GUILHERME LOPES GONÇALVES

A ALBUMINA INDUZ APOPTOSE DE PODÓCITOS MEDIADA
PELO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E
ATIVAÇÃO DA VIA PKC δ E P38 MAPK

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

GUILHERME LOPES GONÇALVES

A ALBUMINA INDUZ APOPTOSE DE PODÓCITOS MEDIADA
PELO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E
ATIVAÇÃO DA VIA PKC δ E P38 MAPK

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Oliveira de Souza

Versão parcial corrigida

São Paulo
2018

RESUMO

GONÇALVES, G. L. **A albumina induz apoptose de podócitos mediada pelo estresse de retículo endoplasmático e ativação da via PKC δ e p38 MAPK.** 2018. 61f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública caracterizado por alta morbidade e mortalidade e com enorme impacto social e econômico no sistema de saúde. Uma das consequências mais graves da progressão da DRC é a albuminúria, que se deve principalmente a lesões no epitélio tubular proximal e na membrana basal glomerular. O aumento da permeabilidade da barreira de ultrafiltração glomerular à albumina está diretamente relacionado à lesão podocitária, principalmente devido à perda de processos podais, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e eventos apoptóticos. No entanto, os mecanismos celulares envolvidos em tais processos ainda não foram elucidados. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos pelos quais a albumina participa na lesão de podócitos, considerando a contribuição da caveolina-1, GRP78, IRE-1 α fosforilado, PKC δ fosforilada, p38 MAPK fosforilada e caspase-12 clivada. Para isso, utilizamos podócitos de camundongos diferenciados, os quais foram distribuídos em quatro grupos: controle e tratados com albumina nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL, em RPMI 1640 sem soro, durante 24 horas. Após o tratamento, a apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. Para os experimentos de imunofluorescência, as células foram tratadas com albumina fluorescente conjugada à isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1 mg/mL durante 30 min, 1h, 3h e 24h. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, objetiva de 63x. A expressão de proteínas foi analisada por western blotting; GRP78, PKC δ , p38 MAPK e caspase-12 clivada foram avaliadas por 30 min, 1h, 3h e 24h após o tratamento das células com albumina 1 mg/mL. GAPDH foi usado como controle endógeno. A análise estatística foi avaliada pela ANOVA *one-way* seguida do pós teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Nossos resultados mostram que o tratamento das culturas celulares de podócitos com albumina, na concentração de 1 mg/mL, durante 24h resultou em um aumento significativo na taxa de apoptose total em comparação com o controle. Com relação à imunofluorescência, colocalizações entre albumina FITC e caveolina-1 foram observadas no período de 30 min, 1h, 3h e 24h. Em relação à expressão proteica, observou-se um aumento significativo na expressão da proteína GRP78 no período de 1 hora após o tratamento com albumina, o que indica um possível estresse de retículo endoplasmático. No caso da proteína IRE-1 fosforilada houve aumento da expressão em 30 min, 1h, 3h e 24h em relação ao grupo controle. Além disso, um aumento significativo na expressão das proteínas PKC δ fosforilada, p38 MAPK fosforilada e caspase-12 clivada foi observado nos períodos de 1h, 3h e 24h após o tratamento com albumina. Estes dois últimos parâmetros foram reduzidos pelo co-tratamento das células com SB203580 (10^{-7} M), um inibidor específico da p38 MAPK. Estes resultados sugerem que a proteína caveolina-1 tem um papel importante na internalização da albumina nos podócitos. Além disso, a albumina induz a apoptose por ativação do estresse de retículo nessas células, principalmente através da via GRP78/IRE-1 α /PKC δ /p38 MAPK/caspase-12.

Palavras-chave: Podócitos. Albumina. Estresse de retículo endoplasmático. Apoptose

ABSTRACT

GONÇALVES G. L. **Albumin induces podocyte apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress and activation of the PKC δ and p38 MAPK pathway.** 2018. 61p. Master's thesis (Human Physiology) - Institute of Biomedical Sciences, Sao Paulo University, Sao Paulo, 2018.

Chronic kidney disease (CKD) is a public health problem characterized by high morbidity and mortality and with social and economic impact on the health system. One of the most serious consequences of CKD progression is albuminuria, which is mainly due to injury of the proximal tubular epithelium and the glomerular basement membrane. Increased permeability of the glomerular ultrafiltration barrier to albumin is directly related to podocyte injury, mainly due to loss of foot processes, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptotic events. However, the cellular mechanisms involved in such processes have not yet been elucidated. Thus, the aim of this study was to investigate the mechanisms by which albumin participates in podocyte injury, considering the contribution of caveolin-1, GRP78, phosphorylated IRE-1 α , phosphorylated PKC δ , phosphorylated p38 MAPK, and cleaved caspase-12. For this, we used mice differentiated podocytes, which were distributed in four groups: control and treated with albumin concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL in serum-free RPMI 1640 for 24 hours. After treatment, apoptosis was assessed by flow cytometry. For the immunofluorescence experiments, the cells were treated with 1 mg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) albumin for 30 min, 1h, 3h, and 24h. The images were obtained by confocal microscopy, 63x objective. Protein expression was analyzed by western blotting; GRP78, PKC δ , p38 MAPK and cleaved caspase-12 were evaluated 30 min, 1h, 3h and 24h after treatment of the cells with 1 mg/mL albumin. GAPDH was used as an endogenous control. Statistical analysis was assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Our results show that the treatment of podocytes with albumin at a concentration of 1 mg/mL for 24h resulted in a significant increase in the total apoptosis rate compared to the control. Regarding immunofluorescence, colocalizations between FITC albumin and caveolin-1 were observed in the period of 30 min, 1h, 3h and 24h. Regarding protein expression, a significant increase in GRP78 protein expression was observed within 1 hour of albumin treatment, indicating potential endoplasmic reticulum stress. In addition of the phosphorylated IRE-1 protein, expression increased in 30 min, 1h, 3h and 24h in relation to the control group. A significant increase on the expression of phosphorylated PKC δ , phosphorylated p38 MAPK and cleaved caspase-12 proteins was also observed at 1h, 3h and 24h after albumin treatment. These latter two parameters were reduced by co-treatment of the cells with SB203580 (10^{-7} M), a specific inhibitor of p38 MAPK. These results suggest that caveolin-1 protein plays an important role in the internalization of albumin in podocytes. In addition, albumin induces podocyte apoptosis by activating the endoplasmic reticulum stress in these cells, mainly through the GRP78/IRE1- α /PKC δ /p38 MAPK/caspase-12 pathway.

Keywords: Podocytes. Albumin. Endoplasmic reticulum stress. Apoptosis

1 INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos fundamentais para o balanço hidroeletrolítico. Recebem cerca de 20% do débito cardíaco, participam da regulação do volume do fluido extracelular, do pH do meio interno e realizam a depuração plasmática de substâncias menos importantes para o organismo. A organização de sua vasculatura é essencial para a regulação do fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e formação da urina (De Jong *et al.*, 2007; Basile, 2009; Sequeira Lopez e Gomez, 2011). A ultrafiltração glomerular ocorre nos capilares glomerulares sendo controlada pelas forças de Starling e por ajustes funcionais da barreira de ultrafiltração glomerular (Kawada *et al.*, 2002).

1.1 Barreira de ultrafiltração glomerular

O glomérulo é composto de três tipos celulares: células mesangiais, células endoteliais dos capilares glomerulares e podócitos. Juntamente com a membrana basal glomerular (MBG), o endotélio e os podócitos formam a barreira de ultrafiltração glomerular (**Figura 1**).

Figura 1 - Esquema representativo da barreira de ultrafiltração glomerular. No lúmen do capilar glomerular podemos observar as células endoteliais. A MBG é representada por uma linha de coloração verde. Na face externa, os podócitos estão ancorados à MBG. Fonte: Adaptado de Silverthorn, 2010.

As células mesangiais compõem o mesângio glomerular e estão em contato direto com células endoteliais dos capilares glomerulares, nas áreas em que a MBG não cobre o endotélio do capilar glomerular (Sakai e Kriz, 1987). O contato entre mesângio e MBG é facilitado pelos elementos de matriz extracelular como a fibronectina. Além disso, as células mesangiais produzem os componentes da matriz extracelular glomerular, mantêm a estrutura dos capilares glomerulares e possuem capacidade contrátil, o que permite o controle do fluxo intracapilar, regulando assim a ultrafiltração glomerular (Kriz *et al.*, 1990).

Na matriz extracelular de glomérulos saudáveis predominam os elementos como a fibronectina e o colágeno do tipo IV. Nos estados patológicos em que se observa expansão da matriz extracelular ocorre aumento da expressão de fibronectina, laminina e colágeno total, com predomínio dos colágenos intersticiais do tipo I e III, normalmente encontrados na parede de arteríolas e no interstício (Funabiki *et al.*, 1990). A expansão de matriz extracelular influencia vários aspectos do comportamento celular glomerular, tais como adesão, crescimento, migração, proliferação, diferenciação e reparo (Kriz *et al.*, 1990).

A MBG é um componente da matriz extracelular, que atua como barreira de ultrafiltração, separando a luz do capilar glomerular dos podócitos. Assim como a matriz extracelular, a MBG é constituída basicamente por macromoléculas como a fibronectina e o colágeno do tipo IV além da laminina, distroglicanos e proteoglicanos como a agrina (Yurchenco *et al.*, 2004). Devido à sua constituição proteica, a MBG apresenta cargas predominantemente negativas, o que dificulta a filtração de proteínas, especialmente as de cargas negativas.

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que exercem funções organizadoras e protetoras da estrutura e função glomerular. Estão envolvidos na ultrafiltração do plasma, na manutenção estrutural da MBG e na forma e integridade dos capilares glomerulares. Uma característica importante dessas células é a presença de processos podais (**figura 2**), que são prolongamentos do corpo celular constituídos por um citoesqueleto à base de actina. O citoesqueleto é altamente complexo e diversas outras proteínas mantêm a morfologia e aderência dos podócitos à MBG (Leeuwis *et al.*, 2010). Os processos podais possuem três porções distintas: o lado basal, o lado apical e o diafragma.

Figura 2 - Esquema representativo da barreira de ultrafiltração glomerular detalhando a organização proteica dos processos podais (adaptado de (Endlich *et al.*, 2001).

O lado basal conecta o podócito à MBG através das integrinas e distroglicanos (proteínas que organizam a interação entre a laminina e a matriz extracelular). As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície que auxiliam na adesão da célula à matriz extracelular e transmitem sinais químicos e mecânicos (Schwartz, 1997). O lado apical dos podócitos contém proteínas carregadas negativamente como a podocalixina, sialoglicoproteína e a podoplanina, formando um glicocálix que, em condição fisiológica, restringe a passagem de moléculas aniônicas, principalmente a albumina (Qian *et al.*, 2001; Kittikulsuth *et al.*, 2011).

O diafragma é a camada mais complexa, com uma espessura constante de 40 nm (Carey, 2005). Proteínas específicas do diafragma interagem com a actina do citoesqueleto, influenciando vias de sinalização e a função dos podócitos. As proteínas expressas no diafragma incluem: nefrina, podocina, Neph 1 e 2, CD2AP, FAT 1 e 2 e o canal de cálcio TRPC6 (*Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6*) (Mundel e Shankland, 2002).

Contudo, não é surpresa constatarmos que diversas doenças sistêmicas ou aquelas associadas às doenças renais como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e *diabetes mellitus*, podem induzir perda da função renal, essencialmente por alterar a morfologia, hemodinâmica, função glomerular e tubular renal (Kawada *et al.*, 2002). A perda maior ou menor da função renal é denominada doença renal, a qual pode ser classificada em aguda ou crônica.

1.2 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) representa um dos mais sérios problemas de saúde pública mundial. No Brasil, a prevalência de pacientes mantidos em programas de diálise corresponde a 503 pacientes por milhão de indivíduos de uma população (Sesso *et al.*, 2016) e a perspectiva de aumento do número de casos de DRC preocupa os profissionais do sistema de saúde de forma global. Outra preocupação não menos importante é que independente da doença de base, as complicações envolvidas com a DRC resultam em anemia, acidose metabólica, alteração no metabolismo mineral, desnutrição e doenças cardiovasculares. Em linhas gerais, a DRC é caracterizada por glomeruloesclerose, infiltração de leucócitos no interstício renal, fibrose túbulo intersticial (Abbate *et al.*, 2006; Schlondorff, 2008) e proteinúria - associada às alterações na barreira de ultrafiltração glomerular e injúria de podócitos, além de hipertensão arterial sustentada (Buckalew *et al.*, 1996). De acordo com a *National Kidney Foundation*, a progressão da DRC é classificada em estágios, conforme o grau de função renal do paciente.

1) início da lesão, mas com função renal preservada - ritmo de filtração glomerular (RFG) acima de 90 mL/min/1,73m²;

2) início da perda da função renal - RFG entre 60 e 89 mL/min/1,73m²;

3) injúria renal moderada - RFG entre 30 e 59 mL/min/1,73m², com níveis elevados de ureia e creatinina no plasma;

4) injúria renal severa - RFG entre 15 e 29 mL/min/1,73m², paciente com hipertensão arterial e edema;

5) fase terminal da injúria renal crônica - RFG menor que 15 mL/min/1,73m² e nessa condição, o paciente passa a depender de terapia por hemodiálise ou transplante (Coresh *et al.*, 2007). Apesar dos estágios bem definidos, ainda há dificuldade no diagnóstico e/ou

tratamento da DRC devido à carência de conhecimento para a identificação de fatores críticos nos estágios iniciais da doença, bem como a não-utilização de testes adequados para avaliação da função renal.

Durante a lesão de podócitos a estrutura elaborada do citoesqueleto é fisicamente alterada, resultando na perda dos processos podais. Sendo assim, as células remanescentes são incapazes de cobrir toda a MBG e manter a integridade da barreira de ultrafiltração, resultando na filtração de proteínas e, consequentemente, proteinúria. A proteinúria é um sinal clinicamente importante de disfunção renal e, nesta condição, uma quantidade significativa de albumina pode ser encontrada no ultrafiltrado glomerular e na urina (Okamura *et al.*, 2013; Reiser e Altintas, 2016).

1.2.1 Injúria de podócitos

A injúria glomerular pode ocorrer por vários fatores, incluindo a glomeruloesclerose, nefropatia diabética e hipertensão arterial. Essas doenças são associadas a múltiplos fatores como: angiotensina II, endotelina 1, estresse oxidativo, processos inflamatórios e hipertensão glomerular (Cardillo *et al.*, 2002). Nessas condições, a injúria de podócitos está associada essencialmente à perda de processos podais e apoptose – morte celular programada (Qian *et al.*, 2001), o que resulta na diminuição do número de podócitos. Sendo assim, as células remanescentes são incapazes de cobrir toda a MBG e manter a integridade da barreira de ultrafiltração. Como consequência, os podócitos são substituídos por tecido cicatricial e matriz extracelular (Leeuwis *et al.*, 2010). Dessa forma, a injúria de podócitos pode estar associada à proteinúria (Asanuma e Mundel, 2003; Meyrier, 2005).

A proteinúria merece destaque, pois além de ser indicador de injúria renal, é um importante fator de risco para a progressão da DRC (Toblli *et al.*, 2012). Em humanos com função renal preservada, proteínas de baixo peso molecular e uma pequena quantidade de albumina são filtradas pelo glomérulo e captadas no túbulo proximal. Quando a excreção de albumina se encontra na faixa de 30-300 mg/dia, considera-se como uma condição de microalbuminúria, indicador precoce de nefropatia. Para valores superiores a 300 mg/dia, considera-se macroalbuminúria, indicador de doença renal crônica terminal (De Jong *et al.*, 2007).

1.2.2 Albuminúria e podócitos

Considerando que em condições fisiológicas, a barreira de ultrafiltração glomerular é pouco permeável à albumina (Tojo e Kinugasa, 2012), pode-se afirmar que em decorrência da capacidade endocítica do túbulo proximal, a depuração plasmática de albumina é baixa.

No epitélio tubular proximal, o principal mecanismo de endocitose é a mediada por receptor. Este processo envolve a interação entre moléculas solúveis do fluido extracelular e receptores presentes na superfície celular e a subsequente internalização deste complexo por meio de vesículas de clatrina originadas da membrana celular (Taylor *et al.*, 2011). No caso dos podócitos, a passagem paracelular de moléculas é restringida pelo diafragma, o qual contém proteínas integrais de membrana que se estendem entre os processos podais de podócitos adjacentes. Em estados proteinúricos, a passagem de albumina pela barreira de ultrafiltração pode ocorrer via paracelular, através do diafragma ou via transcelular, através do podócito. Alguns estudos *in vitro* mostram que podócitos cultivados podem realizar a endocitose e transcitose de albumina principalmente via caveolina-1 (Eyre *et al.*, 2007; Dobrinskikh *et al.*, 2014).

Lesões na MBG observadas na progressão de muitas doenças renais, permitem maior filtração de albumina e conseqüentemente a sobrecarga dessa proteína no túbulo proximal resulta em albuminúria (Christensen *et al.*, 2009; Tojo e Kinugasa, 2012). Nessa condição de persistente exposição das células tubulares a altas concentrações de albumina, tem-se observado a contribuição dessa proteína como mediador da síntese de fatores pró-inflamatórios evidentes na progressão de doenças renais (Baines e Brunskill, 2008; Peruchetti *et al.*, 2011).

Embora as vias de sinalização intracelular envolvidas nesse processo sejam pouco conhecidas, sabe-se que a exposição de podócitos a elevadas concentrações de albumina, resulta na síntese de fatores pró-inflamatórios como as citocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e estimulação do NF κ B (do inglês: nuclear factor κ B) (Okamura *et al.*, 2013).

1.2.3 Albumina e estresse de retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela com função essencial na biossíntese, enovelamento e modificações estruturais de proteínas, além de atuar como reservatório de cálcio intracelular (Scheuner *et al.*, 2001). Quando o enovelamento de proteínas no RE é alterado devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo o ânion superóxido (O_2^-), produzido a partir do oxigênio molecular, alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular, glicosilação e outros fatores, pode resultar na acumulação de proteínas mal enoveladas. Nesta situação, as células eucarióticas ativam uma série de cascatas de transdução de sinal que são coletivamente denominadas como resposta às proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response – UPR*). Este mecanismo por sua vez, é mediado por três receptores localizados na membrana do RE: PERK (do inglês: *protein kinase like endoplasmatic reticulum kinase*), IRE-1 α (do inglês: *inositol requiring kinase 1*) e ATF6 (do inglês: *activating transcription factor 6*) (Schröder e Kaufman, 2005). Em condições normais, esses receptores são mantidos em um estado inativo devido às interações com a chaperona GRP78 (do inglês: *glucose regulated protein 78*) (Kaufman, 1999; Bertolotti *et al.*, 2000; Ma e Hendershot, 2004; Bravo *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015). A chaperona GRP78 é uma proteína residente do RE e sua síntese pode ser estimulada por uma variedade de fatores que perturbam a função e homeostase dessa organela. Esta proteína atua como um sensor de estresse do RE e possui a capacidade de bloquear o processo apoptótico (Lee, 2005).

1.2.3.1 PERK

PERK é uma serina/treonina quinase transmembrana do tipo I, que apresenta um domínio citosólico cuja porção catalítica é homóloga com outras quinases da família eIF2 α (do inglês: *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*). Após a dissociação do GRP78, a PERK induz sua autofosforilação e ativação de seu domínio quinase (Xu *et al.*, 2005). PERK fosforilada ativa os fatores Nrf2 (do inglês: *nuclear erythroid factor 2*) e eIF2 α . O fator eIF2 α fosforilado na serina 51 ativa o ATF4 (do inglês: *activating transcription factor 4*) (Rajesh *et al.*, 2015). Os fatores ATF4 e Nrf2 induzem aumento na expressão de genes que facilitam a adaptação das células ao estresse (Koromilas, 2015), incluindo os genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, reações do tipo redox (redução-oxidação) e secreção de proteínas (Harding *et al.*, 2000; Harding *et al.*, 2003). Entretanto, nem todos os genes regulados por ATF4 são anti-apoptóticos. Quando o estresse de RE persiste e a quantidade de proteínas mal enoveladas aumenta, a via PERK/eIF2 α /ATF4 é potencializada e nessa condição o ATF4 induz a transcrição de CHOP (do inglês: *CCAAT-enhancer-binding protein*

homologous protein), que leva ao aumento da produção de EROs no RE e ativa proteínas apoptóticas em resposta ao estresse de RE (Nishitoh, 2012).

1.2.3.2 IRE-1 α

IRE-1 α é uma proteína transmembrana do tipo I presente na membrana do RE, que apresenta um domínio citosólico serina/treonina quinase. Sua fosforilação desencadeia a ativação do fator de transcrição XBP1 (do inglês: *X-box binding protein 1*), capaz de entrar no núcleo para regular a expressão dos genes que participam dos processos de tráfego, enovelamento e degradação de proteínas. Além disso, XBP1 promove a sobrevivência celular, uma vez que inibe a expressão de CHOP e regula a expressão de genes envolvidos na expansão do compartimento do RE, além da secreção de proteínas. Por outro lado, o IRE-1 α quando ativado, também é capaz de se ligar ao receptor de TRAF2 (do inglês: *TNF receptor-associated factor 2*) que, por sua vez, resulta em apoptose principalmente por ativação de outras proteínas quinases, como é o caso de quinases c-Jun N-terminal (JNK) e/ou p38 MAPK. A ativação de JNK resulta na ativação da proteína pró-apoptótica BIM e inibição da anti-apoptótica Bcl-2 (Xu *et al.*, 2005; Darling e Cook, 2014). No caso da p38 MAPK, pode levar à ativação de vários fatores de transcrição, como por exemplo o ATF2 (do inglês: *activating transcription factor 2*) e CHOP. De forma geral, a p38 MAPK e as quinases JNK são fosforiladas em resposta às alterações nos níveis de Ca²⁺ do RE, o que parece ser o provável mecanismo desencadeador de apoptose (Kim *et al.*, 2010).

1.2.3.3 ATF6

O ATF6 (do inglês: *activating transcription factor 6*) é uma proteína transmembrana do tipo II caracterizada por um elemento responsivo a adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Após a indução do estresse RE, a dissociação da GRP78 leva à translocação do ATF6 para o aparelho de Golgi onde é clivado pelas proteases denominadas S1P e S2P, gerando um fator de transcrição ativo citosólico. Existem dois homólogos ATF6 já descritos: o ATF6 α e o ATF6 β . A isoforma α regula a expressão de genes envolvidos na capacidade do RE e a expressão de XBP1, já a isoforma β exerce efeito inibitório sobre a isoforma α (Darling e Cook, 2014).

1.2.3.4 Proteínas quinases

Sob o estresse de RE, as células são reguladas por várias proteínas quinases para a sobrevivência ou morte celular (Kadowaki *et al.*, 2004). As proteínas quinases e fosfatases têm sido descritas como elementos chave, devido ao seu papel regulatório na transdução de

sinal. De forma geral, as proteínas quinases podem regular os estágios iniciais da apoptose devido à fosforilação de proteínas-chave, em que as caspases são os principais alvos. Sua ativação resulta em alterações morfológicas características, tais como alterações na membrana celular, condensação de cromatina e fragmentação nuclear (Ryer *et al.*, 2005)

1.2.3.4.1 Proteína quinase C

A proteína quinase C (PKC) está envolvida em uma variedade de sinais intracelulares. A PKC é uma enzima amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em praticamente todos os tecidos de mamíferos. A família PKC é composta por quinases serina/treonina contendo um domínio regulatório N-terminal e catalítico C-terminal. Atualmente, sabe-se que a PKC constitui uma grande família de proteínas, com várias isoformas, as quais apresentam características individuais. A família PKC pode ser classificada em 4 grupos (Salamanca e Khalil, 2005):

- 1) Convencionais ou cPKCs: α , β e γ , as quais são ativadas por cálcio, fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) ou ésteres de forbol;
- 2) Novas ou nPKCs: δ , ϵ , η e θ as quais são ativadas por PS, DAG ou ésteres de forbol, porém são independentes de cálcio;
- 3) Atípicas ou aPKCs: ζ e λ/τ independentes de cálcio e insensíveis a DAG ou ésteres de forbol, mas são ativadas por PS.
- 4) PRKs: são semelhantes às atípicas, insensíveis a Ca^{2+} , DAG e ésteres de forbol, sendo ativadas por monômeros de proteína G.

A isoforma PKC δ (delta) é uma importante proteína envolvida na regulação da apoptose em vários tipos celulares. Estudos recentes demonstram um papel regulatório da PKC δ na indução de apoptose de células do músculo liso vascular (VSMC) via estresse de RE, ativação de IRE-1 α e JNK (Larroque-Cardoso *et al.*, 2013). De forma interessante, camundongos *knock-out* para PKC δ , após uma lesão vascular, apresentaram um menor grau de apoptose em células VSMC em comparação ao *wild-type* (Leitges *et al.*, 2001). Além disso, o papel da p38 MAPK como um intermediário entre a ativação de PKC δ e indução do gene da p53, o qual é pró-apoptótico, também tem sido reportado (Cosentino-Gomes *et al.*, 2012).

1.2.3.4.2 Proteínas quinase reguladas por mitógenos

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são quinases serina/treonina que convertem estímulos extracelulares em uma variedade de respostas intracelulares. As MAPK estão entre as mais conhecidas vias de transdução de sinal e são amplamente conservadas por toda a evolução em muitos processos fisiológicos. Todas as células eucarióticas possuem múltiplos caminhos de MAPK, que regulam de forma coordenada a expressão gênica, mitose, metabolismo, motilidade, sobrevivência, diferenciação e apoptose. As MAPK convencionais compreendem as quinases reguladas por sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2), JNK 1/2/3, isoformas p38 MAPK (α , β , γ , e δ) e ERK5. MAPKs atípicas compreendem ERK3/4, ERK7 e Nemo-like kinase (NLK). Notadamente, os grupos mais estudados de MAPKs de mamíferos são as isoformas ERK1/2, JNKs e p38 MAPK (Cargnello e Roux, 2011). As MAPKs são fosforiladas por ação de quinases específicas chamadas MAPK quinases (MAPKK), tais como MEK1 e MEK2. Enquanto a ativação da via MEK/ERK é comumente associada à uma proteção contra a morte celular, JNK e p38 MAPK estão mais relacionadas à apoptose (Gorostizaga *et al.*, 2013).

1.2.3.5 Apoptose e caspase-12

A apoptose é a forma mais relevante de morte celular. Ela desempenha um papel crucial ajustando o número de células do organismo. Resumidamente, a apoptose é desencadeada pela atividade das caspases, uma família de cisteína-proteases que estão presentes na maioria das células como zimógenos inativos (Pérez-Garijo, 2017). A caspase-12 contém um domínio de recrutamento associado à caspases (CARD) e dois domínios catalíticos, p20 e p10 (Szegezdi *et al.*, 2003). A caspase-12 é uma proteína cuja localização celular é restrita à membrana do RE e tem sido relatada como uma isoforma que inicia a apoptose seletivamente em resposta ao estresse de RE (Nakagawa e Yuan, 2000).

É importante ressaltar que os mecanismos pelos quais a albumina participa da injúria de podócitos em função do estresse de RE, PKC δ , MAPK e caspase-12, não são explorados e neste contexto, é pertinente a sua investigação.

2 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a proteína caveolina-1 tem um importante papel na internalização de albumina em podócitos. Além disso, a albumina na concentração de 1 mg/mL no meio intracelular induz apoptose dessas células principalmente pelo estresse de RE e fosforilação da PKC δ e p38 MAPK. Sendo assim, nosso estudo pode ajudar a identificar alvos terapêuticos para a prevenir a lesão podocitária em nefropatias associadas à albuminúria.

REFERÊNCIAS

ABBATE, M.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 11, p. 2974-84, Nov 2006. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035611> >.

ASANUMA, K.; MUNDEL, P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. **Clin Exp Nephrol**, v. 7, n. 4, p. 255-9, Dec 2003. ISSN 1342-1751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712353> >.

BAINES, R. J.; BRUNSKILL, N. J. The molecular interactions between filtered proteins and proximal tubular cells in proteinuria. **Nephron Exp Nephrol**, v. 110, n. 2, p. e67-71, 2008. ISSN 1660-2129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849618> >.

BASILE, J. New therapeutic options in patients prone to hypertension: a focus on direct Renin inhibition and aldosterone blockade. **Am J Med Sci**, v. 337, n. 6, p. 438-44, Jun 2009. ISSN 0002-9629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390429> >.

BERTOLOTI, A. et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 6, p. 326-32, Jun 2000. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854322> >.

BRAVO, R. et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 301, p. 215-90, 2013. ISSN 1937-6448. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317820> >.

BUCKALEW, V. M. et al. Prevalence of hypertension in 1,795 subjects with chronic renal disease: the modification of diet in renal disease study baseline cohort. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Am J Kidney Dis**, v. 28, n. 6, p. 811-21, Dec 1996. ISSN 0272-6386. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957032> >.

CARDILLO, C. et al. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 105, n. 4, p. 452-6, Jan 2002. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815427> >.

CAREY, R. M. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. In: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.45, 2005. p.840-4. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n. 1, p. 50-83, Mar 2011. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372320> >.

CHENG, Y. C. et al. Albumin overload down-regulates integrin- β 1 through reactive oxygen species-endoplasmic reticulum stress pathway in podocytes. **J Biochem**, v. 158, n. 2, p. 101-8, Aug 2015. ISSN 1756-2651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713411> >.

CHRISTENSEN, E. I.; VERROUST, P. J.; NIELSEN, R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. **Pflugers Arch**, v. 458, n. 6, p. 1039-48, Oct 2009. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499243> >.

CORESH, J. et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. **JAMA**, v. 298, n. 17, p. 2038-47, Nov 2007. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986697> >.

COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; MEYER-FERNANDES, J. R. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 9, p. 10697-721, 2012. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109817> >.

DARLING, N. J.; COOK, S. J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 10, p. 2150-63, Oct 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440275> >.

DE JONG, P. E.; GANSEVOORT, R. T.; BAKKER, S. J. Macroalbuminuria and microalbuminuria: do both predict renal and cardiovascular events with similar strength? **J Nephrol**, v. 20, n. 4, p. 375-80, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1121-8428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17879201> >.

DOBRINSKIKH, E. et al. Human podocytes perform polarized, caveolae-dependent albumin endocytosis. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 306, n. 9, p. F941-51, May 2014. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573386> >.

ENDLICH, K.; KRIZ, W.; WITZGALL, R. Update in podocyte biology. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 10, n. 3, p. 331-40, May 2001. ISSN 1062-4821. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342794> >.

EYRE, J. et al. Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, n. 2, p. F674-81, Feb 2007. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032937> >.

FUNABIKI, K. et al. Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. **Clin Nephrol**, v. 34, n. 6, p. 239-46, Dec 1990. ISSN 0301-0430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2073766> >.

GOROSTIZAGA, A. et al. Modulation of albumin-induced endoplasmic reticulum stress in renal proximal tubule cells by upregulation of mapk phosphatase-1. **Chem Biol Interact**, v. 206, n. 1, p. 47-54, Oct 2013. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994741> >.

HARDING, H. P. et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol Cell**, v. 5, n. 5, p. 897-904, May 2000. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882126> >.

_____. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol Cell**, v. 11, n. 3, p. 619-33, Mar 2003. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667446> >.

KADOWAKI, H.; NISHITOH, H.; ICHIJO, H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. **J Chem Neuroanat**, v. 28, n. 1-2, p. 93-100, Sep 2004. ISSN 0891-0618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15363494> >.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev**, v. 13, n. 10, p. 1211-33, May 1999. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10346810> >.

KAWADA, N. et al. A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 12, p. 2860-8, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444204> >.

KIM, D. S. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in endoplasmic reticulum stress-induced cell death and autophagy in human gingival fibroblasts. **Biol Pharm Bull**, v. 33, n. 4, p. 545-9, 2010. ISSN 1347-5215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410583> >.

KITTIKULSUTH, W.; POLLOCK, J. S.; POLLOCK, D. M. Sex differences in renal medullary endothelin receptor function in angiotensin II hypertensive rats. **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 212-8, Aug 2011. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646601> >.

KOROMILAS, A. E. Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment. **Biochim Biophys Acta**, v. 1849, n. 7, p. 871-80, Jul 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497381> >.

KRIZ, W. et al. Mesangial cell-glomerular basement membrane connections counteract glomerular capillary and mesangium expansion. **Am J Nephrol**, v. 10 Suppl 1, p. 4-13, 1990. ISSN 0250-8095. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2256475> >.

LARROQUE-CARDOSO, P. et al. Role of protein kinase C δ in ER stress and apoptosis induced by oxidized LDL in human vascular smooth muscle cells. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e520, Feb 2013. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449456> >.

LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, v. 35, n. 4, p. 373-81, Apr 2005. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15804610> >.

LEEuwIS, J. W. et al. Targeting podocyte-associated diseases. In: (Ed.). **Adv Drug Deliv Rev**. Netherlands: 2010 Elsevier B.V, v.62, 2010. p.1325-36. ISBN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking).

LEITGES, M. et al. Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase Cdelta-null mice. **J Clin Invest**, v. 108, n. 10, p. 1505-12, Nov 2001. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714742> >.

MA, Y.; HENDERSHOT, L. M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **J Chem Neuroanat**, v. 28, n. 1-2, p. 51-65, Sep 2004. ISSN 0891-0618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15363491> >.

MEYRIER, A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 1, n. 1, p. 44-54, Nov 2005. ISSN 1745-8323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932363> >.

MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 12, p. 3005-15, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221> >.

NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. **J Cell Biol**, v. 150, n. 4, p. 887-94, Aug 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953012> >.

NISHITOH, H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. **J Biochem**, v. 151, n. 3, p. 217-9, Mar 2012. ISSN 1756-2651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210905> >.

OKAMURA, K. et al. Endocytosis of albumin by podocytes elicits an inflammatory response and induces apoptotic cell death. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54817, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382978> >.

PERUCHETTI, D. B. et al. (Na⁺ + K⁺)-ATPase is a target for phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B and protein kinase C pathways triggered by albumin. **J Biol Chem**, v. 286, n. 52, p. 45041-7, Dec 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057272> >.

PÉREZ-GARIJO, A. When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. **Semin Cell Dev Biol**, Dec 2017. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29199139> >.

QIAN, H.; PIPOLO, L.; THOMAS, W. G. Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. **Mol Endocrinol**, v. 15, n. 10, p. 1706-19, Oct 2001. ISSN 0888-8809 (Print)0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAJESH, K. et al. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1591, Jan 2015. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25590801> >.

REISER, J.; ALTINTAS, M. M. Podocytes. **F1000Res**, v. 5, 2016. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918173> >.

RYER, E. J. et al. Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent mechanisms. **J Biol Chem**, v. 280, n. 42, p. 35310-7, Oct 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16118209> >.

SAKAI, T.; KRIZ, W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. **Anat Embryol (Berl)**, v. 176, n. 3, p. 373-86, 1987. ISSN 0340-2061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3631536> >.

SALAMANCA, D. A.; KHALIL, R. A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 11, p. 1537-47, Nov 2005. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139252> >.

SCHEUNER, D. et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. **Mol Cell**, v. 7, n. 6, p. 1165-76, Jun 2001. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430820> >.

SCHLONDORFF, D. O. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. **Kidney Int**, v. 74, n. 7, p. 860-6, Oct 2008. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650795> >.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annu Rev Biochem**, v. 74, p. 739-89, 2005. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952902> >.

SCHWARTZ, M. A. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. **J Cell Biol**, v. 139, n. 3, p. 575-8, Nov 1997. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348275> >.

SEQUEIRA LOPEZ, M. L.; GOMEZ, R. A. Development of the renal arterioles. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 12, p. 2156-65, Dec 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052047> >.

SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. **J Bras Nefrol**, v. 38, n. 1, p. 54-61, Mar 2016. ISSN 2175-8239. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27049365> >.

SZEGEZDI, E.; FITZGERALD, U.; SAMALI, A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1010, p. 186-94, Dec 2003. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033718> >.

TAYLOR, M. J.; PERRAIS, D.; MERRIFIELD, C. J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. **PLoS Biol**, v. 9, n. 3, p. e1000604, Mar 2011. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445324> >.

TOBLLI, J. E. et al. Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 546039, 2012. ISSN 2090-2158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844592> >.

TOJO, A.; KINUGASA, S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 481520, 2012. ISSN 2090-2158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685655> >.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, p. 2656-64, Oct 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200199> >.

YURCHENCO, P. D.; AMENTA, P. S.; PATTON, B. L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol**, v. 22, n. 7, p. 521-38, Jan 2004. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996432> >.