

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.058

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.058>

PINK1与糖代谢相关的研究进展

张娟 综述 莫朝晖 审校

(中南大学湘雅附三医院内分泌科, 长沙 410013)

[摘要] 同源性磷酸酶张力蛋白诱导的激酶1[phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced putative kinase 1, PINK1]是与帕金森相关的一种蛋白激酶, 同线粒体功能密切相关。有研究表明, PINK1可能与肥胖、2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)有关, 在调节胰岛β细胞功能中有一定作用, 某些治疗T2DM药物也参与PINK1途径调节。本文就近年关于PINK1与糖代谢相关研究进行综述。

[关键词] 糖代谢; 胰岛素抵抗; 胰岛β细胞; 线粒体

The study progress on the correlation between PINK1 and glucose metabolism

ZHANG Juan, MO Zhaohui

(The Third Affiliated Hospital of South Center University, Changsha 410013, China)

Abstract PINK1 [phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced putative kinase 1] is a protein kinase associated with Parkinson's and closely related with mitochondrial function. Studies have shown that PINK1 may be involved in obesity, type 2 diabetes. Recent studies demonstrate that PINK1 is necessary to maintain function of pancreatic beta cells. Some diabetic drugs are also involved in the regulation of PINK1. This article reviewed the study on the correlation between PINK1 and glucose metabolism in recent years.

Keywords PINK1; glucose metabolism; insulin resistance; pancreatic beta cell; mitochondria

PINK1是与帕金森相关的一种蛋白激酶, 在细胞应激期间, 主要位于线粒体外膜中, 具有保护线粒体功能。糖尿病也是一种能量代谢障碍的疾病, 与线粒体功能密切相关, 本文对两者相关的研究进行综述。

1 PINK1 结构与功能

2001年, Valente等^[1]对意大利西西里岛1个有

122位成员的近亲结婚大家族进行纯合子作图和连锁分析, 发现一个常染色体隐性遗传性帕金森病(Parkinson's Disease, PD)连锁基因座位, 定位于1号染色体短臂, 8个外显子, 长度为1.8 kb, 编码581个氨基酸的高保守蛋白即与Ca²⁺/钙调蛋白家族高度同源丝氨酸-苏氨酸激酶PINK1蛋白。野生型PINK1蛋白和突变PINK1蛋白的前体均由胞质转运至线粒体, 其广泛表达于哺乳动物全身各处细胞, 尤以心脏、睾丸、大脑和骨骼肌表达为高^[2]。

收稿日期 (Date of reception): 2015-04-21

通信作者 (Corresponding author): 莫朝晖, Email: easd04mzh@126.com

PINK1在调节物质能量代谢、减轻氧化应激等损伤、保持细胞内环境稳定、促进机体恢复稳态等方面起重要作用。当机体处于营养因子缺乏、炎症应激、氧化应激等病理状态时, PINK1一方面可定位于线粒体清除受损线粒体及有害蛋白质等, 减少致病因子对细胞损害; 另一方面可定位于细胞质通过多条信号通路参与物质能量循环, 维持细胞存活。细胞内不同区域定位的PINK1可以激活多种蛋白, 包括TNF受体相关蛋白-1(tumor necrosis factor receptor-associated protein 1, TRAP-1)、丝氨酸蛋白酶A2(high temperature requirement factor A2, HtrA2)、帕金森病常染色体隐性遗传相关联的胞质E3泛素连接酶parkin、ricor以及其它未知蛋白通过抗细胞凋亡、修饰线粒体蛋白、线粒体质量控制等相关机制与糖尿病、PD、肿瘤等一系列疾病相关联^[3-4]。突变型PINK1可导致线粒体ATP产生不足, 启动线粒体凋亡途径引起细胞凋亡, 过表达野生型PINK1可磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin complex2, mTORC2)的特定组分Rictor激活细胞质Akt丝氨酸473位点(Aktser473)保护神经元免于应激引起的神经元功能障碍和凋亡^[5-9]。PINK1可作用PKA信号通路介导神经突增生, 可调节HIF-1 α 信号通路, 亦可正向调节IL-1 β 信号通路^[10-12]。NF- κ B炎症途径、FOXO3a、MARK2、SARM1-TRAF6均可诱导激活PINK1转录翻译^[13-16]。

2 PINK1 与糖代谢

研究^[17]显示PINK1基因521位点的天冬氨酸突变为苏氨酸(Asn521Thr)作为独立危险因素同中国北方292名无血缘关系的汉族人群T2DM易感性增加显著相关, 其他诸如PINK1基因340位点苏氨酸突变为丙氨酸(Thr340Ala)以及两个编码位点变异为单体型也可能为T2DM的致病因素。人类PINK1基因主要三个转录产物除了PINK1分子还有多萜基二磷酸寡聚糖蛋白葡萄糖基转移酶(dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase, DDOST)和自然由3'向5'编码的反义PINK1分子(non-coding antisense expressed at the PINK1 locus, naPINK1), 其中DDOST翻译为晚期糖基化终末产物受体1(advanced glycation end products receptor 1, AGE-R1)清道夫受体, 能够负向调节AGE诱导的氧化应激^[18]。研究^[19]发现同非糖尿病的对照小鼠相比, 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导成慢性糖尿病模型的小鼠海马中PINK1表达是下调

的, 可能是小鼠海马中氧化应激增加导致PINK1表达的下调反应。然而由于STZ主要破坏胰岛细胞, STZ诱导的糖尿病动物模型中胰岛细胞中的PINK1变化还有待证实。慢性糖尿病模型小鼠海马中PINK1表达下调会不会因为是胰岛细胞被STZ破坏后, 导致胰岛素分泌不足进而引起PINK1表达下调的下游反应亦有待研究。线粒体脂肪酸 β 氧化机制的两个关键酶ACADVL和HADHA也是下调的并且ACADVL同PINK1蛋白表达正相关^[19]。研究^[20]表明细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增加是多种环境下胰岛素抵抗的重要触发因素之一。PINK1敲除的胰岛 β 细胞可通过增加还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)活性导致ROS产生增多, 进而使胰岛 β 细胞对葡萄糖刺激的摄取反应明显降低, 但使用NADPH抑制剂二亚苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)和抗氧化的ROS清除剂, PINK1敲除的胰岛 β 细胞对5、10、20 mmol/L葡萄糖刺激的摄取反应改善, 尽管未恢复至对照组胰岛 β 细胞对葡萄糖刺激的正常反应水平^[21]。研究^[18]显示与正常糖耐量非肥胖人群组相比(NGT BMI <27), 正常糖耐量肥胖组(NGT BMI >35)、糖尿病非肥胖组(DM BMI <35)、糖尿病肥胖组(DM BMI >35)胰岛素敏感肌肉组织PINK1基因的三个主要转录产物表达均是下调的, 并且PINK1 mRNA水平同空腹血糖水平非线性负相关。表明PINK1表达在调控糖代谢方面起一定作用。

3 PINK1 与胰岛 β 细胞

3.1 PINK1 对胰岛 β 细胞的功能的影响

PINK1对胰岛 β 细胞功能的影响目前尚存争议。Preetha等^[21]在PINK1缺陷鼠的胰岛 β 细胞中, 观察到胞内胰岛素颗粒数目与野生型相似, 分泌的基础胰岛素量也相近; 高糖刺激可增加胰岛素分泌, 但分泌量较野生型低。为了进一步证实PINK1在葡萄糖刺激胰岛素分泌(glucose stimulated insulin secretion, GSIS)中的作用, 利用胰岛 β 细胞模型(MIN6)转染PINK1基因, 观察到过表达PINK1的胰岛 β 细胞基础胰岛素分泌量无明显变化, 但较对照组增强高糖刺激下胰岛素分泌。Deas等研究^[22]显示PINK1缺陷鼠的胰岛 β 细胞中分泌的基础胰岛素量较野生型增加, 高糖刺激下胰岛素分泌量进一步增加; 随后观察6个月龄的PINK1缺陷鼠的胰岛素分泌情况, 葡萄糖耐量试验(glucose tolerance test, GTT)结果显示, 与WT

鼠比较, 两者基础血糖相同, 但PINK1缺陷鼠血糖峰值低, 回落更快, 同时检测血胰岛素水平, 显示PINK1 KO鼠血液中基础胰岛素水平较野生型鼠高, 输注葡萄糖3 min胰岛素水平较野生型鼠低, 输注7 min后, 胰岛素恢复至基线水平, 野生型鼠分泌的胰岛素水平也有回落, 但是明显高于其基线水平, 输注葡萄糖20 min后, PINK1 KO鼠分泌的胰岛素水平上升至与PINK1 WT鼠一致的胰岛素水平。而PINK1 KO鼠和PINK1 WT鼠的胰岛素耐量试验(insulin tolerance test, ITT)结果无明显差异。综合上述结果显示, PINK1缺陷鼠基础胰岛素水平升高、葡萄糖耐量改善。这表明, PINK1在调控胰岛素 β 细胞功能方面起一定作用。

3.2 PINK1 在胰岛 β 细胞线粒体功能中的作用

在PINK1^{-/-}鼠的胰岛 β 细胞中能观察到更多异常的超微结构, 如线粒体严重肿胀, 同时线粒体嵴(携带线粒体呼吸链复合体的线粒体内膜折叠)密度减少、线粒体嵴碎片增多^[22]。这显示, PINK1在维持胰岛 β 细胞结构方面是必不可少的。

多数研究认为, T2DM时通过自噬的增加来对抗糖脂等毒性损害、维持胰岛 β 细胞结构功能、改善IR作用。有研究^[23-24]显示PINK1可促进线粒体自噬清除细胞内受损或异常的线粒体, 亦可与Beclin-1结合促进自噬。Preetha等研究^[21]显示PINK1能改变胰岛 β 细胞自噬, PINK1基因缺陷小鼠的胰岛 β 细胞的超薄切片部分经免疫组化染色显示, 突变的胰岛包含明显增多的微管相关蛋白1轻链3II(Microtubule-associated protein 1 light chain 3II, LC3-II)标志的自噬体, 泛素化阳性颗粒也明显增多。Preetha等并未在PINK1^{-/-}鼠的胰岛 β 细胞运用Western Blot检测LC3-II/I比值的变化, 也未进一步研究PINK1^{-/-}鼠的胰岛 β 细胞中PINK1对自噬潮的影响, 相关方面有待深入研究。

PINK1也可作用于线粒体质量控制体系^[25-27]。线粒体在真核细胞寿命中扮演着重要角色, 在脂肪酸氧化, 三羧酸循环和氧化磷酸化中发挥着关键代谢功能。ROS可能损伤线粒体, 特别是氧化磷酸化的毒性副产物超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$), 过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基($\cdot OH$), ROS引起线粒体脂类、DNA和蛋白质氧化损伤, 使线粒体进一步容易产生ROS; 反过来, 破坏的线粒体释放出高浓度的钙离子和细胞色素C到细胞质, 从而引发凋亡^[25]。因此, 确保适当消除不正常线粒体是细胞存活所急需的, 线粒体损伤已经涉及老化、糖尿病和神经退行性疾病。线粒体质量控制体系的三

个主要途径: 错误折叠的线粒体膜蛋白质可以由两节AAA蛋白酶复合物面向内部膜两侧的催化位点被降解; 线粒体蛋白质也可以通过被转移到溶酶体中降解; 第三个途径, 被称为线粒体自噬, 涉及双膜囊泡封存整个线粒体中、自噬体、其次是聚变与溶酶体^[28]。内源性PINK1可通过作用于mitoflin或者是分子伴侣Hsp75/TRAP1增强线粒体嵴和电子传递链稳定性从而维持线粒体复合物1(complex I, COX1)活性; 同时PINK1亦可抑制基础和6-羟基多巴胺诱导的ROS产生和调节线粒体钙稳态; PINK1可与Miro/Milton相互作用调节微管依赖的线粒体运输^[27]。PINK1作为线粒体感受器, 与parkin涉及线粒体自噬。当线粒体因某些因素氧化应激受损去极化时, 促使线粒体PINK1激活parkin, PINK1和parkin联合作用使受损的线粒体被自噬清除^[23]。Preetha等研究^[21]发现PINK1^{-/-}鼠的胰岛 β 细胞胰岛素分泌缺陷合并增多的异常肿胀线粒体以及线粒体嵴碎片; 但Deas等^[22]研究PINK1缺陷鼠 β 细胞线粒体功能没有明显的损害, 但可能影响葡萄糖的递送或降解。表明PINK1对线粒体质量控制可能对胰岛 β 细胞结构和功能起一定作用。

3.3 PINK1 对胰岛 β 细胞胰岛素分泌信号通路的影响

Deas等研究^[22]显示PINK1缺陷鼠基础胰岛素分泌增加, PINK1缺陷鼠胰岛和PINK1干扰后的MIN6细胞内基础钙离子水平增高, 仍能保持对葡萄糖刺激的反应, 但高糖刺激后增加不如对照组, 且仍保持了 K^+ -ATP依耐途径的正常钙信号; 同时发现PINK1缺陷胰岛细胞的葡萄糖摄入受抑制, 因此, PINK1缺陷胰岛在较低的葡萄糖水平偶联钙信号, 导致基础胰岛素分泌增加, 体内的研究也证实这一点, 显示葡萄糖耐量改善, 与体内增高的基础胰岛素水平有关; 对PINK1敲除小鼠胰岛 β 细胞涉及葡萄糖稳态的几个关键基因进行PCR分析显示, 同WT小鼠胰岛 β 细胞相比, HNF4 α 下调, 胰岛素调节的GSK和PDK1基因转录是上调的, 能增加胰岛素基因转录的NEUROD1、NKX6.1基因和FOXA2均是上调的, 而GSK3 β 、Pecam1、HNF1 α 、ECAD、Pfkfb、ALDOB、GAPDH和AKT基因表达均无明显差异(图1)。高胰岛素血症时可出现HNF4 α 基因转录下调^[29], FOXA2基因上调也可引起HNF4 α 基因转录下调, 提示PINK1可能通过上述基因相关信号通路作用于胰岛 β 细胞。

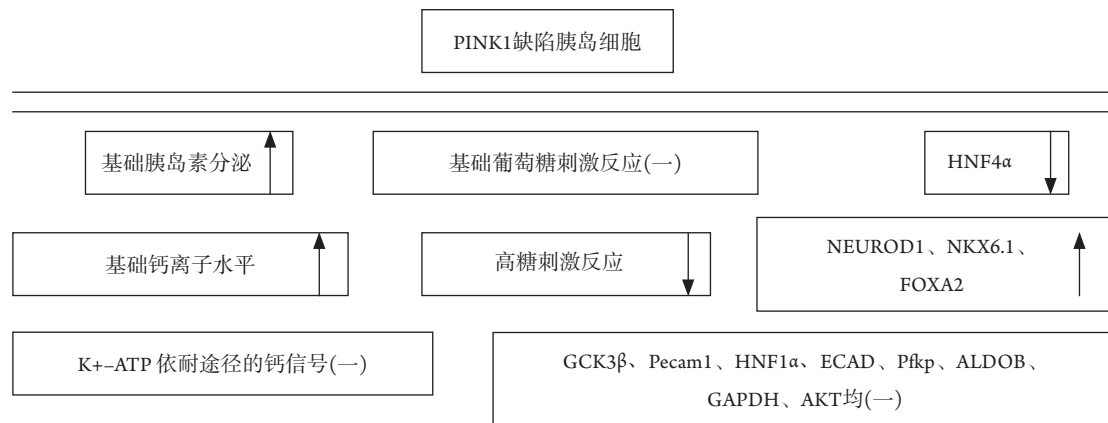


图1 PINK1对胰岛β细胞胰岛素分泌信号通路的基因表达调控影响

Figure 1 The effect of PINK1 in gene expression of islet β cell insulin secretory signal transduction pathway

4 糖尿病治疗药物对 PINK1 的影响

噻唑烷二酮类药物(thiazolidinediones, TZDs)为过氧化物酶体增殖剂激活受体γ(peroxisome proliferators-activated receptors-γ, PPAR-γ)配体之一,曾作为糖尿病治疗的二线用药,Corona等^[30]研究PINK1敲除的PD细胞模型,显示神经母细胞瘤SHSY-5Y细胞线粒体膜电位降低,线粒体质量和氧消耗量均下降,而PPAR-γ激动剂TZDs药物罗格列酮能逆转PINK1敲除引起的一系列线粒体功能紊乱,提示罗格列酮能通过增强线粒体功能来对抗PINK1功能缺失,PINK1可能在TZDs的作用机制中起一定作用。因为尚缺乏PINK1在TZDs治疗糖尿病中作用的研究,其在TZDs治疗糖尿病中的作用研究可能具有一定的探讨价值。

二甲双胍是主要的糖尿病治疗药物。Roe等研究^[31]发现PTEN-/-引起的心肌肥厚和收缩异常与PINK1和AMP依赖的蛋白激酶(Adenosine 5'-monophosphate(AMP)-activated protein kinase, AMPK)磷酸化减弱相关联,通过siRNA下调内源性PINK1水平可抑制AMPK磷酸化,证实AMPK为PTEN-PINK1通路的下游靶点。二甲双胍能部分逆转PTEN-/-引起的心肌功能紊乱,提示二甲双胍能通过AMPK作用于PTEN-PINK1通路。因为尚缺乏PINK1在二甲双胍治疗糖尿病中作用的研究,其在二甲双胍治疗糖尿病中的作用研究可能具有一定的探讨价值。

5 结语

PINK1在胰岛β细胞中的作用较为复杂而且存在争议,本文对其可能的作用方式和途径进行了

小结。糖尿病治疗药物有多种,但是PINK1参与糖尿病治疗药物对糖尿病及胰岛β细胞的作用尚无文献报道,本文只对PINK1可能参与罗格列酮对神经的作用及二甲双胍对心肌的作用进行了小结,罗格列酮由于其心血管毒副作用在欧美已经限制使用,目前TZDs类降糖药物中用的较多的是吡格列酮。尚缺乏胰岛素、吡咯列酮及胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)等对PINK1通路调控作用的总结的相关文献报道。并且现有研究未能揭示T2DM时PINK1发生的分子机制与信号转导过程。其对胰岛β细胞存活的作用及具体机制也未明。因此阐明PINK1在胰岛β细胞存活和死亡方面的作用及调控机制,对寻找治疗糖尿病有效措施有重要意义。

参考文献

1. Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, et al. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(4): 895-900.
2. Trempe JF, Fon EA. Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection[J]. *Front Neurol*, 2013, 4: 38.
3. Eiyama A, Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 95-101.
4. Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, et al. Multiple functions of PINK1 at different intracellular locations: beyond neurodegenerative diseases[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(10): 1518-1519.
5. Choi I, Kim J, Jeong HK, et al. PINK1 deficiency attenuates astrocyte proliferation through mitochondrial dysfunction, reduced AKT and increased p38 MAPK activation, and downregulation of EGFR[J].

- Glia, 2013, 61(5): 800-812.
6. Chien WL, Lee TR, Hung SY, et al. Increase of oxidative stress by a novel PINK1 mutation, P209A[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 58: 160-169.
 7. Vincow ES, Merrihew G, Thomas RE, et al. The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(16): 6400-6405.
 8. Akundi RS, Zhi L, Büeler H. PINK1 enhances insulin-like growth factor-1-dependent Akt signaling and protection against apoptosis[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 469-478.
 9. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, et al. A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via mTORC2[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(9): 7182-7189.
 10. Dagda RK, Pien I, Wang R, et al. Beyond the mitochondrion: cytosolic PINK1 remodels dendrites through protein kinase A[J]. *J Neurochem*, 2014, 128(6): 864-877.
 11. Lin W, Wadlington NL, Chen L, et al. Loss of PINK1 attenuates HIF-1 α induction by preventing 4E-BP1-dependent switch in protein translation under hypoxia[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(8): 3079-3089.
 12. Lee HJ, Chung KC. PINK1 positively regulates IL-1 β -mediated signaling through Tollip and IRAK1 modulation[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 271.
 13. Duan X, Tong J, Xu Q, et al. Upregulation of human PINK1 gene expression by NF κ B signalling[J]. *Mol Brain*, 2014, 7: 57.
 14. Das S, Mitrovsky G, Vasanthi HR, et al. Antiaging properties of a grape-derived antioxidant are regulated by mitochondrial balance of fusion and fission leading to mitophagy triggered by a signaling network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 345105.
 15. Matenia D, Mandelkow EM. Emerging modes of PINK1 signaling: another task for MARK2[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7: 37.
 16. Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, et al. SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 on depolarized mitochondria[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(18): 2772-2784.
 17. Qu Y, Sun L, Yang Z, et al. Variation in the PTEN-induced putative kinase 1 gene associated with the increase risk of type 2 diabetes in northern Chinese[J]. *J Genet*, 2011, 90(1): 125-128.
 18. Scheele C, Nielsen AR, Walden TB, et al. Altered regulation of the PINK1 locus: a link between type 2 diabetes and neurodegeneration?[J]. *FASEB J*, 2007, 21(13): 3653-3665.
 19. Choi J, Ravipati A, Nimmagadda V, et al. Potential roles of PINK1 for increased PGC-1 α -mediated mitochondrial fatty acid oxidation and their associations with Alzheimer disease and diabetes[J]. *Mitochondrion*, 2014, 18: 41-48.
 20. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 944-948.
 21. Preetha S, Zhi L, Akundi RS, et al. PTEN-Induced Kinase 1 Regulates Mitochondrial Integrity and Insulin Secretion in Mouse Pancreatic β - Cells[J]. *J Endocrinol Diabetes Obes*, 2013, 1:1007.
 22. Deas E, Piipari K, Machhada A, et al. PINK1 deficiency in b-cells increases basal insulin secretion and improves glucose tolerance in mice[J]. *Open Biol*, 2014, 4(5): 140051.
 23. Okatsu K, Kimura M, Oka T, et al. Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(5): 964-978.
 24. Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, et al. The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(6): 962-974.
 25. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 335-343.
 26. McLelland GL, Soubannier V, Chen CX, et al. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control[J]. *EMBO J*, 2014, 33(4): 282-295.
 27. Chu CT. A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(R1): R28-R37.
 28. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 31-42.
 29. Xie X, Liao H, Dang H, et al. Down-regulation of hepatic HNF4 α gene expression during hyperinsulinemia via SREBPs[J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(4): 434-443.
 30. Corona JC, de Souza SC, Duchon MR. PPAR γ activation rescues mitochondrial function from inhibition of complex I and loss of PINK1[J]. *Exp Neurol*, 2014, 253: 16-27.
 31. Roe ND, Xu X, Kandadi MR, et al. Targeted deletion of PTEN in cardiomyocytes renders cardiac contractile dysfunction through interruption of Pink1-AMPK signaling and autophagy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 290-298.

本文引用： 张娟, 莫朝晖. PINK1与糖代谢相关的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(6): 1175-1179. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.058

Cite this article as: ZHANG Juan, MO Zhaohui. The study progress on the correlation between PINK1 and glucose metabolism[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2015, 35(6): 1175-1179. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.058