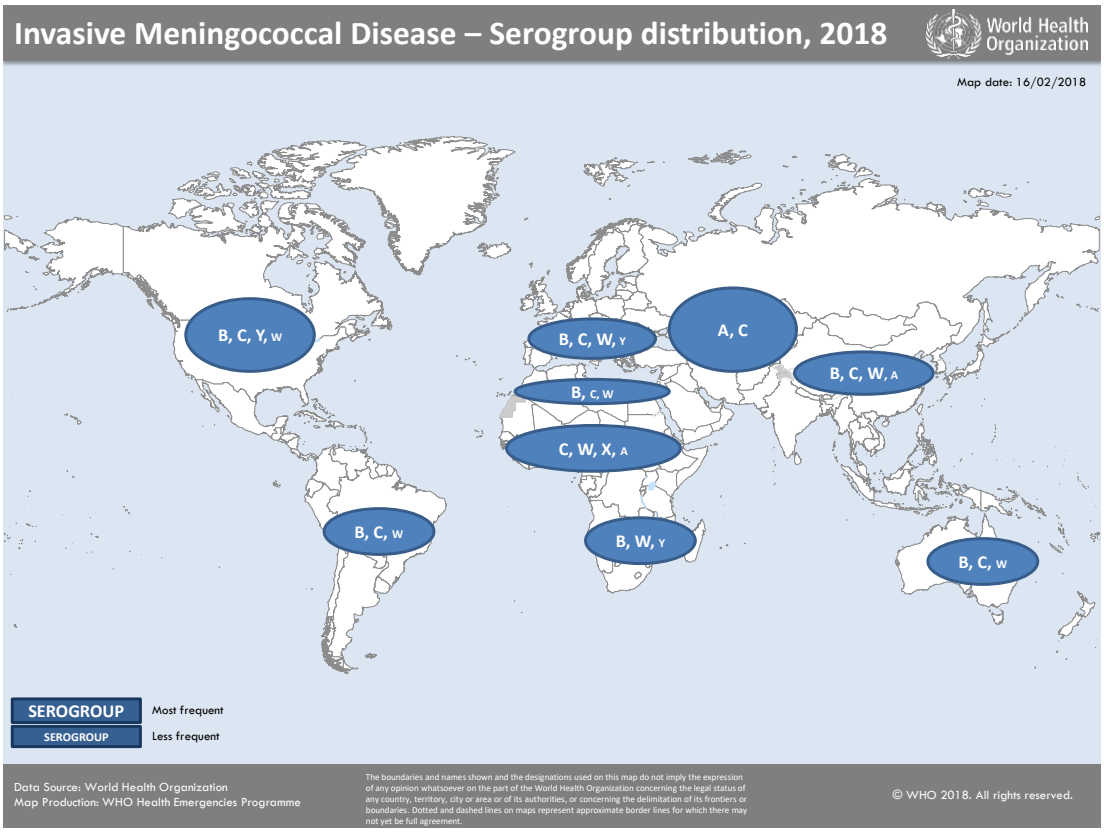
A cápsula caracteriza a cepa invasora e os fatores de virulência são determinados pela própria cápsula polissacarídica, por proteínas de membrana externa incluindo o pili, porinas PorA e PorB (que conferem o subsorotipo e o sorotipo, respectivamente), a molécula de adesão Opc, mecanismos de sequestro de ferro e endotoxinas – LOS (que conferem o imunotipo)(4).

1.2 Epidemiologia

A incidência de Doença Meningocócica (DM) muda de acordo com a região, podendo variar entre 0,5 casos/100.000 habitantes na América do Norte até a 1000 casos/100.000 habitantes durante epidemias no continente africano(5).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), os principais sorogrupos causadores de DM na América do Sul são os sorogrupos B, C e, em menor proporção, W135 conforme figura abaixo.

Figura 1 - Distribuição de Sorogrupos de Meningococo



Fonte: OMS.

Dados do Ministério da Saúde, através do DATASUS, mostram que num período de dez anos, entre janeiro de 2008 e janeiro de 2018, mais de 23mil casos de DM foram notificados no país, sendo os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro os que tiveram maior número de notificações.

Figura 2- Notificações de Casos de Doença Meningocócia por estado entre 2008 e 2018.

Morbidade Hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil
Internações por Faixa Etária 1 e Unidade da Federação
Capítulo CID-10: I. Algumas doenças infecciosas e parasitárias
Lista Morb CID-10: Infecção meningocócica
Período:Jan/2008-Jan/2018

Faixa Etária 1	RO	AC	AM	RR	PA	AP	TO	MA	PI	CE	RN	PB	PE	AL	SE	BA	MG	ES	RJ	SP	PR	SC	RS	MS	MT	GO	DF	Total
Menor 1 ano	14	6	23	19	76	31	40	85	5	38	15	16	129	10	12	140	280	30	260	1101	202	126	256	64	83	117	55	3233
1 a 4 anos	17	3	17	10	37	25	37	51	11	84	36	27	162	11	10	133	242	21	325	1561	202	140	214	52	82	145	73	3728
5 a 9 anos	17	5	31	4	51	12	38	64	12	88	26	31	153	17	12	169	219	34	248	1238	144	110	181	56	69	86	49	3164
10 a 14 anos	23	11	31	11	54	15	38	61	15	68	30	17	110	14	13	165	189	16	182	706	125	75	142	30	50	91	19	2301
15 a 19 anos	8	9	44	9	52	3	10	44	9	56	30	11	61	15	9	128	124	28	122	600	108	58	129	15	39	52	19	1792
20 a 29 anos	13	9	39	27	58	4	16	38	12	49	34	23	70	14	17	163	208	33	154	744	137	92	211	25	56	85	31	2362
30 a 39 anos	7	15	28	15	44	4	7	33	16	39	28	7	54	6	7	130	171	25	145	533	130	78	191	23	46	102	27	1911
40 a 49 anos	5	3	16	8	21	5	13	15	14	46	17	6	34	8	5	93	165	26	92	539	114	80	158	21	44	90	21	1659
50 a 59 anos	8	6	6	7	21	1	9	16	5	24	13	4	33	4	3	50	119	19	93	424	112	57	133	10	22	61	5	1265
60 a 69 anos	5	-	4	5	15	1	3	9	13	28	3	3	16	3	2	36	105	12	63	248	57	31	90	10	17	44	9	832
70 a 79 anos	1	-	6	1	6	1	1	7	2	10	3	6	17	3	1	23	62	20	27	112	49	23	60	3	7	28	1	480
80 anos e mais	-	1	7	-	3	2	-	3	4	3	2	4	20	-	-	19	54	15	18	74	33	10	29	1	4	30	1	337
Total	118	68	252	116	438	104	212	426	118	533	237	155	859	105	91	1249	1938	279	1729	7880	1413	880	1794	310	519	931	310	23064

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)
Notas:

Situação da base de dados nacional em 29/04/2016.
Dados de janeiro de 2015 até março de 2016 sujeitos a retificação.

Fonte: Ministério da Saúde, 2018.(6)

1.3 Clínica

O espectro da doença varia de meningite a choque séptico, com diferentes taxas de mortalidades, chegando a 40% nos casos de choque séptico(7).

No início, o paciente pode apresentar sintomas inespecíficos, como febre, cefaleia e mal estar, o que dificulta o diagnóstico precoce de doença meningocócica(7,8). A clássica tríade composta por rigidez de nuca, alteração do nível de consciência e febre está presente em apenas 27% dos casos(9,10). Febre é o primeiro sinal a ser reconhecido em crianças menores de cinco anos, enquanto cefaleia é o primeiro sintoma a ser relatado nas maiores de cinco anos(11).

Já os sinais característicos de doença meningocócica, como petéquias e púrpura, podem chegar a 64% em adultos(10) e variar de 60 a 90% em crianças(9). A presença das lesões facilita o diagnóstico, mas pode ser mais difícil de reconhecer em negros. Na meningococcemia, elas aparecem de 6 a 12h após o início dos sintomas(1,3).

Há ainda apresentações incomuns da doença como colite(12), artrite, pericardite, celulite, endoftalmite, supraglotite fulminante, uretrite e pneumonia. Artrite e pericardite também podem acontecer de forma reativa a formação de imunocomplexos em até 20% dos pacientes, do quarto ao sétimo dia da fase de convalescença. Por fim, há a meningococcemia crônica, apresentação rara que se caracteriza por febre baixa, *rash* e artrite(1,13).

Embora muitas das apresentações iniciais sejam inespecíficas, a evolução clínica para infecção meningocócica severa é rápida e pode evoluir para disfunção múltipla dos órgãos e óbito. Aproximadamente 15% de crianças com meningococcemia precisam de suporte intensivo e desenvolvem injúria renal aguda (IRA) com necessidade de terapia de substituição renal. Muitas outras ainda desenvolvem IRA em menor grau(14).

1.4 Patogênese

A nasofaringe é o único reservatório do meningococo, sendo que a transmissão acontece por contato direto ou gotículas(2). A colonização normalmente é um evento imunizante e produz anticorpos contra antígenos capsulares e não capsulares. A

maioria das infecções invasivas ocorre nas primeiras duas semanas da aquisição da nova cepa, pois se a colonização persistir após esse período, uma resposta imunológica contra a cepa colonizadora já terá acontecido(15).

Após atingir a nasofaringe, o meningococo liga-se especificamente a células epiteliais colunares não ciliadas e induz pseudópodos que resultarão na internalização do meningococo na célula(4).

A principal proteína de adesão é o pili, que tem como alvo o CD46 no epitélio da nasofaringe, seguida das moléculas de adesão Opa e Opc, que se ligam ao CD66 e integrinas, respectivamente. Apenas a bactéria não encapsulada é capaz de penetrar na célula, assim como a síntese dela é interrompida ao ser internalizada(13). É justamente essa especificidade da ligação entre as proteínas de superfície do meningococo e o hospedeiro que torna o humano o único hospedeiro natural da bactéria.(16)

A cápsula polissacarídica altamente hidrofílica e carregada protege o meningococo da fagocitose e da ação bactericida do sistema complemento(17). A ligação estimula a internalização do meningococo, que fica protegido por vacúolos membranosos, além de fatores como IgA1 protease que degrada proteínas de membrana associada ao lisossomo(4). Para que o meningococo possa se multiplicar é necessário a captação de ferro pela bactéria através da transferrina, lactoferrina, hemoglobina e haptoglobina-hemoglobina, sendo sua aquisição essencial para a virulência da bactéria(18). Em casos de bacteremias, pode ocorrer a colonização da microvasculatura endotelial pelo meningococo, ocasionando focos de trombo e vasculite(19).

Estudo realizado com modelo experimental porcino e avaliando pacientes também diagnosticados com DM observou-se que o DNA bacteriano estava presente em diversos órgãos, mais expressivamente em pulmões e fígado, mas também foi encontrado no baço, rins, intestino e músculos(20). Outro estudo realizado com amostras de tecido de pacientes que tiveram DM também encontrou DNA bacteriano nos mais diversos órgãos, entre eles rins, fígado, pulmão e coração (21).

1.5 Resposta Imune Inata e Apoptose

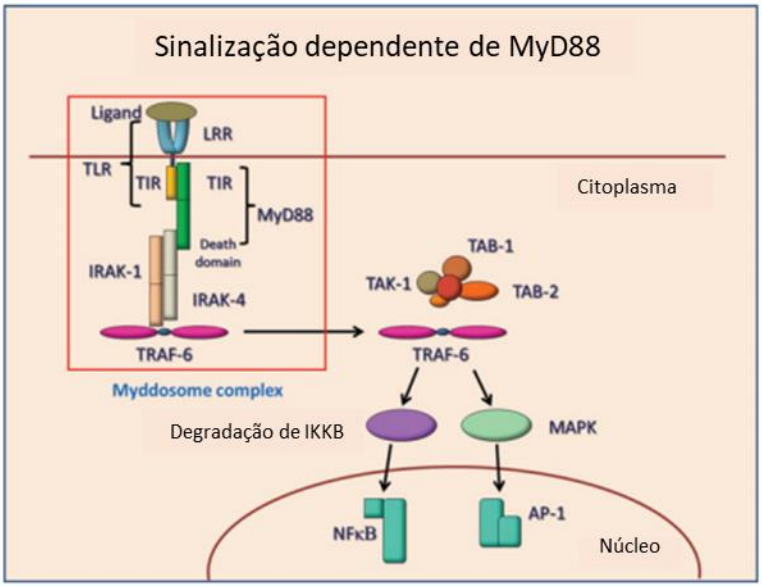
Diante da infecção pelo meningococo uma série de reações em cadeia acontecem com o objetivo de conter a evolução da doença. A primeira linha da imunidade inata é composta pela resposta do sistema complemento, que é composto por diversas proteínas solúveis presentes no sangue ou em outros fluidos corpóreos(22). Pessoas com deficiência na fase terminal da cascata (em C5 a C9) são mais suscetíveis à DM(23).

O reconhecimento da bactéria pelo sistema imune ocorre através da interação entre PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) e PRRs (*patterns recognitions receptors*), sendo o principal e melhor caracterizado o TLR (*toll-like receptor*), provocando intensa resposta inflamatória. Até o momento, treze TLRs foram caracterizados em camundongos e 10 em seres humanos(24), sendo que destes estão envolvidos no reconhecimento do meningococo os TLR-2, -4 e -9(25).

A ativação de NLR (*NOD-like receptor)* e TLR desencadeiam uma reação que acaba por ativar fatores de transcrição como o NFκB (*nuclear fator kappa b*), AP-1 (proteína ativadora) e IRF (fator de regulação do interferon) para induzir a expressão de citocinas inflamatórias e IFNs tipo I(22,26).

Através do reconhecimento de LOS pelo TLR-4, a proteína acessória MD-2 liga-se ao TLR-4 formando um complexo que é responsável pela ligação direta com o LOS. Uma forma indireta de reconhecimento de LOS pelo TLR-4 é através da ligação de LOS a CD14 e consequente transferência do material para a proteína MD-2(22). A ligação de LA ao complexo MD-2-TLR-4 ativa a resposta intracelular mediada por MyD88 gerando a ativação de NFκB e consequente produção de citocinas (como TNFα, IL-1β e IL-6) conforme figura abaixo(27,28).

Figura 3 - Sinalização via TLR-4 dependente de MyD88

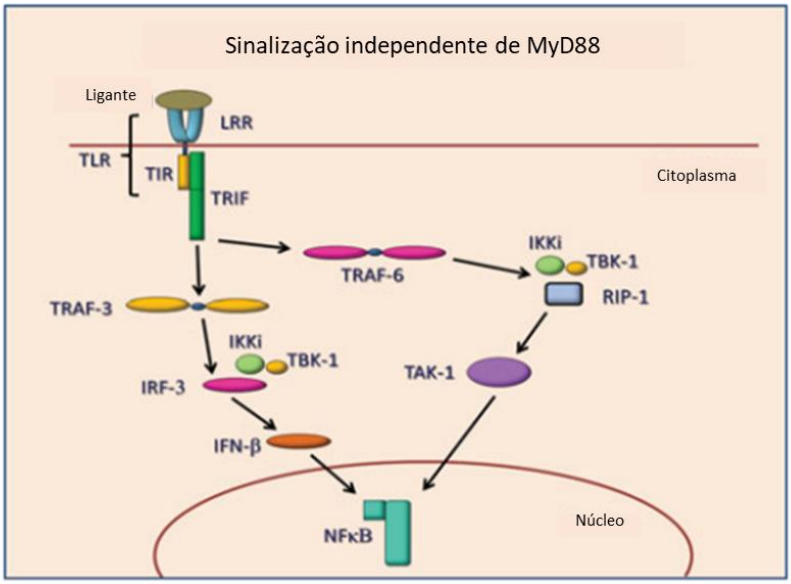


Adaptado de Vidya *et al*.(28)

A via de sinalização dependente de MyD88 é ativada tanto pelos TLRs quanto pela família IL-1R. O estímulo de MyD88 pelo ligante associado ao TLR promove a interação entre MyD88 e IRAK-4. Na sequência, é formado o midossoma e IRAK-4 ativa IRAK-1. Após a auto-fosforilação de IRAK-1 ocorre a associação com TRAF-6 que ativa AP-1 ou o complexo TAK-1/TAB. A ativação causa degradação de NFκB levando à síntese de secreção de citocinas pró-inflamatórias. Adaptado de Vidya *et al.*(28)

Outra via de sinalização ocorre independentemente da ligação com o MyD88. Esta via específica é acionada através de alguns TLRs, entre eles o TLR-4. A via provoca a ativação de NFκB na fase terminal, não sendo suficiente de forma isolada para gerar citocinas. Estas serão expressas através da ligação de IRF3 com IFNβ na porção final da via ou através de TAK-1(28).

Figura 4- Sinalização Independente de MyD88

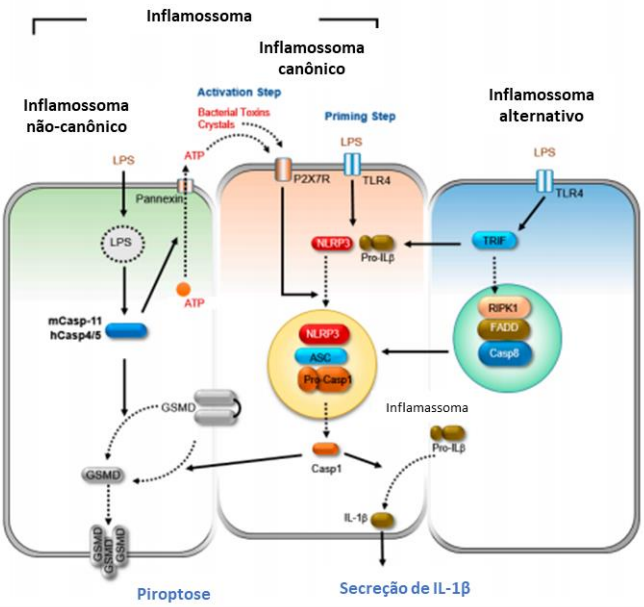


Esta via também é chamada de via dependente de TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing IFN-β*). Após o estímulo do TLR-4 pelo ligante ocorre o recrutamento da molécula TRAM ou TRIF. A interação de TRIF com TRAF-6 leva a ubiquitinação de RIP-1 que ativa o complexo TAK-1. Outra via segue através da interação entre TRIF e TRAF-3 que provocam a fosforilação de IRF3 que se liga a IFNβ promovendo a expressão de genes inflamatórios. Adaptado de Vidya *et al*.(28)

Além da produção de citocinas através da ativação de TLRs, outra via possível é através das caspases -1, -4 e -5 em humanos e caspases -1 e -11 em camundongos. A caspase-1 é ativada pelo inflamossoma, que é um complexo proteico multimérico composto por PRRs: NOD, LRR, NLR, pirina e AIM2(29). Os inflamossomos que ativam a caspase-1 são denominados canônicos, enquanto que os que ativam as caspases -4, -5 e -11 são denominados não canônicos.

A ativação da caspase-1 ocorre após os PRRs oligomerizados recrutarem a proteína adaptadora ASC através de interações PYD-PYD e formarem o complexo NLRP3. A cascata levará à produção e secreção de IL-1β e clivagem de gasdermina D (GSMD), que promove a formação de poros na membrana e a piroptose(30). Já as caspases -4, -5 e -11 ativam panexina-1 levando à liberação de ATP, gerando um efluxo de K^+ com o objetivo de ativar o inflamossoma e secretar IL-1β. Na via alternativa, o estímulo provocado pelo LOS pode acarretar num estímulo via TLR-4 independente de efluxo de K^+ e neste caso não há indução de piroptose(31).

Figura 5 - Vias de Ativação do Inflamossoma



Vias de ativação das caspases pelo inflamossoma. Adaptado de Lee KH *et al*. (31)

Tabela 1 - Citocinas

Citocina	**Célula produtora**	**Ações**
GM-CSF	Macrófagos, células T	Estimula o desenvolvimento e a diferenciação de neutrófilos
IFN-γ	Células T, células NK	Ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas do MHC e dos componentes do processamento de antígenos, troca de classes de Ig, supressão de T_H2
IL-1β	Macrófagos, células epiteliais	Febre, ativação de células T e macrófagos
IL-2	Células T	Proliferação de células T
IL-4*	Células T, mastócitos	Ativação de células B, mudança para IgE, indução de diferenciação em células T_H2
IL-5	Células T, mastócitos	Crescimento eosinófilos, diferenciação

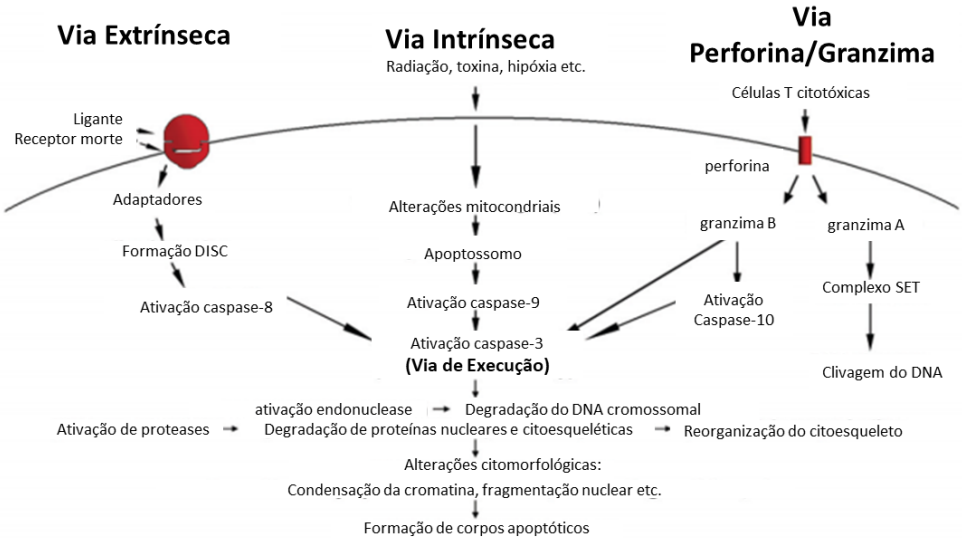
IL-6	Células T, macrófagos, células endoteliais	Febre, crescimento e diferenciação de células B e T, produção de proteínas de fase aguda
IL-10*	Monócitos	Supressão de Macrófagos
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativação de células NK, indução da diferenciação de células T CD4 em semelhantes a T_H1
TNF-α	Macrófagos, células NK, células T	Promoção da inflamação, ativação endotelial

*Ação anti-inflamatória. Fonte: Murphy K. (22)

As caspases restantes estão envolvidas com o processo de morte celular programada, também denominada apoptose. Há três vias possíveis, sendo uma a intrínseca ou mitocondrial, outra extrínseca ou de receptores de morte celular e a terceira é a ativação de caspase iniciada por granzima-B(32).

Na via intrínseca ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial após estímulos internos e externos, provocando a liberação de componentes mitocondriais, como o citocromo c que juntamente com fator ativador de protease-1 (Apaf-1) e pro-caspase-9 formam o apoptossomo. Após a clivagem da pro-caspase-9, a caspase-9 ativa as caspases-3, -6 e -7(31,32). Membros da família Bcl-2 controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial, sendo que Bcl-2 e Bcl-x_L inibem a liberação de fatores mitocondriais e Bax, Bak, BH-3, Bid, Bad e Bim promovem sua liberação.

Figura 6 - Vias de Apoptose



Esquema dos eventos apoptóticos. Adaptado de Elmore S. (33)

Já a via extrínseca é ativada através de receptores da superfamília TNF que é estimulada através da ligação de FasL, TNF-α, entre outros a seus respectivos receptores, que recrutam proteínas adaptadores do citoplasma, levando a ativação da caspase-8 após a formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC).

Por fim, a via da Granzima B é mediada pela célula T citotóxica, que forma um poro na membrana celular acarretando em liberação de componentes citoplasmáticos.(33)

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

Os objetivos do estudo são:

1. Observar a presença de meningococos em tecido renal em modelo experimental de meningococcemia;
2. Avaliar a presença de inflamação no tecido renal, com células e marcadores inflamatórios em modelo experimental de meningococcemia;
3. Avaliar a apoptose e necrose tubular em tecido renal em modelo experimental de meningococcemia.

3 METODOLOGIA

3.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 109/14 e pelo Comitê de Ética do Public Health England, Porton Down sob o número PPL 30/2906.

3.2 Estudo Experimental

Um total de 30 camundongos fêmeas BALB/C foram selecionados para estudo. Destes, 20 foram infectados com meningococo sorogrupo B (cepa STNZ98/254), sendo 10 com dose elevada e 10 com dose baixa, e transferrina e 10 animais foram selecionados para o grupo controle, recebendo apenas solução salina e transferrina. O modelo utilizado, assim como o cálculo do inóculo, seguiu protocolo local(16,34).

Uma quantidade pré-determinada do inóculo da bactéria foi injetado intraperitonealmente nos camundongos, sendo:

- Grupo *SHAM*: Soro fisiológico 0,9% + Transferrina, denominados de C1 a C10

- Grupo Baixa Dose (LD): 1.10^7 Men B + Transferrina, denominados de L1 a L10

- Grupo Alta Dose (HD): 5.10^7 Men B + Transferrina, denominados de H1 a H10

Os animais foram dispostos em gaiolas, 5 em cada, sendo todos do mesmo grupo. A cada 4h, os animais eram avaliados quanto à clínica conforme protocolo local, que segue:

5: saudável

4: *ruffled fur (animal com pelos eriçados)*

3: olhos fechados

2: *ruffled fur* e olhos fechados

1: imóvel

0: morto na gaiola

Após a eutanásia dos animais, cerca de 22h após o início do experimento, foram extraídos os seguintes órgãos: baço, fígado, pulmões e coração, que foram armazenados em meio de cultura (meio RPMI Sigma Aldrich) e congelados a -80ºC, e os rins, sendo que um foi utilizado para a análise dos marcadores de apoptose por citometria de fluxo e metade do outro foi utilizado para análise histológica. A segunda metade foi também armazenada em meio RPMI e mantida em -80ºC. Ainda, foram extraídos urina, quando possível, e soro dos animais. A manipulação dos animais ocorreu em cabine de segurança nível 3.

3.3 Citometria de Fluxo

Os rins do mesmo grupo foram colocados num C-tube (Macs, Alemanha) com 5 a 10ml de meio RPMI para maceração no aparelho GentleMACS Dissociator (Macs, Alemanha). Inicialmente no programa lung_01 e após no programa spleen_01. Se a maceração ainda não estivesse adequada, o programa spleen_01 era repetido.

A suspensão foi separada através de um filtro 70 µm e centrifugado a 400 g por 5 min a 20ºC. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 5 ml de solução de lise para células vermelhas e deixado por 5 min. Após, foi adicionado 15 ml de meio RPMI para parar a reação e foi novamente centrifugado a 400 g por 5 min a 20ºC.

O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 5ml de meio RPMI. Dez microlitros da suspensão foram adicionados a 10 µl de *Trypan Blue* para contagem das células.

A suspensão foi novamente centrifugada a 400 g por 5 min e 20°C e o sobrenadante descartado. As células ressuspensas em 600 µl de PBS, com exceção do Grupo SHAM que foi ressuspendido em 900ml de PBS.

Após, 100 µl da suspensão foram colocados nos poços e centrifugados a 400 g por 5 min e 20°C. O sobrenadante foi descartado e as células fixadas em 100 µl de metanol 80% por 5 min. Após, foram centrifugadas a 400 g por 5 min a 20°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µl de PBS.

Novamente a placa foi centrifugada a 400 g por 5 min a 20°C e o sobrenadante descartado. Após, 100 µl de PBS-T foram adicionados a cada poço para permeabilização da membrana e incubadas por 20 min em temperatura ambiente. Realizada nova centrifugação a 400 g por 5 min a 20°C.

Os anticorpos utilizados para realização do experimento em citometria de fluxo haviam sido testados em células de rim de camundongos e HL-60 para padronização da técnica. Assim, utilizou-se p53 (Abcam, Reino Unido), caspase 3 (Abcam, Reino Unido), citocromo-c (Abcam, Reino Unido), Bax (Abcam, Reino Unido) e caspase 9 (Abcam, Reino Unido) para avaliação de apoptose em tecido renal.

O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 100 µl da solução de anticorpo. As células foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente e a placa coberta com papel alumínio. As células foram lavadas com PBS-T, centrifugadas e o sobrenadante descartado.

O anticorpo secundário utilizado foi: para a suspensão com o anticorpo primário com p53, caspase 3 e citocromo c foi utilizado DyLight (BioLegend, Estados Unidos) e para os poços com suspensão com Bax e caspase 9 foi utilizado Anti-Rabbit (Abcam, Reino Unido). Os controles negativos foram ressuspendidos com PBS-T. Novamente a placa foi coberta com papel alumínio e mantida em temperatura ambiente por 30 min.

As células foram lavadas e centrifugadas e o sobrenadante centrifugado. Após, as amostras foram diluídas para análise no citômetro de fluxo (Beckman Coulter, Estados Unidos) e o software utilizado foi o Summit 4.3 (Beckman Coulter, Estados Unidos).

3.4 Detecção de citocinas inflamatórias pela técnica de Luminex®

Foi utilizado o kit *Mouse Cytokine Magnetic 10-Plex Panel* (Invitrogen, Estados Unidos) para detecção de GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-α em soro de camundongo. As amostras de soro utilizadas foram as coletadas após o sacrifício dos animais e foi realizado um *pool* das amostras do mesmo grupo. O sangue foi centrifugado e o soro armazenado a -80ºC até sua utilização.

Para o preparo dos *Beads*, 60 µL de anticorpos foram diluídos em 600 µL de solução de lavagem e 25 µL desta solução colocados nos poços da placa que acompanha o

kit. O anticorpo foi agitado por um minuto e realizado sonicação em banho-maria por 30 s. Após, 200 µL de solução de lavagem foram adicionados aos poços, o excesso foi retirado e a lavagem repetida com 250 µL de solução de lavagem. Por fim, 50 µL de solução de incubação foram adicionados a cada poço.

Para o preparo das soluções da curva padrão, utilizou-se o pó liofilizado em 1 mL de diluente próprio e, após 10 min de descanso da solução a temperatura ambiente, 100 µL das soluções da curva padrão foram adicionadas aos poços acrescidos de 50 µL de soro. A placa foi colocada para incubar por 2h a 650 rpm e 25ºC.

Para o preparo do anticorpo biotinilado, 240 µL do anticorpo foram diluídos em 2,4 mL de diluente próprio. Após o término da incubação, o excedente foi desprezado e 200 µL da solução de lavagem foi adicionado a cada poço. O processo foi repetido mais uma vez. Após retirar o excedente da solução de lavagem, 100 µL do anticorpo biotinilado foram adicionados a cada poço e a placa foi selada e agitada a 25ºC, 650 rpm por 1h.

Realizado então o preparo da Streptavidina-RPE, procedeu-se à diluição de 250 µL em 2,5 mL em diluente próprio e o tubo envolto em papel laminado até o uso. Após o período de incubação, 200 µL da solução de lavagem foram adicionados a cada poço e após 30 s na placa magnetizada. O excesso foi retirado e o processo repetido. Após, 100 µL de Streptovidina-RPE foram adicionados a cada poço e a placa selada e incubada em agitador por 30 min em temperatura ambiente. Novamente o excesso foi desprezado e 200 µL da solução de lavagem foram colocados a cada poço. Após 30 s na placa magnética, o excesso foi desprezado e o processo repetido mais duas vezes. Por fim, 125 µL da solução de lavagem foram adicionados a cada poço e agitado por 3 min. A placa foi envolta em papel laminado e a análise realizada.

3.5 Histologia

Metade dos rins dos animais foram enviados ao setor de Histologia em formalina 10% e fixados em parafina. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE). A análise das lâminas foi realizada por um patologista, responsável também pela confecção do relatório. Um segundo patologista fez a revisão das lâminas e do relatório.

3.6 Bioquímica Urinária

Amostras de urina foram coletadas no momento da eutanásia e armazenadas em freezer -80°C. Para análise, fez-se um *pool* de amostras dos animais do mesmo grupo. A análise da creatinina foi realizada pelo método colorimétrico utilizando ácido pícrico. A quantificação do sódio e potássio foi realizada por fotometria de chama (Instrumentation Laboratory, modelo 143, Lexington, MA, EUA).

3.7 Expressão de proteínas em tecido renal pela técnica de *Western blotting* (WB)

Os tecidos congelados dos animais foram homogeneizados em uma solução de K-Hepes contendo inibidores de proteases no aparelho Politron PT 10-35 (Kinematica, Suiça). Todo o procedimento foi feito em gelo. O homogenato foi então centrifugado (2000 g) por 15 min a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. A medida da concentração da proteína foi feita pelo método de Bradford(35).

O teste de WB foi realizado correndo as amostras em minigéis de poliacrilamida com concentração ajustada de acordo com o tamanho da proteína, variando de 8% a 12%. Após transferir por eletroeluição para membranas Hybond P 0.45 PVDF (GE, EUA), os blots foram bloqueados com leite a 5% e Tween 20 0,1% em TBST por 1h. Em seguida, os blots foram incubados com os seguintes anticorpos: TLR-2 (R&D Systems) na concentração 1:500, TLR-4 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) 1:500 em temperatura ambiente, no agitador, *overnight*. Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas durante uma hora com anticorpo secundário, sendo anti-mouse (Abcam) para TLR-4 na concentração 1:4000 e anti-goat (Sigma) para o TLR-2 na concentração 1:10000, em temperatura ambiente no agitador. As bandas foram visualizadas através do sistema de detecção de quimioluminescência Alliance (Uvitec, United Kingdom) e, posteriormente, realizado quantificação por análise densitométrica usando o programa Scion Image Software (Scion Corporation, EUA). Como proteína de referência para o cálculo da densitometria, utilizou-se β-actina. A membranas previamente utilizadas para análise de TLR-2 e TLR-4 foram imersas em solução de *strip* (Tris-HCl, SDS 20% e 2β-mercaptoetanol) a 60°C e lavadas em TBS por três vezes. Após, foram incubadas com

β-actina (Santa Cruz Biotechnology) na concentração 1:2000 *overnight.* Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas durante uma hora com anticorpo secundário anti-mouse (Abcam) 1:4000. Para visualização das bandas foi utilizado o mesmo método descrito acima.

3.8 Avaliação de apoptose no tecido renal pela técnica de Tunel (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

As lâminas parafinadas de tecido renal foram submetidas a desparafinização e hidratação através de submersão sucessiva em xilol, álcool e TBS. As etapas seguintes foram realizadas utilizando o kit de detecção de fragmentos de DNA (Merck Millipore, Alemanha).

Primeiro foi realizada a permeabilização utilizando Proteinase K 2 mg/mL em Tris 10 nM, pH 8 (1:100). Após período de incubação e lavagem em TBS foi realizado a inativação da peroxidase endógena utilizando 15 ml de H_2O_2 e 135 ml de Metanol.

Para a reação de equilíbrio e marcação foi utilizado 5x *TdT Equilibration Buffer* diluído em água destilada. Na sequência, misturou-se a solução *TdT Labeling Reaction Mixture* com *TdT Enzyme* e o material foi incubado em câmara úmida por 90 min.

Para o término da reação de marcação utilizou-se o *Stop Buffer*, sendo então incubadas em temperatura ambiente e para a detecção utilizou-se a solução *Blocking Buffer*. Então, diluiu-se o *Conjugate* em *Blocking Buffer* e incubado em temperatura ambiente. Para a coloração foi utilizado DAB e para contra-coloração *Methyl Green.*

3.9 Detecção de proteína tecidual pela técnica de imuno-histoquímica

A reação de imuno-histoquímica iniciou com a desparafinização das lâminas, mantendo-as em estufa a 60ºC por 30 min. Depois, realizado sequência de banhos em xilol, álcool e água potável.

Para a exposição dos epítopos, as lâminas foram colocadas em micro-ondas Electrolux na potência de 2400 W e imersas em tampão citrato pH 6,0. As lâminas

foram mantidas no micro-ondas por 15 min em potência 10, repondo a solução tampão se necessário. Após, as lâminas foram resfriadas em água corrente.

Para o bloqueio da peroxidase endógena realizou-se bloqueio utilizando kit comercial (Spring, EUA) e incubou-se por 30 min em câmara úmida e escura. Realizado enxágue das lâminas com água e lavadas em tampão TBS em agitador por 5min.

O bloqueio de marcação inespecífica foi então realizado utilizando sistema de amplificação de sinal (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring, EUA). Os cortes foram então incubados com anticorpo primário anti-mieloperoxidase - MPO (Abcam, Reino Unido) para marcação de neutrófilos diluído em BSA 1% em TBS, na proporção de 1:50. Para a avaliação de linfócitos utilizou-se o anticorpo primário anti-CD3 (Abcam, Reino Unido) na concentração 1:200. Os cortes ficaram em câmara úmida a 4ºC *overnight*. No dia seguinte, os cortes foram incubados com polímero Rabbit+HRP (Spring, EUA) durante 30 min em câmara úmida em temperatura ambiente. Realizado lavagem das lâminas em TBS por 5 min em agitador.

Para a revelação foi utilizado o kit comercial de DAB líquido (Spring, EUA).

3.10 Detecção de proteína tecidual pela técnica de imunofluorescência

Para a desparafinização, os fragmentos submetidos à imunofluorência foram aquecidos a 60°C, seguido de banho de xilol quente (60°C) por 1 hora e sucessivas lavagens em álcool.

Após, os tecidos foram imersos em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) e levados ao forno micro-ondas Eletrolux, com potência de 2400 W durante 15 min. As lâminas permaneceram no tampão até atingir a temperatura ambiente. Os fragmentos foram então hidratados em tampão PBS pH 7,4.

Os tecidos foram submetidos ao bloqueio dos antígenos inespecíficos por 30 min em temperatura ambiente, utilizando para isto albumina bovina V 6% (Merck CAS 90604-29-8) diluída em PBS tween. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário monoclonal anti-α-actina (Sigma), diluído 1:800 em PBS pH 7,4, *overnight*, a 4°C, em câmara úmida e escura. Controles negativos, omitindo-se a incubação com o anticorpo primário, foram realizados.

No dia seguinte as lâminas foram lavadas com PBS por 5 min (3 vezes) e incubada com Alexa Fluor 546 anti-mouse (Life Thecnology) por 30 min em temperatura ambiente em câmara úmida e escura.

Após esse período novamente as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes e incubadas com o anticorpo policlonal anti-*Neisseria meningitidis* conjugado com FITC (Abcam, Reino Unido) diluído 1:50 por 30 min em câmara úmida e escura e temperatura ambiente.

Novamente os fragmentos foram lavados 3 vezes com PBS por 5 min cada e montados com *Prolong Diamont with dapi* (Life Thecnology).

As lâminas foram analisadas no microscópio óptico com campo escuro (Nikon-Eclipse 80i) sob aumento de 400x, nos filtros de 488 nm (verde), 505 nm (azul) e 546 nm (laranja).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

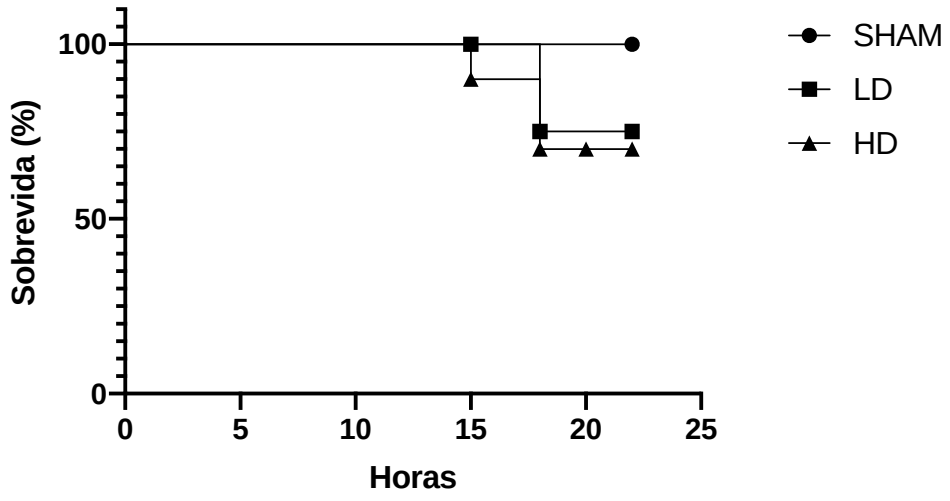
Os dados estão expressos em média ± erro padrão. Diferenças entre as médias dos múltiplos parâmetros foram analisadas pelo método One-Way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.2.0 (GraphPad Software, Inc., EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Sobrevida

Parte dos animais precisaram ser eutanasiados antes do término do experimento por estarem imóveis na gaiola, sendo um do grupo HD após 15h do início e dois do grupo LD mais dois do grupo HD com 18h. Após 20h do início do experimento, o animal H5 morreu na gaiola. Assim, optou-se por encerrar o experimento após 22h do início, pois os animais estavam bastante letárgicos. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos.

Gráfico 1 - Curva de sobrevida dos animais durante a fase experimental

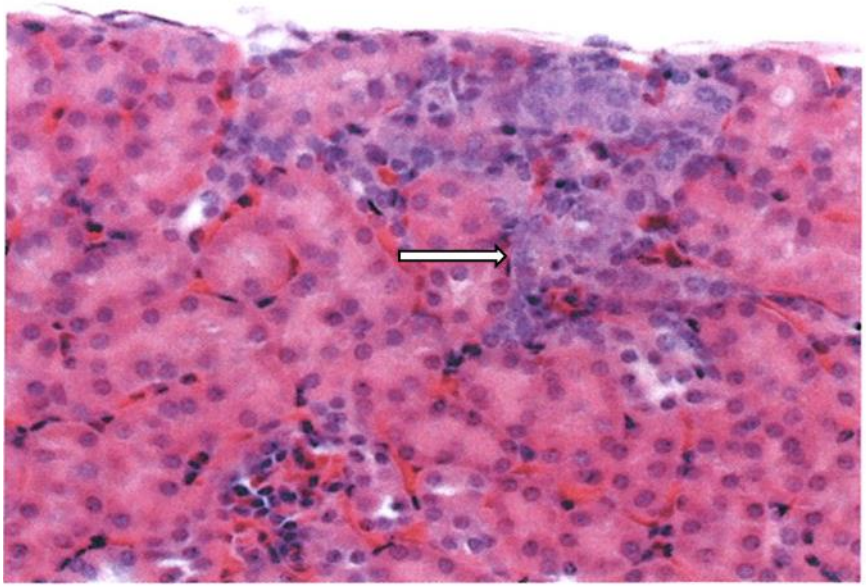


Dois animais do Grupo HD e um do Grupo LD não apresentaram sinais de doença e por isso foram excluídos das análises.

4.2 Análise Histológica do Tecido

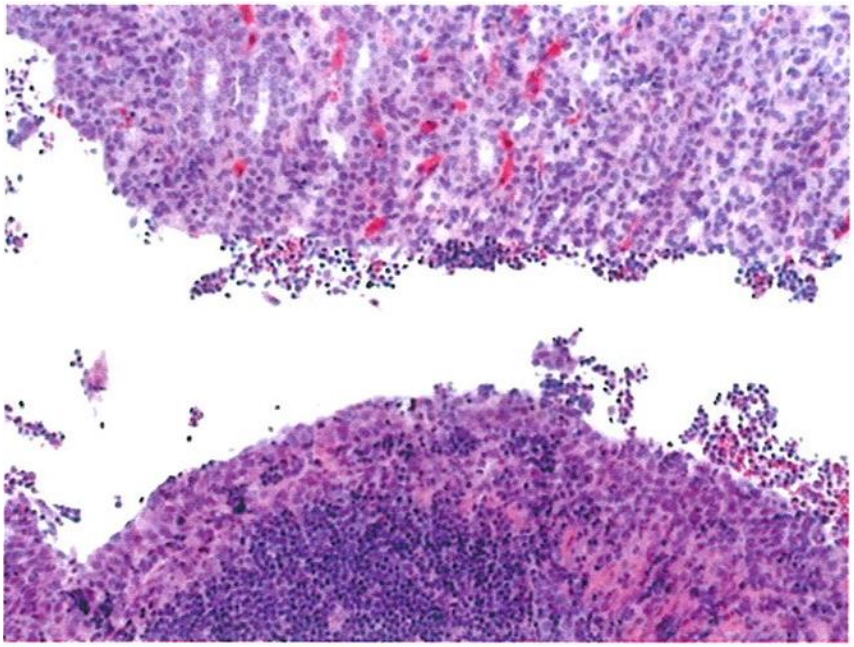
Não houve alterações significativas nos animais controle, com exceção de pequenos focos de túbulos basofílicos nos animais C1 e C10 e a evidência de uma pielonefrite aguda no animal C6.

Figura 7- Análise histológica de rim de animal do Grupo SHAM



Presença de túbulos basofílicos subcapsulares (seta) em animal controle (C1) - Córtex renal, coloração HE (aumento de 40x)

Figura 8 - Análise histológica de rim de animal do Grupo SHAM



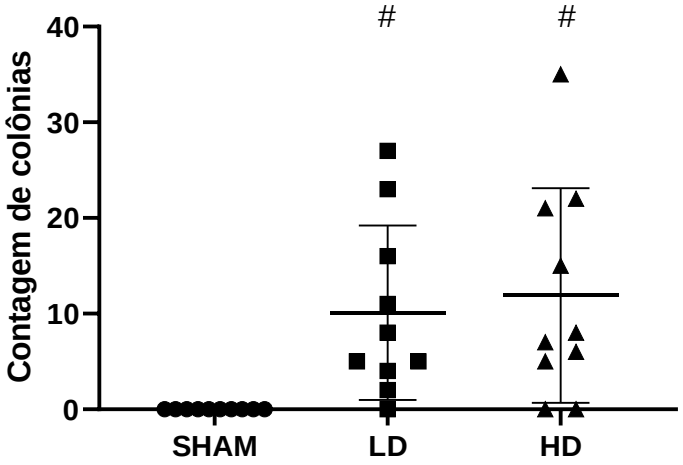
Presença de infiltrado leucocitário indicando uma pielonefrite aguda em animal controle (C6) - Pelve renal, coloração HE (aumento de 10x)

Com relação aos animais dos grupos alta e baixa dose, os achados encontrados foram semelhantes em ambos os grupos. Micro-colônias bacterianas foram encontradas e a distribuição está representada no gráfico 2. A localização foi predominantemente

cortical, porém também estava presente na medula renal. Os agregados estavam mais concentrados no espaço intersticial, porém também foi encontrado dentro de células tubulares e, não tão evidentemente, dentro do túbulo renal. No geral, na avaliação pelo HE, não houve evidência de infiltrado inflamatório significativo nem de degeneração celular, com exceção do animal H8.

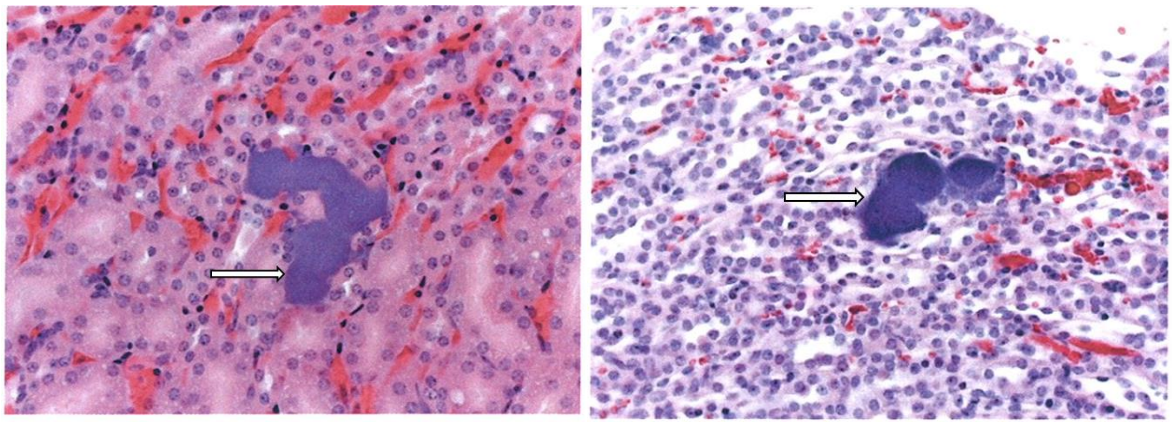
No gráfico 2 está representada a distribuição de colônias nas lâminas avaliadas. Não houve diferença estatisticamente significantes entre os grupos LD e HD (p = 0,8102). Não foram encontradas micro-colônias no Grupo SHAM, já no Grupo LD a média de micro-colônias encontradas foi de 10,10 ± 9,12 por seção, enquanto no Grupo HD a média foi de 11,90 ± 11,22 por seção.

Gráfico 2 - Distribuição de micro-colônias no tecido renal



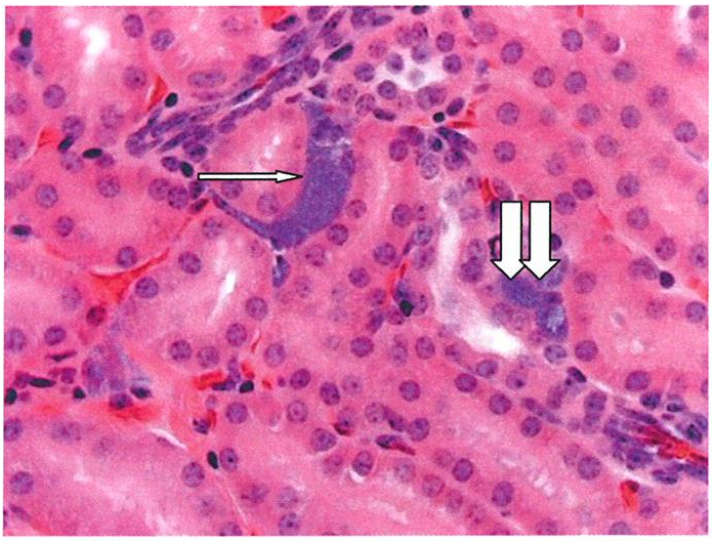
# p<0,01 vs. SHAM

Figura 9 - Análise histológica de rim de animais dos grupos infectados



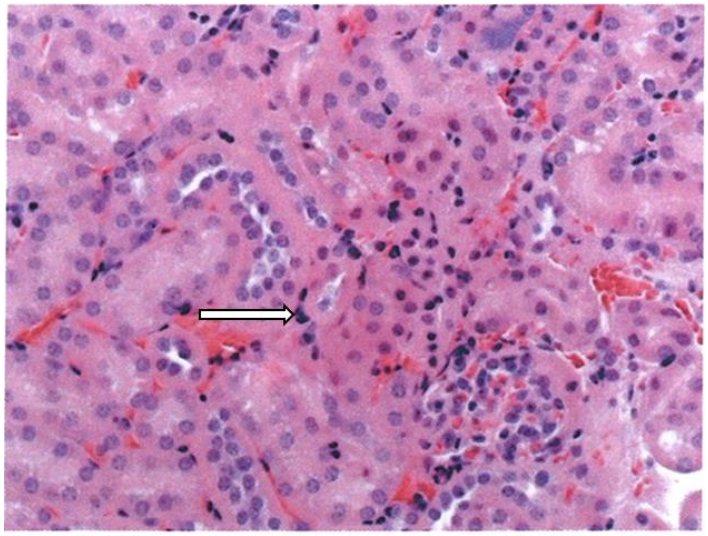
Presença de micro-colônia (seta) no interstício do córtex renal - coloração HE (aumento 400x)

Figura 10 - Análise histológica de rim de animal do grupo infectado



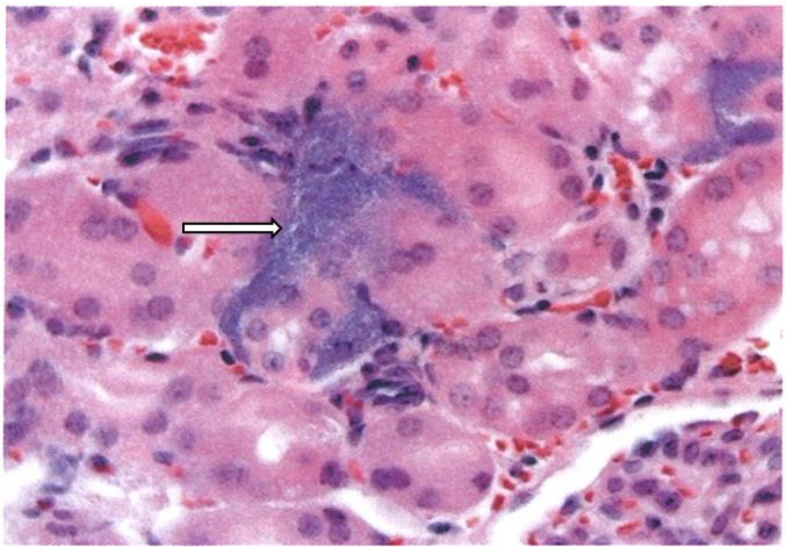
Presença de micro-colônias no interstício (seta) e intracelular (seta dupla) no córtex renal de animal do Grupo LD - coloração HE (aumento 1000x)

Figura 11 - Análise histológica de rim de animal do grupo infectado



Presença de foco de degeneração celular (seta) em córtex renal de animal do Grupo LD - coloração HE (aumento 40x)

Figura 12 - Análise histológica de rim de animal do grupo infectado

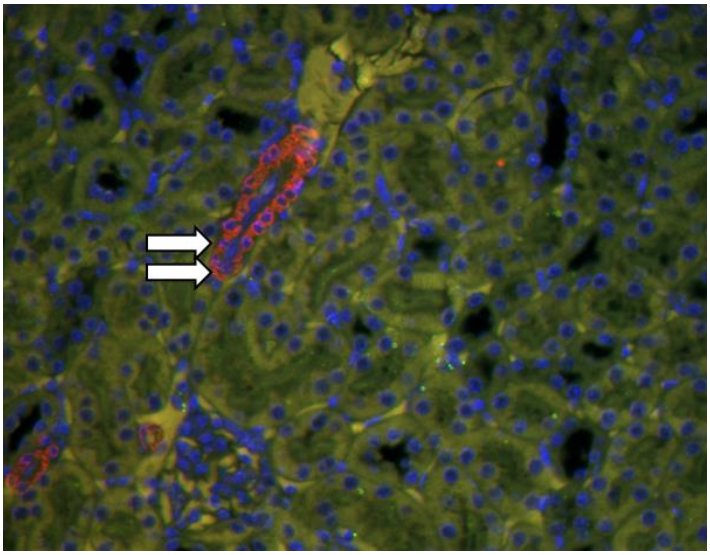


Presença de micro-colônia (seta) em córtex renal de animal do Grupo HD. A colônia parece invadir células do túbulo convoluto proximal adjacente - coloração HE (aumento 1000x)

4.3 Pesquisa de Antígeno no tecido renal

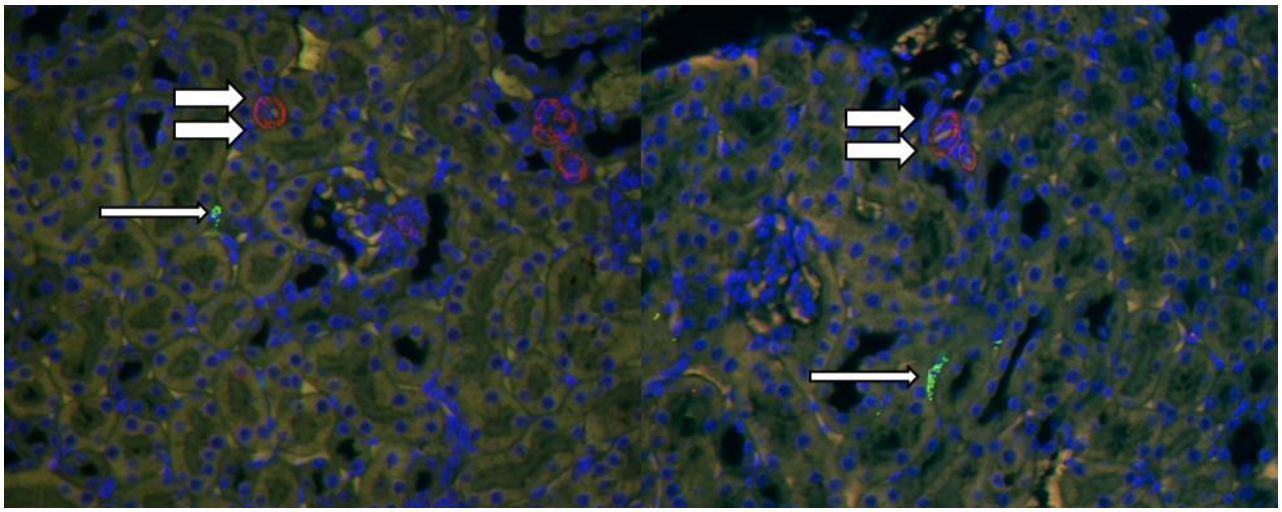
A imunofluorescência comprovou a existência de meningococo em parênquima renal. A dupla marcação com α-actina evidenciou que a bactéria presente encontra-se no interstício.

Figura 13 - Avaliação por imunofluorescência da presença de meningococo - Grupo SHAM



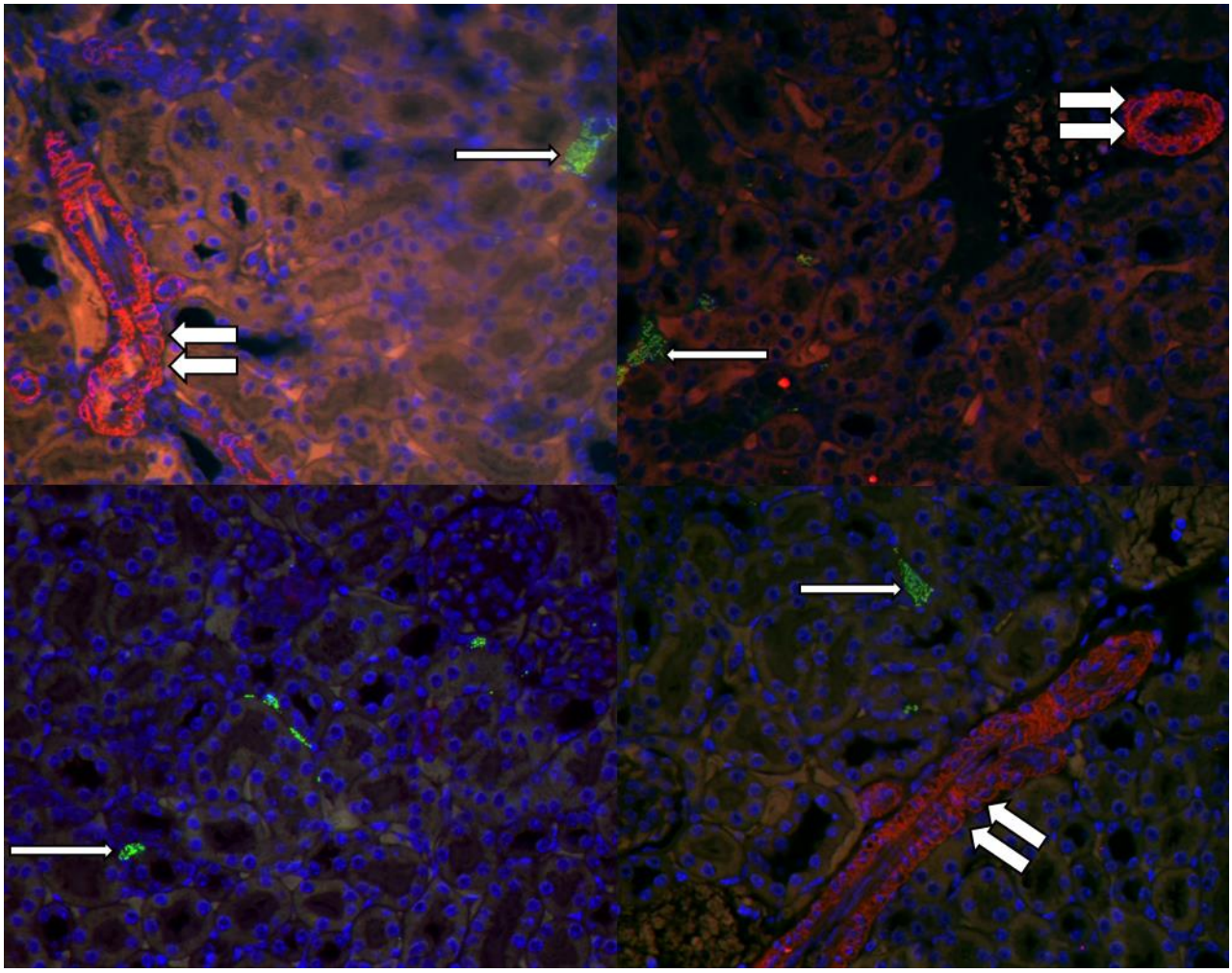
Imunofluorescência evidenciando a marcação para actina em vermelho (seta dupla) no Grupo SHAM (aumento de 400x)

Figura 14 - Avaliação por imunofluorescência da presença de meningococo - Grupos infectados



Imunofluorescência evidenciando a dupla marcação para actina em vermelho (seta dupla) e para meningococo em verde (seta) no córtex renal do Grupo LD (aumento de 400x)

Figura 15 - -Avaliação por imunofluorescência da presença de meningococo - Grupos infectados

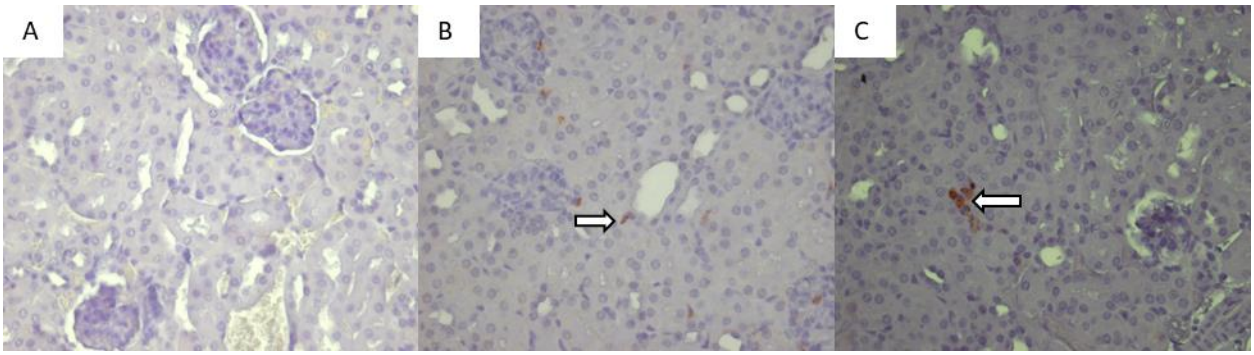


Imunofluorescência evidenciando a dupla marcação para actina em vermelho (seta dupla) e para meningococo em verde (seta) no córtex renal do Grupo HD (aumento de 400x)

4.4 Avaliação de Infiltrado Leucocitário

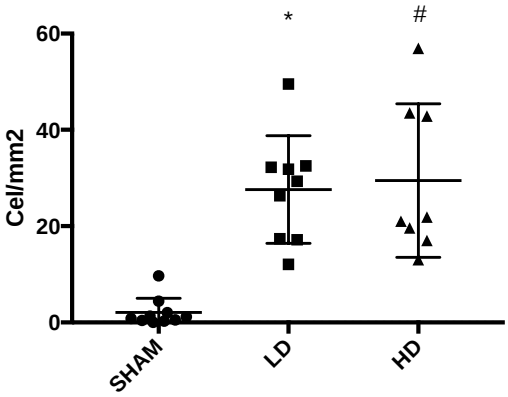
A avaliação da presença de neutrófilos através da marcação anti-MPO em parênquima renal evidenciou maior concentração das células nos animais infectados quando comparados ao grupo controle ($p<0,001$ LD vs. SHAM, e $p<0,01$ HD vs. SHAM). A distribuição dos neutrófilos foi predominantemente cortical e intersticial, porém também se visualizou a presença destas células intraglomerulares. A média de neutrófilos encontrados foi de 2,06 ± 2,98 no Grupo SHAM vs. 27,59 ± 11,18 no Grupo LD vs. 29,48 ± 15,96 no Grupo HD conforme demonstrado no gráfico 3.

Figura 16 - Avaliação do infiltrado leucocitário (IHC) - marcação de neutrófilos



Presença de neutrófilos no parênquima renal. A) Animal do Grupo SHAM; B) Marcação anti-MPO (Seta) em animal do Grupo HD; C) Marcação anti-MPO (Seta) em animal do Grupo LD.

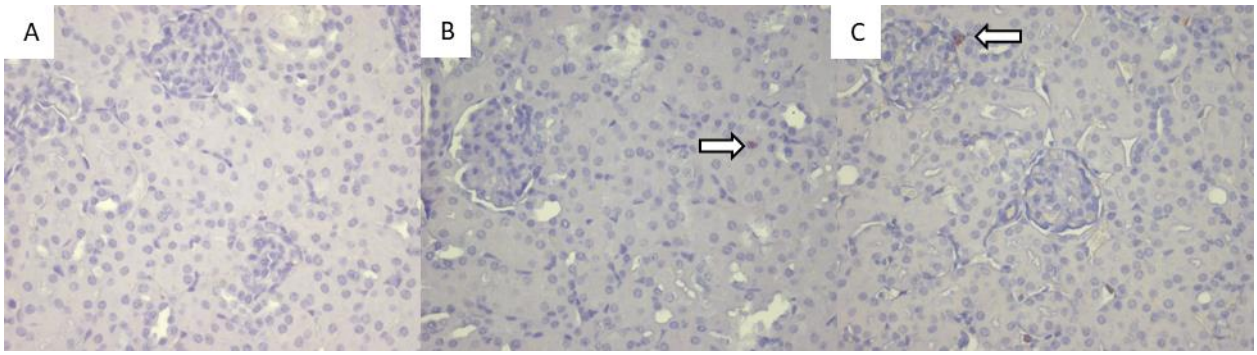
Gráfico 3 - Contagem de células marcadas para MPO



* p<0,001 vs. SHAM
# p<0,01 vs. SHAM

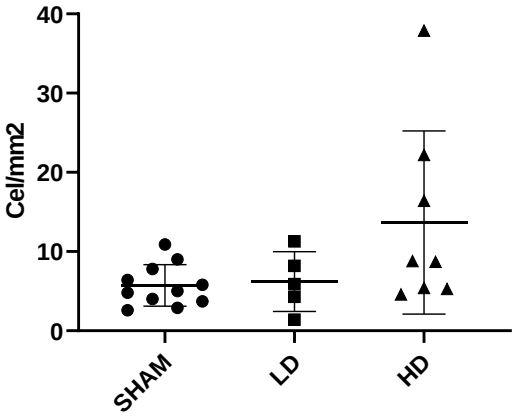
Com relação à presença de linfócitos em parênquima renal, evidenciou-se uma tendência a maior concentração das células marcadas anti-CD3 nos animais infectados quando comparados ao grupo controle, porém não houve significância estatística. A distribuição dos linfócitos foi predominantemente cortical e intersticial, porém também se visualizou a presença destas células intraglomerulares. A média de linfócitos encontrados foi de 5,72 ± 2,62 no Grupo SHAM vs. 6,22 ± 3,77 no Grupo LD vs. 13,66 ± 11,57 no Grupo HD conforme demonstrado no gráfico 4.

Figura 17 - Avaliação do infiltrado linfocitário (IHC)



Presença de linfócitos no parênquima renal. A) Animal do Grupo SHAM; B) Marcação anti-CD3 (seta) em animal do Grupo HD; C) Marcação anti-CD3 (seta) intraglomerular em animal do Grupo LD.

Gráfico 4 - Contagem de células marcadas para CD3

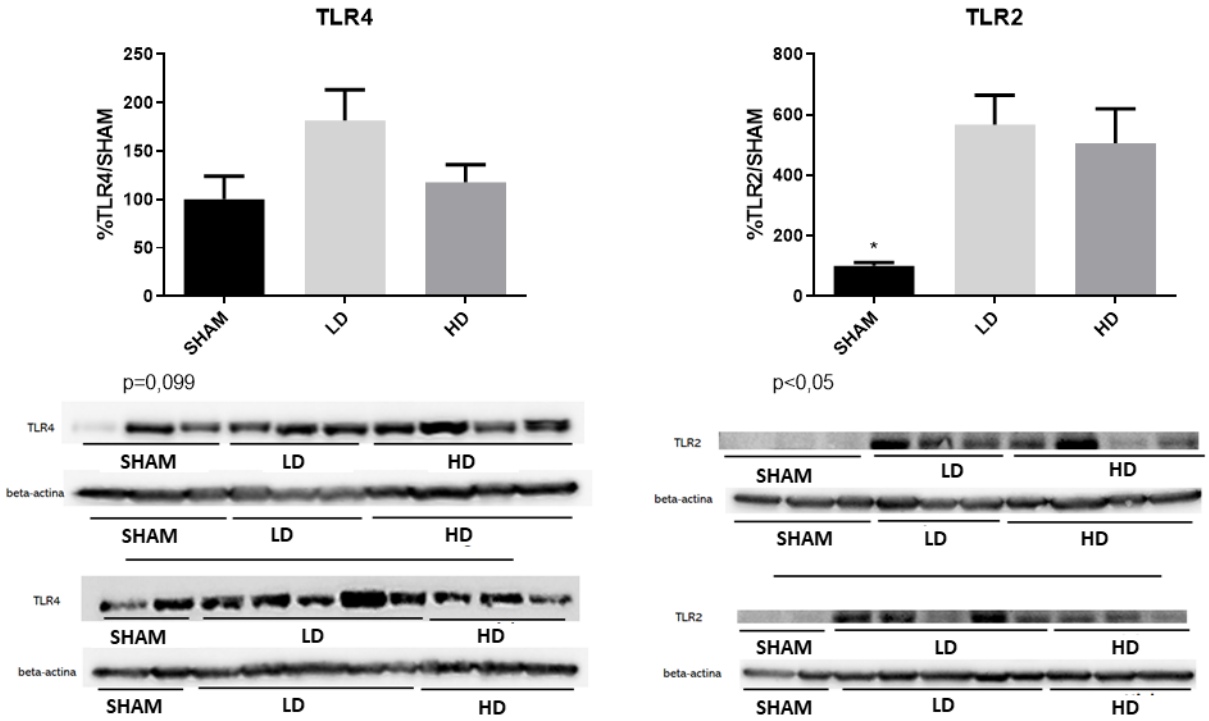


p>0,05

4.5 Expressão de TLR-2 e TLR-4

A análise da expressão de TLR-2 evidenciou aumento estatisticamente significante nos grupos inoculados quando comparados ao SHAM. Já em relação à expressão de TLR-4 houve tendência ao aumento da expressão nos grupos inoculados em relação ao SHAM, porém sem diferença estatisticamente significante.

Figura 18 - Expressão de TLR-2 e TLR-4 em células do tecido renal



4.6 Análise de Citocinas Séricas

Os gráficos abaixo apresentam os dados da medida de citocinas séricas pelo Luminex®. Os grupos inoculados apresentaram maior quantidade de citocinas séricas do que o grupo SHAM tanto citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias. Como a análise aconteceu do *pool* feito com o soro dos animais, não foi realizado análise estatística dos dados.

Gráfico 5 - Citocinas pró-inflamatórias

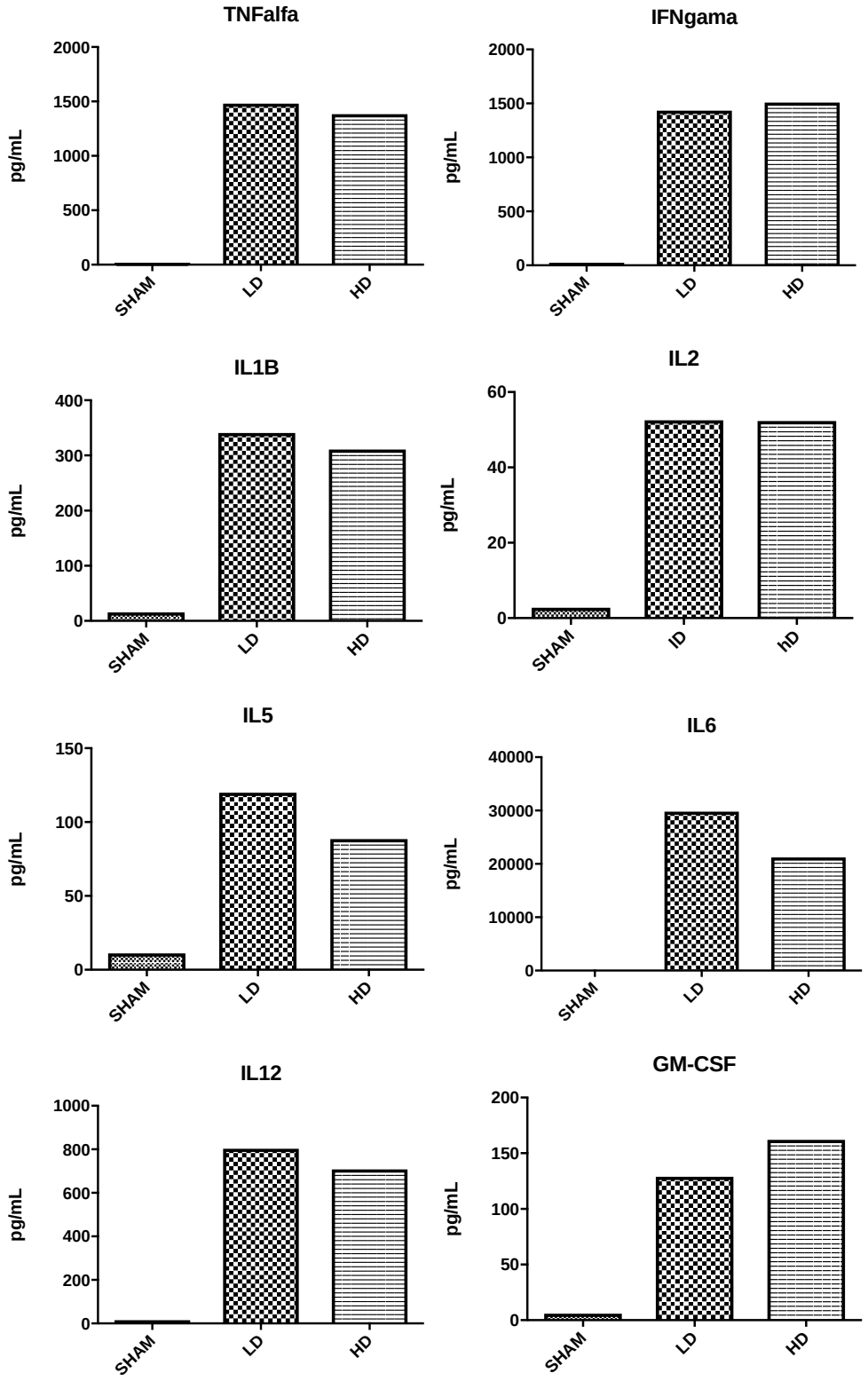
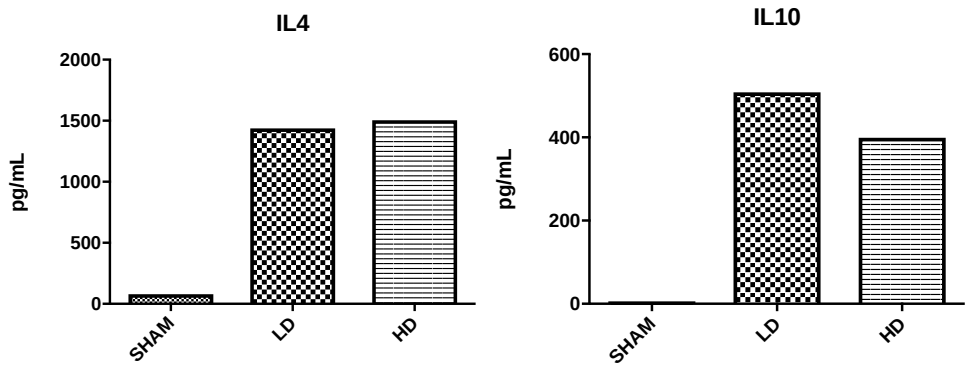


Gráfico 6 - Citocinas anti-inflamatórias



4.7 Avaliação de Marcadores de Apoptose em Tecido Renal

4.7.1 Citometria de Fluxo

Para os marcadores utilizados na avaliação de apoptose (p53, BAX, citocromo c, caspase 9 e caspase 3) observou-se, predominantemente, maior quantidade de células marcadas nos grupos LD e HD do que no grupo SHAM. Quando comparado os grupos que tiveram meningococo inoculado intraperitonealmente, a contagem de células marcadas foi maior no grupo que recebeu o maior inóculo.

Figura 19 – Definição dos *gates* dos Grupos LD e HD, respectivamente

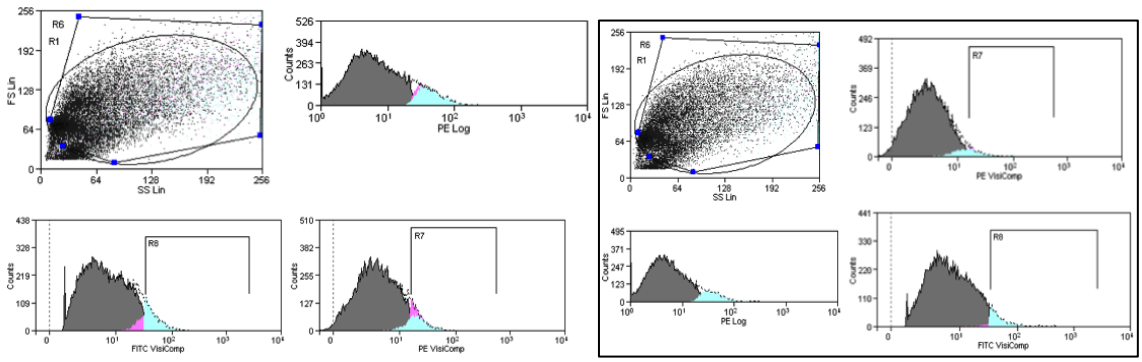
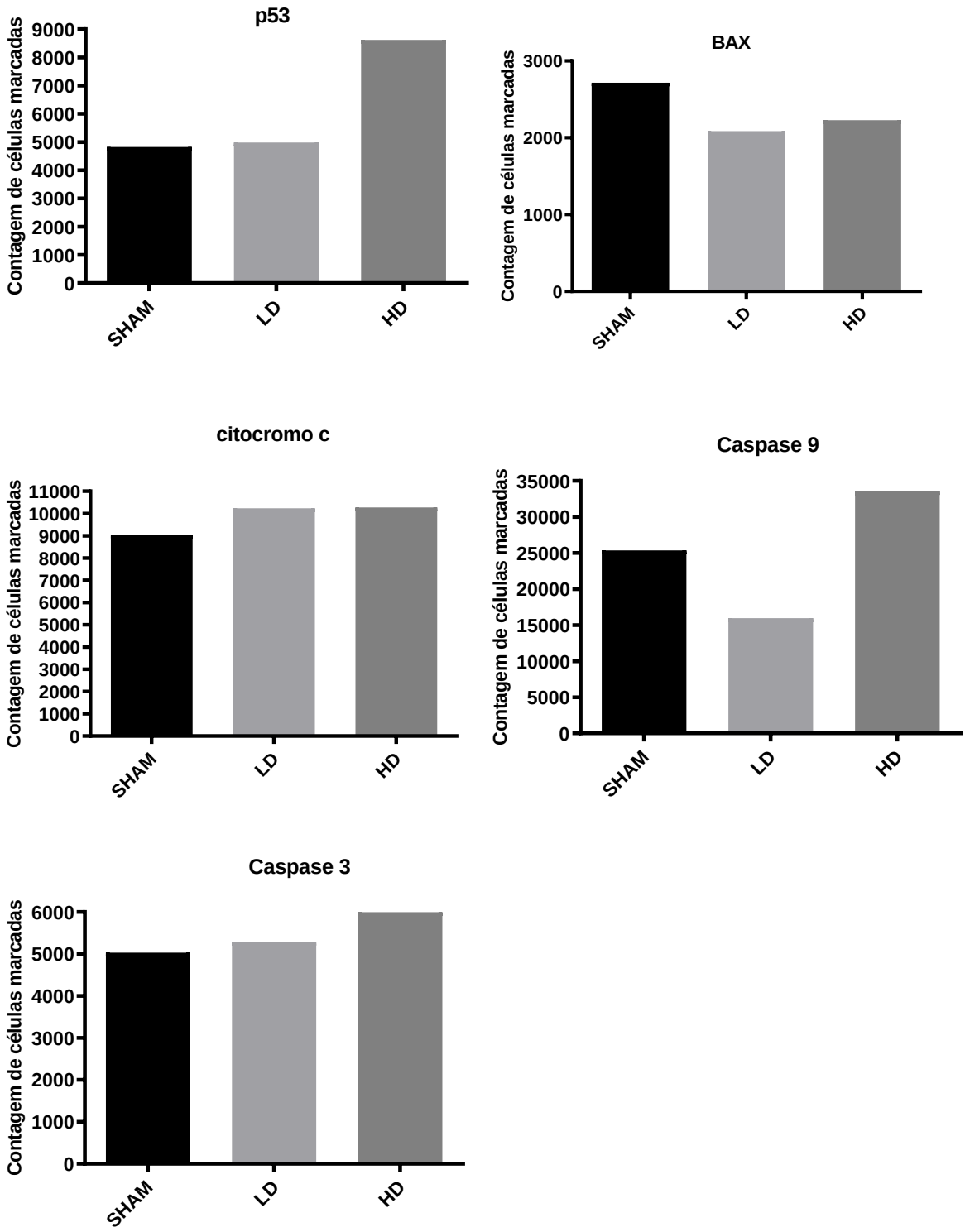


Gráfico 7 - Avaliação dos marcadores de apoptose da via intrínseca por citometria de fluxo



4.7.2 TUNEL

A análise por TUNEL evidenciou presença de fragmentos de DNA em maior quantidade no grupo HD. A média de células/campo no grupo SHAM foi de 2,656 e no grupo LD de 3,72, sendo que não houve diferença significante ($p>0,05$). Quando comparado os grupos SHAM e LD com o grupo HD, a diferença foi significativa (2,656 vs. 11,72, $p<0,01$ e 3,72 vs. 11,72, $p<0,01$).

Figura 20 - Avaliação de fragmentação do DNA pelo método de TUNEL – Grupo SHAM

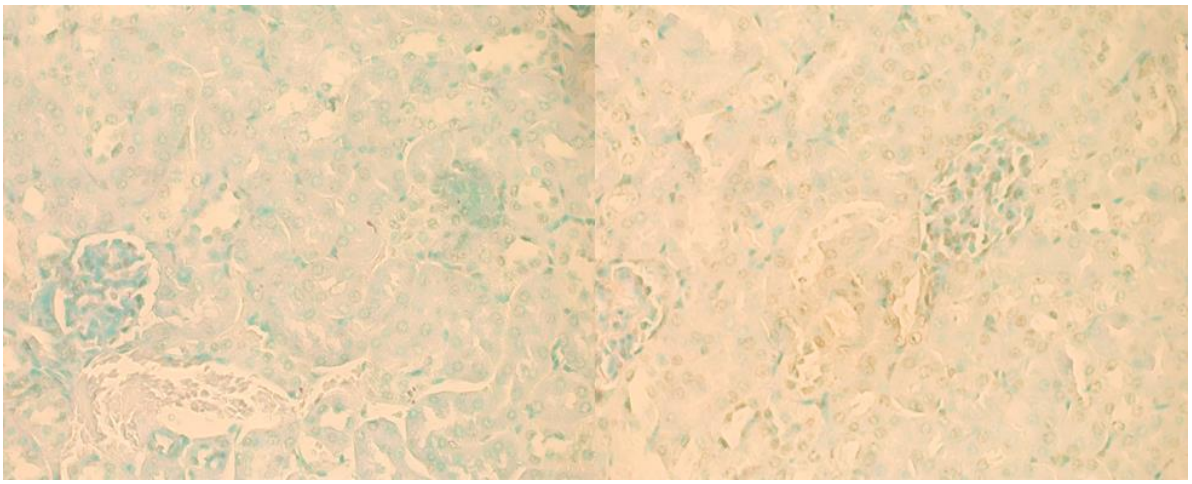
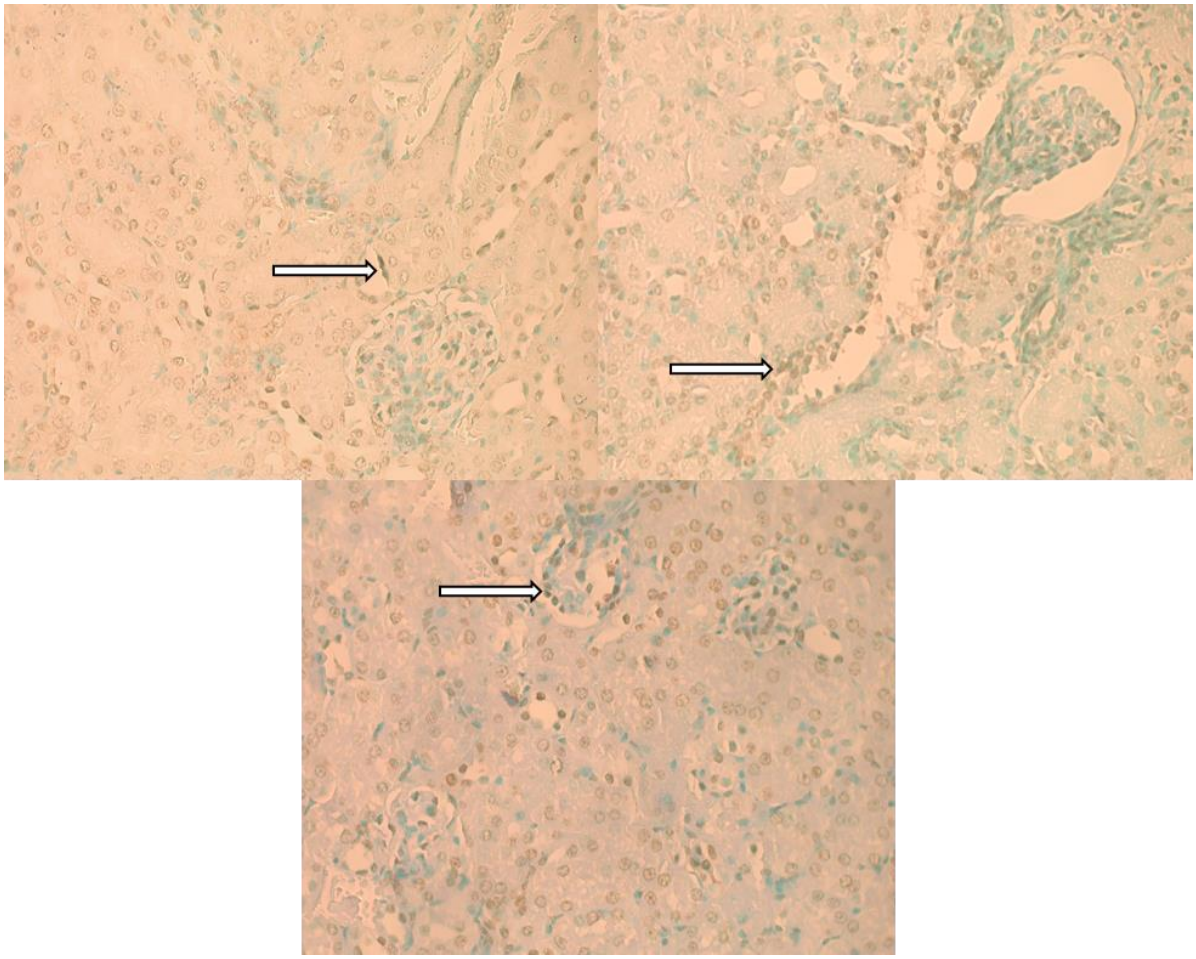


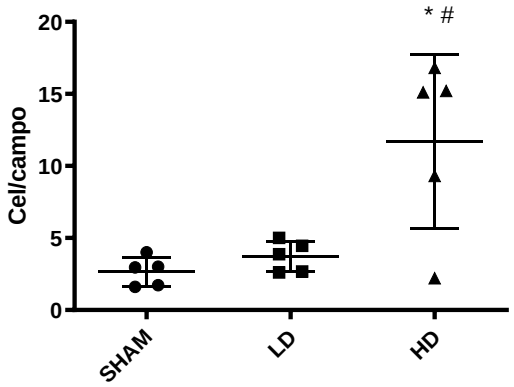
Figura 21 - Avaliação de fragmentação do DNA pelo método de TUNEL - grupos infectados



Análise pela técnica de TUNEL nos grupos infectados evidenciando a presença de núcleos marcados (seta)

A média de células marcadas por campo foi de 2,66 ± 1,00 no Grupo SHAM vs. 3,72 ± 1,07 no Grupo LD vs. 11,72 ± 6,04 no Grupo HD. Não houve diferença estatisticamente significante entre os Grupos SHAM e LD, mas entre os Grupo SHAM e HD houve ($p<0,01$).

Gráfico 8 - Contagem de células marcadas - método de TUNEL

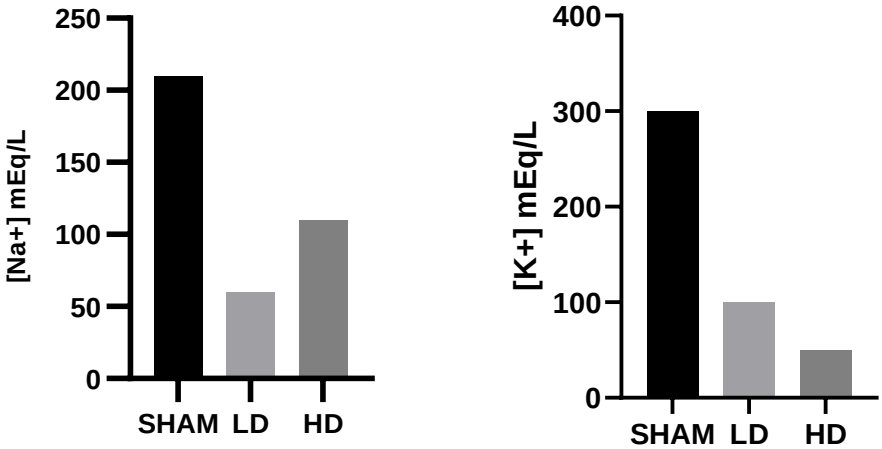


* p<0,01 vs. SHAM
\# p<0,01 vs. LD

4.8 Bioquímica Urinária

Na avaliação da bioquímica urinária, percebeu-se que os animais infectados apresentaram déficit de função com alteração tubular, visto que a concentração de sódio e potássio na urina foi menor nos animais infectados quando comparados ao Grupo SHAM.

Gráfico 9 - Concentrações de sódio e potássio urinários



5 DISCUSSÃO

O modelo murino se mostrou eficiente para a análise proposta, uma vez que os animais submetidos a diferentes inóculos apresentaram doença clinicamente constatada durante o período de observação. Ainda, esses animais apresentaram sobrevida menor em relação ao SHAM. Cabe ressaltar que, talvez por encerrarmos o experimento antes do previsto devido às condições clínicas dos animais, não encontramos diferença estatisticamente significantes entre os grupos. Acreditamos que a ausência de sinais de doença em dois animais do Grupo HD e um animal do Grupo LD ocorreu a fatores intrínsecos, visto que todos foram submetidos à mesma técnica para infecção e pelo mesmo operador. Diante do resultado, optou-se por excluir os animais das avaliações.

Nosso estudo conseguiu caracterizar a presença do meningococo em tecido renal. Outros estudos haviam encontrado material genético da bactéria no tecido através da análise por PCR (20,21), entretanto essa é a primeira vez, pelo nosso conhecimento, que a bactéria é caracterizada no interstício renal, tanto na porção cortical quanto medular. Ainda, pela análise em HE, é possível que as bactérias estejam presentes também dentro das células e túbulos. Por si só, esse achado explicaria a alteração da função tubular encontrada nos animais. Diante da alteração das concentrações de sódio e potássio encontradas pela bioquímica urinária, acreditamos que uma lesão tubular seja responsável pelos achados. Infelizmente não foi possível avaliar a função renal como um todo, uma vez que os animais não ficaram em gaiolas metabólicas durante o período do experimento e não havia soro suficiente para análises bioquímicas, como eletrólitos, creatinina e hormônios que pudessem auxiliar na avaliação da função renal. Outros grupos encontraram associação de doença meningocócica e alteração eletrolítica, seja sérica ou urinária (36,37), entretanto o mecanismo não foi elucidado. Ainda através da análise das lâminas coradas em HE, não evidenciamos necrose tubular aguda, reforçando que a alteração eletrolítica ocorre por disfunção tubular. Esse achado também ocorre em outros modelos experimentais de sepse, como no modelo de ligadura e punção cecal (CLP) (38). Neste modelo a infecção é polimicrobiana, causada pelas enterobactérias presentes no intestino do animal e é um modelo bastante utilizado para estudos que objetivam avaliar as consequências da sepse.

Após o início da inflamação as primeiras células a chegarem no local são os neutrófilos. Na nossa análise pode-se perceber que há aumento considerável de neutrófilos nos animais infectados em relação ao SHAM, sendo esse aumento estatisticamente significante ((p<0,001 LD vs. SHAM, e p<0,01 HD vs. SHAM). Esse achado era esperado também pelo aumento das citocinas analisadas, já que algumas delas participam do processo de adesão e extravasamento leucocitário(22). Nos estágios tardios os linfócitos também são atraídos para o local, por isso é de se esperar que não haja grandes quantidades dessas células no estágio agudo da infecção como o aqui avaliado. Mesmo assim, há uma tendência ao aumento da concentração dessas células, evidenciada principalmente no grupo HD, porém sem significância estatística.

Com relação às citocinas, muitas são liberadas após a ligação de PAMPs e DAMPs a PRRs, sendo TLR um dos representantes desse grupo. Sabe-se que estão envolvidos na resposta ao meningococo os TLR-2, -4 e -9, sendo que os dois primeiros se encontram na membrana celular e o último é uma proteína presente no endossoma(39). No nosso estudo avaliamos a expressão de TLR-2 e TLR-4 e em ambos os casos houve aumento nos grupos de animais infectados, sendo que na avaliação do TLR-2 a diferença foi estatisticamente significante (p<0,05). Ainda, o TLR-4 também está envolvido na IRA de origem infecciosa, uma vez que é expresso por células epiteliais tubulares tanto em camundongos quanto em humanos (40). Ainda que não esteja completamente elucidado o mecanismo, uma das hipóteses é de que a sepse altere o transporte de NaCl na mácula densa, levando à disfunção tubular(41).

As citocinas avaliadas também estão aumentadas em relação ao Grupo SHAM, uma vez que no processo inflamatório há intensa liberação dessas moléculas que funcionam como quimioatraentes para leucócitos ou são fatores desencadeantes de reações. Durante a infecção há aumento de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que funcionam como imunorreguladores do processo. Na nossa análise não é possível avaliar se ele seria dose dependente, uma vez que poucas concentrações de inóculo foram avaliadas e para análise dos grupos foi necessário utilizar um *pool* de soro dos animais.

No caso das reações geradas a partir das citocinas, citamos a IL1B, secretada a partir da ativação da caspase-1, e TNFα, liberadas após a ativação do TLR-4, principal

receptor de LPS nas células. A liberação dessas citocinas desencadeiam uma série de cascatas mediadas por NFκB, podendo culminar na apoptose celular. Entretanto, estudos realizados evidenciam que diversas bactérias, entre elas o meningococo, são capazes de impedir a apoptose ao inibir a cascata (42–44). Ainda, outra proteína de superfície do meningococo (PorB) também é capaz de ativar a cascata de NFκB via TLR-2, entretanto a apoptose não acontece ao final da reação. Massari *et al.* demonstraram que a proteína PorB atuaria diretamente na membrana mitocondrial, alterando a polarização e evitando o efluxo de Ca^{2+} da organela(43). Nesse mesmo estudo não houve alteração da concentração de Bax nas células analisadas. Esse achado diferencia do que encontramos no nosso estudo, uma vez que os animais apresentam diminuição de Bax em relação ao controle. Uma possível explicação poderia decorrer de o estudo realizado por Massari ter utilizado apenas a PorB purificada, sem outras proteínas que possam atuar na cascata de ativação da apoptose. Outro grupo ao analisar a atuação de PorB em *Neisseria gonorrhoeae* encontrou resultados divergentes, de que a proteína teria capacidade de ativar a cascata(45). Sabe-se que diferentes técnicas de purificação de proteínas e cultura celular podem influenciar no resultado final(46). No nosso estudo, Bax está diminuído nos grupos infectados, entretanto não estatisticamente significante, podendo sugerir que possa haver outros mecanismos que não apenas PorB capazes de inibir a via intrínseca. Com relação aos outros marcadores utilizados era esperado que o citocromo c não estivesse aumentado já que não houve a despolarização da membrana mitocondrial e, por consequência, não houve ativação de caspase-9. A caspase-3 é a proteína efetora da apoptose, sendo a porção final tanto da via intrínseca quanto extrínseca. Apesar de não termos dados com relação à via extrínseca, como a dosagem de caspase-8, sabe-se que bactérias patogênicas possuem proteínas capazes de inibir a clivagem da procaspase-3, eliminando totalmente a possibilidade de morte celular(42).

Por fim, os achados ao utilizar o método TUNEL evidenciam que há aumento de DNA fragmentado nos grupos infectados, sendo a diferença estatisticamente significante no Grupo HD ($p<0,01$). O método de TUNEL possui uma fragilidade pois não é específico para análise de apoptose, podendo gerar falsos positivos quando analisados para esse fim em casos em que há transcrição gênica ou células necróticas(33), devendo sempre ser confirmado por outra técnica. Entretanto, estudos

realizados com bactérias capazes de inibir a apoptose demonstram que ocorre a clivagem do DNA nesses casos, mas a morte celular não é concretizada. Sendo assim, é possível que as células encontradas no nosso estudo estejam tanto em fase de intensa transcrição gênica devido à inflamação como tenham tido o DNA clivado. Observamos que há aumento de p53, que está relacionado a ativação de apoptose.

Após a análise dos resultados, entretanto, discutiu-se a possibilidade de o momento selecionado para a eutanásia dos animais ter influenciado negativamente nos resultados, uma vez que a doença é bastante grave e de evolução rápida inclusive em humanos. Devido ao tamanho do animal, podemos questionar se a dosagem de citocinas e marcadores de apoptose não teria ocorrido de forma tardia. Dessa forma, novos experimentos precisariam ser realizados para que diferentes momentos fossem utilizados e os animais avaliados em diferentes fases da doença.

6 CONCLUSÃO

Diante dos achados é possível afirmar que as vias de ativação da cascata inflamatória no rim acontecem via TLR-2 e -4, ativando liberação de citocinas que funcionam como quimioatraentes para neutrófilo e linfócitos.

Tal achado pode estar relacionado à presença da bactéria no interstício renal e, possivelmente, intratubular e intracelular, refutando a hipótese de ser relacionada a liberação de endotoxinas pelo meningococo.

Como já avaliado por outros grupos, a via intrínseca da apoptose está inibida, porém não é possível afirmar o ponto de inibição, uma vez que Bax também está diminuído.

Observamos que há ativação de p53, proteína envolvida nos mecanismos de apoptose.

REFERÊNCIAS[1]

1. Van Deuren M, Brandtzaeg P, Van Der Meer JWM. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):144–66.

2. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal Disease. N Engl J Med. 2001;344(18):1378–88.

3. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis. Lancet. 2007;369(9580):2196–210.

4. Stephens DS. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis. Vaccine. 2009;27(SUPPL. 2):71–7.

5. Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, Harrison LH, Jelfs J, Ladhani SN, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. Vaccine [Internet]. 2012;30(SUPPL. 2):26–36. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.032

6. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. [cited 2018 Apr 23]. Available from: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def

7. Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PW. Host genetic determinants of Neisseria meningitidis infections. Lancet Infect Dis [Internet]. 2003;3(9):565–77. Available from: http://journals.ohiolink.edu/ejc/pdf.cgi/Emonts_M.pdf?issn=14733099&issue=v03i0009&article=565_hgdonmi

8. Campsall PA, Laupland KB, Niven DJ. Severe Meningococcal Infection. A Review of Epidemiology, Diagnosis, and Management. Crit Care Clin [Internet]. 2013;29(3):33–409. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.001

9. Brouwer MC, Tunkel AR, Van De Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):467–92.

10. Heckenberg SGB, Brouwer MC, Van Der Ende A, Van De Beek D. Adjunctive dexamethasone in adults with meningococcal meningitis. Neurology. 2012;79(15):1563–9.

11. Sabatini C, Bosis S, Semino M, Senatore L, Principi N, Esposito S. Clinical presentation of meningococcal disease in childhood. J PrevMed Hyg [Internet]. 2012;53(2):116–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23240173

12. Rafiq A. An unusual presentation of meningococcal meningitis - Timely recognition can save lives! Am J Emerg Med. 2013;31(6):3–4.

13. Apicella M. Neisseria meningitidis. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier; 2010. p. 2737-52.

14. Thorburn K, Baines P, Thomson A, Hart C. Mortality in severe meningococcal disease. Arch Dis Child. 2001;85:382–5.

15. Harrison LH. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):142–64.

16. Gorringe AR, Reddin KM, Funnell SG, Johansson L, Rytkönen A, Jonsson AB. Experimental disease models for the assessment of meningococcal vaccines. Vaccine. 2005;23(17–18):2214–7.

17. Quagliarello V. clinical implications of basic research Dissemination of Neisseria meningitidis. J Med. 2011;1573–5.

18. Zarantonelli ML, Szatanik M, Giorgini D, Hong E, Huerre M, Guillou F, et al. Transgenic mice expressing human transferrin as a model for meningococcal infection. Infect Immun. 2007;75(12):5609–14.

19. Coureuil M, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X. Invasive meningococcal disease: A disease of the endothelial cells. Trends Mol Med [Internet]. 2014;20(10):571–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.08.002

20. Hellerud BC, Olstad OK, Nielsen EW, Trøseid AMS, Skadberg Øyvind, Thorgersen EB, et al. Massive organ inflammation in experimental and in clinical meningococcal septic shock. Shock. 2015;44(5):458–69.

21. Brusletto BS, Hellerud BC, Løberg EM, Goverud IL, Vege Å, Berg JP, et al. Traceability and distribution of Neisseria meningitidis DNA in archived post mortem tissue samples from patients with systemic meningococcal disease. BMC Clin Pathol. 2017;17(1):1–11.

22. Murphy K. Imunobiologia de Janeway. 8 ed. Artmed; 2015.

23. Lewis LA, Ram S. Meningococcal disease and the complement system. Virulence. 2014;5(1):98–126.

24. Kawai T, Akira S. TLR signaling. Vol. 19, Seminars in Immunology. 2007. p. 24–32.

25. Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L. Live Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Neisseria meningitidis activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. J Leukoc Biol [Internet]. 2006 Aug [cited 2019 Sep 15];80(2):267–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731773

26. Johswich K. Innate immune recognition and inflammation in Neisseria meningitidis infection. Pathog Dis. 2017;75(2):1–17.

27. John CM, Phillips NJ, Stein DC, Jarvis GA. Innate immune response to lipooligosaccharide: Pivotal regulator of the pathobiology of invasive Neisseria meningitidis infections. Pathog Dis. 2017;75(3):1–14.

28. Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. Vol. 37, International Reviews of Immunology. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 20–36.

29. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview

of Mechanisms of Activation and Regulation. Int J Mol Sci [Internet]. 2019;20(13):3328. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/20/13/3328

30. Groslambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. J Inflamm Res. 2018;11:359–74.

31. Lee K, Kang T. The Molecular Links between Cell Death. Cells. 2019;8(9):1–23.

32. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. Immunol Rev. 2003;193:10–21.

33. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495–516.

34. Pollard AJ, Maiden MCJ, Gorringe AR, Reddin KM, Voet P, Poolman JT. Animal Models for Meningococcal Disease. Vol. 66, From: Methods in Molecular Medicine.

35. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem. 1976;72(1–2):248–54.

36. Marotto MS, Marotto PCF, Sztajnbok J, Seguro AC. Outcome of acute renal failure in meningococcemia. Ren Fail. 1997;19(6):807–10.

37. Matías M, Sancho J, Muntaner J, Prieto M, Rivas B. Hypophosphoremia and meningococcal infection. Preliminary study. An españoles pediatría. 1983;18(3):224–31.

38. Langenberg C, Bagshaw SM, May CN, Bellomo R. The histopathology of septic acute kidney injury: A systematic review. Crit Care. 2008;12(1):1–7.

39. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. Immunity [Internet]. 2011;34(5):637–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006

40. Morrell ED, Kellum JA, Pastor-Soler NM, Hallows KR. Septic acute kidney injury: Molecular mechanisms and the importance of stratification and targeting therapy. Crit Care. 2014;18(5):1–10.

41. Morrell ED, Kellum JA, Hallows KR, Pastor-Soler NM. Epithelial transport during septic acute kidney injury. Nephrol Dial Transplant. 2014;29(7):1312–9.

42. Hemrajani C, Berger CN, Robinson KS, Marchès O, Mousnier A, Frankel G. NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic Escherichia coli infection.

43. Massari P, Wetzler LM. Neisserial PorB is translocated to the mitochondria of HeLa cells infected with Neisseria meningitidis and protects cells from apoptosis. 2003;

44. Massari P, Gunawardana J, Liu X, Wetzler LM. Meningococcal porin PorB prevents cellular apoptosis in a toll-like receptor 2- and NF-κB-independent manner. Infect Immun. 2010;78(3):994–1003.

45. Deo P, Chow SH, Hay ID, Kleifeld O, Costin A, Elgass KD, et al. Outer membrane vesicles from Neisseria gonorrhoeae target PorB to mitochondria and induce apoptosis. PLoS Pathog [Internet]. 2018;14(3):1–30. Available from: http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006945

46. Lancellotti M, Pereira RFC, Cury GG, De Hollanda LM. Pathogenic and opportunistic respiratory bacteria-induced apoptosis. Brazilian J Infect Dis. 2009;13(3):226–31.