

# MODELOS EXPERIMENTAIS EM LESÃO PULMONAR AGUDA

## EXPERIMENTAL MODELS IN ACUTE LUNG INJURY

Raíssa Lopes Giacomini <sup>1</sup>

Sofia Silva Pinto <sup>1</sup>

Leda Marília Fonseca Lucinda <sup>2</sup>

Maria Aparecida Esteves Rabelo <sup>1</sup>

Camila Soares Furtado Couto <sup>2</sup>

José de Alencar Ribeiro Neto <sup>2</sup>

Vivian Santana Soares Ribeiro <sup>2</sup>

Roberta Feital Xavier <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Discente do curso de Medicina da FAGOC

<sup>2</sup> Docente do curso de Medicina da FAGOC

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A síndrome do desconforto respiratório agudo é de natureza inflamatória e ocorre devido à lesão da membrana alvéolo-capilar, que gera uma condição grave de insuficiência respiratória aguda hipoxêmica e uma disfunção do sistema surfactante, o que favorece o colapso alveolar e redução das áreas aeradas. **OBJETIVO:** Realizar uma revisão bibliográfica com o relato dos principais modelos experimentais para o estudo da lesão pulmonar aguda (LPA). **RESULTADOS:** Há diversos modelos utilizados para induzir a tal lesão em animais, e as mais usadas são a instilação de bactérias vivas e administração de endotoxina e a lesão pulmonar induzida pela ventilação. No entanto, existem outros modelos: ácido oleico por via intravenosa, hiperóxia, depleção de surfactante, aspiração de ácido clorídrico, reperfusão e isquemia, ligação e perfuração de ceco e outros. Cada um desses tem objetivo, características e processo envolvido. **CONCLUSÃO:** Devido à peculiaridade de cada método e à dificuldade de se encontrar um que englobe toda a fisiopatologia da LPA, os modelos animais são escolhidos pelos objetivos

da pesquisa experimental a ser realizada.

**Palavras-chave:** Lesão pulmonar aguda. Modelo animal. Sepsis.

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The acute respiratory distress syndrome is inflammatory in nature and occurs due to injury to the alveolar-capillary membrane that generates a severe condition of hypoxemic acute respiratory failure, and a dysfunction of the surfactant system, which favors alveolar collapse and reduction of aerated areas. **OBJECTIVE:** To perform a bibliographic review with the report of the main experimental models for the study of acute lung injury (LPA). **RESULTS:** There are several models used to induce such lesion in animals, being the instillation of live bacteria and administration of endotoxin and ventilation-induced lung injury the most used. However, there are other models: intravenous oleic acid, hyperoxia, surfactant depletion, hydrochloric acid aspiration, reperfusion and ischemia, cecum ligation and perforation, and the like. Each of these has a characteristic purpose and process involved. **CONCLUSION:** Due to the peculiarity of each method and the difficulty to find one that encompasses all pathophysiology of LPA, the animal models are chosen by the objectives of the experimental research to be performed.

**Keywords:** Acute lung injury. Animal model. Sepsis.



## INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é doença de natureza inflamatória causada pela lesão da membrana alvéolo-capilar. Essa síndrome gera uma condição grave de insuficiência respiratória aguda hipoxêmica, devido a edema intersticial e alveolar, rico em proteínas e células inflamatórias, além de disfunção do sistema surfactante que favorece o colapso alveolar, com consequente redução das unidades alveolares aeradas. Clínica e fisiologicamente, a SDRA se caracteriza por hipoxemia, opacidades bilaterais na radiografia de tórax, aumento do shunt, do espaço morto e redução da complacência pulmonar. Morfologicamente, os achados típicos são de dano alveolar difuso, com áreas de edema, inflamação, hemorragia e membrana hialina (Ware, 2000; Villar et al., 2011; Pinheiro, 2011).

A SDRA foi descrita inicialmente por Ashbaugh et al. (1967), em 12 pacientes com hipoxemia refratária, complacência pulmonar reduzida e infiltrados pulmonares difusos à radiografia de tórax (Ashbaugh et al., 1967). Desde então, múltiplas definições de trabalho foram propostas e utilizadas com o objetivo de facilitar a identificação desses pacientes na prática clínica e a condução e interpretação de estudos, tais como o Escore de Lesão Pulmonar (Murray et al, 1988) e a definição da Conferência Americana-Europeia (The American-European Consensus Conference on ARDS – AECC –1994) (Bernard et al., 1994).

Foram propostos novos critérios diagnósticos para SDRA, em 2012, criando-se a Definição de Berlim para a síndrome, que é a atualmente utilizada. Nessa definição são considerados os seguintes critérios: natureza aguda da lesão, imagem radiológica, origem do edema e nível de hipoxemia.

Caracteriza-se como uma lesão de natureza inflamatória e difusa da barreira, constituída pelo epitélio alveolar e pelo endotélio, com aumento da permeabilidade vascular e disfunção do sistema surfactante resultando em edema e colapso pulmonar, com consequente

redução das unidades alveolares aeradas (Ware, 2000). A lesão inflamatória que resulta na SDRA pode ser secundária a uma agressão direta dos pulmões ou a uma agressão sistêmica, sendo denominadas, respectivamente, de SDRA pulmonar e extra-pulmonar (Pelosi et al., 2003). Independentemente de a lesão ser originalmente pulmonar ou sistêmica, a SDRA apresenta um padrão temporal de evolução, constituída de uma fase exsudativa aguda e uma fase fibroproliferativa (Thille et al., 2013; Lorente et al., 2015).

A despeito de todo avanço ocorrido nos últimos anos em relação aos cuidados dos pacientes críticos, a mortalidade na SDRA ainda é elevada. Estudos epidemiológicos recentes conduzidos na Espanha e na Islândia encontraram mortalidade hospitalar de 47,8% e de 37%, respectivamente (Villar et al., 2011; Sigurdsson et al., 2013). Os dados brasileiros mais recentes foram os obtidos por Caser e colaboradores, que encontraram uma mortalidade hospitalar de 49,2% (Caser et al., 2014).

Uma das grandes dificuldades de se estudar e entender a SDRA como uma condição clínica homogênea é que ela pode ser originada a partir de diferentes fatores de risco. Para o estudo dessa condição, este trabalho teve como objetivo de, por meio de uma revisão bibliográfica, relatar os principais modelos experimentais para o estudo da lesão pulmonar aguda (LPA).

## METODOLOGIA

Realizou-se uma revisão de literatura em bancos de dados tais como: PubMed, Cochrane Scielo, e também bancos de dissertações e teses, compreendendo o período 1967-2017. A busca foi realizada nas línguas portuguesa e inglesa utilizando os unitermos: síndrome do desconforto respiratório agudo, “acute respiratory distress syndrome”; lesão pulmonar aguda, “acute lung injury”; ratos, “rats”; modelo animal, “animal model”; sepse, “sepsis”.

## DESENVOLVIMENTO

### Modelos animais de lesão pulmonar aguda

Modelos animais de LPA têm sido utilizados para o estudo da patogênese da SDRA, bem como os efeitos de novos tratamentos e estratégias ventilatórias. Torna-se importante ressaltar que os estudos animais que são realizados no Brasil devem seguir a Lei no 11.794/2008, que estabelece os procedimentos para o uso de animais para fins científicos. Essa lei foi de extrema importância na regulamentação dos estudos com animais de laboratório, pois estabeleceu a criação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA, tornando obrigatórias as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) em todas as instituições com atividade de pesquisa ou ensino que utilizam esses modelos, com o principal objetivo de garantir o cuidado adequado e manejo ético de animais para fins científicos e didáticos (BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008).

O modelo animal de LPA deve englobar idealmente uma ou mais características observadas na LPA em humanos, como início rápido após o insulto, comprometimento funcional pulmonar, evidência de lesão no parênquima pulmonar por meio da histologia, resposta inflamatória e aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar. Como existe baixa probabilidade de se encontrar todas essas alterações em um modelo animal de LPA, a principal consideração para a sua escolha deve ser o objetivo da pesquisa experimental a ser abordada (Matute-Bello et al., 2011).

Ressaltamos, entretanto, que nenhum desses modelos consegue apresentar todas as características da SDRA observadas nos humanos. Existem diferenças que devem ser observadas entre modelos experimentais e humanos quanto à anatomia, à fisiologia, à imunologia e ainda quanto ao contexto em que ocorre a LPA. Os roedores têm a parede alveolar e a barreira alvéolo-capilar menos espessas quando comparados aos humanos, e suas vias aéreas apresentam menor número de ramificações até

o bronquíolo terminal (Hofmann, 1989). Ratos possuem menos neutrófilos, os quais produzem menos espécies reativas de oxigênio (Johnson et al., 1999).

Um comitê organizado pela American Thoracic Society em 2011 sobre as características e métodos de avaliação da LPA em animais de experimentação descreveu que o quadro de LPA em um modelo animal deve ser definido quando pelo menos três dos seguintes achados estiverem presentes: evidência histológica de lesão tecidual, alteração na barreira alvéolo-capilar, presença de resposta inflamatória e evidência de disfunção fisiológica (Matute-Bello et al., 2011).

Vários modelos são utilizados para induzir a LPA em animais, sendo que a lesão pulmonar induzida pela ventilação (LPIV), a instilação de bactérias vivas e a administração de endotoxina representam os que têm sido mais comumente utilizados (Matute-Bello et al., 2011). Outros modelos incluem ácido oleico por via intravenosa, hiperóxia, aspiração de ácido clorídrico, depleção de surfactante, isquemia e reperfusão, ligação e perfuração do ceco, entre outros (Matute-Bello et al., 2008).

Nos modelos de LPIV é empregada a ventilação mecânica com volume corrente elevado e/ou altas pressões inspiratórias, com o uso ou não de pressão positiva no final da expiração (Matute-Bello et al., 2011). Esses modelos apresentam características típicas de lesão tecidual como: espessamento intersticial, infiltrados de neutrófilos nos alvéolos, aumento da permeabilidade capilar, recrutamento de células inflamatórias, além de hipoxemia (Lopez-Aguilar et al., 2010; Reis et al., 2016). No estudo conduzido por Henzler et al. (2011), os autores observaram que o dano alveolar difuso ocorre de forma mais significativa no modelo de LPIV, quando comparado com outros dois modelos de LPA (aspiração de ácido e depleção de surfactante). Essas alterações de padrões histológicos necessárias para o desenvolvimento da LPA através da LPIV foram também confirmadas em estudo experimental recente, por Reis et al. (2016), os quais avaliaram o pré-tratamento com corticosteróide na LPA induzida pela LPIV e

observaram que animais submetidos a ventilação mecânica com os seguintes parâmetros: volume corrente de 6 mL/ kg; frequência respiratória de 80 respirações/min e uma razão inspiratória para expiratório de 1: 2; FiO<sub>2</sub> de 1; e PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O desenvolveram a lesão e que o pré-tratamento foi efetivo em atenuar essa lesão.

No modelo de deleção de surfactante, é possível observar que ocorre a redução da complacência pulmonar ocasionando uma atelectasia transitória, mas não induz danos alveolares significativos e, em relação aos outros modelos supracitados, gera menor resposta inflamatória. Já o modelo de aspiração por ácido mostrou alterações histopatológicas de dano alveolar que foram caracterizadas por edema alveolar, infiltração de neutrófilos e hemorragia. As alterações inflamatórias foram acompanhadas pelo aumento de citocina pró-inflamatória IL1- $\beta$  (Henzler et al., 2011).

A inalação por aerossol, instilação intranasal direta, endotraqueal ou endobrônquica de bactérias representam modelos amplamente utilizados para o estudo de pneumonia em animais por gerar uma infecção pulmonar. Esses modelos são acompanhados de lesão tecidual e inflamação (Mizgerd; Skerrett, 2008). Recentemente foi realizado um estudo que avaliou a LPA por instilação

O modelo animal que emprega endotoxina de bactéria gram-negativa, o lipopolissacárido (LPS), simula a LPA na septicemia, quando administrado pelas vias peritoneal e venosa, e na pneumonia, quando administrado por via direta, intratraqueal. O LPS é um lipoglicídeo encontrado na membrana externa, sendo responsável por modelar a lesão causada por infecção bacteriana (Matute-Bello et al., 2008). Quando o LPS é administrado em animais por via intratraqueal, endovenosa ou intraperitoneal, é capaz de reproduzir a lesão à membrana alvéolo-capilar, com aspectos semelhantes à SDRA em humanos (Beck-Schimmer et al., 2005; Bianchi et al., 2016).

O modelo de endotoxina é acompanhado de lesão tecidual considerável, o que pode ser evidente em curto intervalo de tempo e é caracterizado por acúmulo de neutrófilos no

espaço alveolar e intersticial, espessamento de parede e presença de edema e debris protéico no espaço alveolar (Meyrick et al., 1983; Rotta, 1998; Fonseca et al., 2016). Esse modelo é acompanhado de resposta inflamatória sistêmica e pulmonar precoce de forma mais robusta em relação ao modelo de LPIV (Lopez-Aguilar et al., 2010). O início da resposta inflamatória e o aumento da permeabilidade epitelial nesse modelo estão associados à ativação da resposta imune inata pelo receptor TLR4 (Matute-Bello et al., 2011). Logo após a instilação intratraqueal de LPS, ocorre aumento de células no lavado broncoalveolar e elevação de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, entre outras (Matute-Bello et al., 2008). Assim, as vantagens do modelo são: i) fácil reprodução e administração; ii) representa a reação do organismo do ser humano frente às infecções bacterianas; iii) faz a estimulação da resposta imune inata. No entanto, possui a desvantagem de apresentar variabilidade na pureza do LPS, além de não causar ruptura da barreira endotélio-capilar, um mecanismo de lesão pulmonar (Guarino, 2015).

Recentemente foi realizado um estudo que avaliou a LPA por instilação endotraqueal de LPS e, após 24 horas da instilação, foi observada a presença de aumento de neutrófilos intersticiais e alveolares, assim como presença de debris protéico no alvéolo. No lavado bronco-alveolar foi observado aumento da contagem de células totais e de neutrófilos; esse processo de LPA foi também acompanhado de aumento da expressão de RNAm das citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$  e de fator quimioatrativo de neutrófilo CXCL-2 (Rabelo et al., 2017).

No estudo conduzido por Domenici-Lombardo et al. (1995), foi avaliado o desenvolvimento da LPA, após 12, 24 e 48 horas da instilação intratraqueal de LPS em ratos, utilizando parâmetros morfológicos e hematológicos, além de imagens por tomografia computadorizada. Após 12 horas, foram observados neutrófilos nos capilares do septo interalveolar e monócitos tanto no interior dos capilares quanto no espaço intersticial. Com 24 horas, o quadro se alterou progressivamente e

cursou com hipoxemia, hipercapnia e acidose, infiltrado difuso e heterogêneo bilateral na tomografia computadorizada e macrófagos no espaço alveolar. Após 48 horas, os neutrófilos estavam presentes no interstício septal e os macrófagos eram numerosos no alvéolo, onde também se observou deposição de fibrina. Estes autores ainda observaram pela microscopia eletrônica que o recrutamento de monócitos do sangue, seguido da sua diferenciação em macrófagos, ocorre rapidamente após a instilação de LPS, liberando citocinas quimioatrativas para neutrófilos.

O modelo de LPA por endotoxina LPS é de fácil aplicabilidade e apresenta resultados que comprovam a LPA por sepse, entretanto, em uma revisão realizada por Buras et al. (2005), foi relatado que o modelo CLP é considerado o padrão-ouro para a pesquisa de sepse, uma vez que esse modelo imita o a sepse em humanos como a que ocorre na apendicite rompida ou diverticulite perfurada. A CLP cria uma perfuração intestinal com vazamento de conteúdo fecal no peritônio, o que leva a uma infecção com flora bacteriana mista e fornece uma fonte inflamatória de tecido necrótico. A gravidade da doença, avaliada pela mortalidade, pode ser ajustada aumentando o tamanho da punção da agulha ou o número de punções. Já o modelo induzido por LPS não fornece uma simulação completa de sepse clínica (Zhang et al., 2017).

## CONCLUSÃO

Nenhum dos modelos apresentados tem todas as características da SDRA que ocorre nos humanos, uma vez que esta tem vários mecanismos envolvidos. Sendo assim, cada um deles possui um perfil de lesão que os diferencia entre si: i) Modelos de LPV em que a ventilação mecânica pode ser programada com volume corrente elevado e/ou altas pressões; ii) inalação por aerossol, instilação intranasal direta, endotraqueal ou endobrônquica de bactérias; iii) endotoxina de bactéria gram-negativa, o lipopolissacarídeo (LPS), a lesão gerada é muito

próxima à da membrana alvéolo-capilar que ocorre na SDRA em humanos.

Devido a essa peculiaridade de cada método e à dificuldade de se encontrar um que capture todos os mecanismos envolvidos na patogênese da LPA, eles são escolhidos pelos objetivos da pesquisa experimental a ser realizada.

## REFERÊNCIAS

- Abreu SSE, Caldas CP. Velocidade de marcha, equilíbrio e Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 1967; 2 (7511): 319-23.
- Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res*, 2005; 6:61.
- Bernard GR, Antigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American – European Consensus Conference on Acute Respiratory Distress Syndrome: definitions, mechanics, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994; 149 (3): 818-24.
- Bianchi AM, Reboredo MM, Lucinda LM, Reis FF, Silva MV, Rabelo MA et al. The effects of prone position ventilation on experimental mild acute lung injury induced by intraperitoneal lipopolysaccharide injection in rats. *Lung*, 2016; 194 (2):193-9.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*, 2005; 4 (10):854-65.
- Brasil. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais. *Diário Oficial da União*, Brasília, 9 out. 2008. Seção 1, p.1.
- Caser EB, Zandonade E, Pereira E, Gama AMC, Barbas CSV. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients. *Crit Care Med*, 2014; 42 (3):574-82.
- Domenici-Lombardo L, Adembri C, Consalvo M, Forzini R, Meucci M, Romagnoli P, Novelli GP. Evolution of endotoxin induced acute lung injury in the rat. *Int. J. Exp. Pathol*, 1995; 76:381-390.
- Fonseca LMC, Reboredo MM, Lucinda LMF, Fazza TF, Rabelo MAE, Fonseca AS. et al. Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal LPS in rats. *Int J Exp Pathol*, 2016; 97(6):430-437.



Fonseca FR, Reboredo MM, Lucinda LMF, Bianchi AMA, Rabelo MAE, Fonseca LMC. et al. Pre-treatment with dexamethasone attenuates experimental ventilator.

Guarino JMV. Abordagens farmacológicas e modelos animais para a Lesão Aguda do Pulmão e Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro.

Henzler D, Hochhausen N, Chankalal R, Xu Z, Whynot SC, Slutsky AS. et al. Physiologic and biologic characteristics of three experimental models of acute lung injury in rats. *Anesth Analg*, 2011; 112: 1139–46

Hofmann W, Koblinger L, Martonen TB. Structural differences between human and rat lungs: implications for Monte Carlo modeling of aerosol deposition. *Health Phys*, 1989; 57: 41-46.

Johnson JL, Moore EE, Hiester AA, Tamura DY, Zallen G, Silliman CC. Disparities in the respiratory burst between human and rat neutrophils. *J Leukoc Biol*, 1999; 65(2): 211-216.

Lopez- Aguilar J, Quilez ME, Martí-Sistac O, García-Martín C, Fuster G, Puig F. et al. Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. *Intensive Care Med*, 2010; 36:347–355.

Lorente JA, Cardinal-Fernández P, Muñoz D, Frutos-Vivar F, Thille AW, Jaramillo C. et al. Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. *Intensive Care Med*, 2015; 41(11):1921-30.

Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008; 295 (3): L379-399.

Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS. et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011; 44 (5): 725-738.

Meyrick B, Brigham KL. Acute effects of escherichia coli endotoxin on the pulmonary micro circulation of anesthetized sheep structure: Function relationships. *Lab Invest*, 1983; 48:458–470.

Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008; 294:L387–L398. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1988; 138 (3):720-3.

Pelosi P, D'Andrea L, Vitale G, Pesenti A, Gattinoni L. Vertical gradient of regional lung inflation in adult respiratory

distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994; 149 (1): 8-13.

Pinheiro BV, Lisboa LFM, Holanda MA. Fatores de risco na síndrome do desconforto respiratório agudo. *Pulmão*, 2011; 20(1):13-18.

Rabelo MAE, Lucinda LMF, Reboredo MM, Fonseca LMC, Reis FF, Fazza TF. Acute Lung Injury in Response to Intratracheal Instillation of Lipopolysaccharide in an Animal Model of Emphysema Induced by Elastase. *Inflammation*, 2017.

Reis FF, Reboredo MM, Lucinda LMF, Bianchi AMA, Rabelo MAE, Fonseca LMC. et al. Pre-treatment with dexamethasone attenuates experimental ventilator-induced lung injury. *J. Bras. Pneumol*, 2016; 3: 166-173. Rotta AT, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury. *Crit Care Med*, 1998; 26:1707–1715.

Sigurdsson, MI, Sigvaldason K, Gunnarsson TS, Moller A, Sigurdsson GH. Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2013; 57 (1):37-45. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O et al. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013; 187 (7): 761-7.

Villar J, Blanco J, Añón JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambrós A et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med*, 2011; 37 (12): 1932-41.

Warner AE. Pulmonary intravascular macrophages. Role in acute lung injury. *Clin Chest Med*, 1996; 17 (1): 125-35.

Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 2000; 342(18):1334-49.

Zhang B, Liu C, Yang N, Wang X. A comparative study of changes of autophagy in rat models of CLP versus LPS induced sepsis. *Exp Ther Med*, 2017; 14(3): 2194–2200.