

Recombinante rS1/9 análogo da proteína *spidroin 1* da seda de aranha *Nephila Chavipes* como projeção de biomaterial na regeneração tecidual

Silk protein spidroin 1 analogue recombinant rS1/9 spider Nephila Chavipes as projection of biomaterial in the tissue regeneration

Irineu Ferreira da Silva Neto^{1*}

¹Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil.

*Autor correspondente: yrineuferreira@gmail.com

Recebido: 07/01/2020; Aceito: 04/04/2020

RESUMO

O recombinante rS1/9, análogo da proteína *spidroin 1* da seda de aranha *Nephila Chavipes*, assim como o biomaterial detém variadas aplicações, como: Implantes de tecidos e enxertos, sendo um substituto funcional em lesões. Esse estudo pôde revisar na literatura a utilização da glicoproteína recombinante rS1/9, avaliando suas possíveis aplicações. Os andaimes são os análogos mais promissores para a regeneração tecidual, pois contém poros com aplicabilidade na integração celular. O análogo apresenta as propriedades e capacidades da seda natural, mostrando grande potencial para ser aplicado *in vivo* mediante os estudos. Contudo, são necessárias pesquisas para avaliar seu uso a longo prazo e outras funcionalidades.

Palavras-chave: Biomaterial. Biotecnologia. Métodos alternativos. Produto natural.

ABSTRACT

The recombinant rS1/9, analogue of *Nephila Chavipes* spider silk protein spidroin 1, as well as the biomaterial has several applications, such as: Tissue and graft implants, being a functional substitute for lesions. This study was able to review the use of recombinant rS1/9, glycoprotein in the literature, evaluating its possible applications. Scaffolding is the most promising analog for tissue regeneration, as it contains pores with applicability in cell integration. The analog presents the properties and capacities of natural silk, showing great potential to be applied *in vivo* through the studies. However, research is needed to evaluate its long-term use and other functionality.

Keywords: Biomaterial. Biotechnology. Alternative methods. Natural product.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve uma intensificação na busca por processos que possam auxiliar nos reparos dos tecidos. A grande dificuldade se detém em casos de rejeição de transplantes e órgãos com disponibilidade para todos os pacientes. Além disso, são recorrentes os riscos de rejeição. A ciência interdisciplinar que fica entre setor

biomédico e a engenharia dos tecidos aumentaram suas pesquisas, com o intuito de minimizar os efeitos que acometem a degradação dos tecidos, não aceitação de órgãos e as possíveis aplicações de biomateriais (MOISENOVICH et al., 2012).

A busca por substitutos funcionais, com fácil disponibilidade em casos de órgãos danificados e que permitam uma maior adesão e durabilidade são almejados na medicina regenerativa, e ganham destaque os biomateriais da nova geração. Caracterizados pela arquitetura tridimensional porosa, nos quais são dotados por um espectro definido de moléculas bioativas, receptores de adesão, que possuem partes funcionais, auxiliando no crescimento e regulação sintética do desenvolvimento celular em concentração e distribuição espacial (BAČÁKOVÁ et al., 2004).

Um desses biomateriais que ganha visibilidade é a seda de aranha, detendo propriedades notáveis, dentre elas: alta resistência, elasticidade, degradabilidade mínima, biocompatibilidade e destaque por não causar efeitos citotóxicos com células de mamíferos. A seda é composta de proteínas com regiões cristalinas e amorfas. As fibras cristalinas formam as folhas beta, na qual, gera a grande resistência mecânica, outrossim, a região amorfa é responsável pela capacidade elástica (MOISENOVICH et al., 2012). O peptídeo rico em glicose interna é responsável pela elasticidade das fibras (BOGUSH et al., 2009). Usualmente na história, os Gregos e Romanos usavam teias de aranha para cobrir as feridas como medida curativa, mas ainda nesse período não haviam grandes comprovações da sua real efetividade (LEAL-EGAÑA & SCHEIBEL, 2012).

O filamento de seda é em grande parte construído de proteínas chamadas fibroínas, geralmente, contém pequenas quantidades de proteínas adicionais de função pouco conhecida (SEHNAL & SUTHERLAND, 2008). Tanto a seda proveniente de aranhas, quanto as produzidas pelos bichos de seda vem sendo estudadas e ganham visibilidade, pois contém grande potencial para se tornar futuras fontes terapêuticas (SOKOLOVA et al., 2010).

Décadas de estudos possibilitaram a investigação intensiva quanto a utilização de biopolímeros. Sendo avaliados os andaimes de seda (molhabilidade, carga, elasticidade e biodegradabilidade) sobre a atividade biológica (adesão, proliferação e / ou migração) das células nelas cultivadas (LEAL-EGAÑA & SCHEIBEL, 2012). Os andaimes são estruturas temporárias usadas para suportar células na construção ou reparo de tecidos.

Os andaimes estão sendo cada vez mais visados, com o intuito de proporcionar a criação de tecidos artificiais e órgãos, estes são análogos de um biomaterial natural. A seda derivada da aranha *Nephila clavipes*, que é dividida em *spidroin 1* e *2*, sendo que a *spidroin 1* exibe um importante papel ao aplicada na regeneração de tecidos. Os análogos foram produzidos artificialmente, pois não há quantidade de material suficiente proveniente da seda natural para uma grande escala com potencial regenerativo (MOISENOVICH et al., 2011).

As células possuem a capacidade de interagir com os biomateriais artificiais, havendo interação na composição química, e a partir disso, regula seu comportamento em conformidade. Os bioativos tem a opção de serem anexados em espectro definido, concentração e distribuição espacial. Nesse sentido, é possível controlar adesão, crescimento, diferenciação, funcionamento e viabilidade de células (BAČÁKOVÁ et al., 2004).

Uma das principais vantagens das proteínas recombinantes é a possibilidade de se moldar a estrutura, adicionando uma sequência de aminoácidos nas moléculas com grande capacidade de aderência, ou moléculas biologicamente ativas. Por serem estáveis em PBS (Product Breakdown Structure) tem a capacidade de destruir rapidamente *in vitro* por oxidação da reação de Fenton, imitando uma possível resposta aguda nos tecidos, e os estudos supõem que a oxidação é benéfica para biodegradação nos locais implantados (MOISENOVICH et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de estudos que apresentem a efetividade do recombinante rS1/9 análogo da proteína *spidroin 1* da seda de aranha *Nephila Chavipes* e sua aplicabilidade na regeneração tecidual como alternativa para danos e lesões, ou até mesmo, em reparo de órgãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de revisão de literatura integrativa, de caráter descritivo, através das bases de dados eletrônicas: LILACS (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online), PubMed (National Library of Medicine), CAPES (Portal Periódicos) e Google Scholar. Os estudos selecionados tratavam-se de dados qualitativos e quantitativos nos quais destacava-se estudos descritivos, exploratórios, e estudos experimentais. A pesquisa dos dados foi realizada no mês de agosto de 2019 e foram selecionados descritores para facilitar a trajetória metodológica, sendo eles: “Proteínas recombinantes” (recombinant proteins), “Biomaterial” (biomaterial), “Regeneração” (Regeneration), e “Biotecnologia” (Biotechnology).

Dentre os critérios de inclusão utilizamos artigos originais e disponível na íntegra dos idiomas selecionados: Inglês e Russo. Afim de consolidar os dados, houve a necessidade de limitar o período de publicações acerca do assunto, que ficou entre 2004 e 2019 no qual houve o maior número de dados publicados relacionados a esse estudo. Além disso, foram utilizados dados encontrados na literatura mundial, visto que a literatura brasileira se manteve escassa sobre a temática em questão, assim, os artigos dos idiomas Inglês e Russo se mostraram ser de suma relevância para a produção desse estudo. Foram encontrados 15 artigos que abordavam sobre a temática, mas apenas 10 foram utilizados nessa revisão. Artigos que não estavam dentro do período delimitado, linguagens selecionadas, incompletos ou não eram artigos que tinham relevância para a esse estudo foram excluídos.

RESULTADOS

Aspectos gerais do recombinante

A produção sintética se dá por matrizes tridimensionais porosas produzidas por fiação, que aprimora a formação das fibras, através de: giros em etanol; tração (por meio de dois estágios); recozimento; plastificação e secagem, ou quimicamente formando análogos extracelulares. Esse tipo de matriz tem utilidade na produção de ossos artificiais, pele ou ligamentos. A estrutura básica do *spidroin 1* foi projetada artificialmente com base na sequência nucleotídica conhecida de DNA correspondente de *Nephila clavipes*, os fragmentos projetados diferem pelo conjunto de deleções na sequência dos aminoácidos (BOGUSH et al., 2009).

Cada repetição inicial do recombinante contém uma poli-Ala (poli-A) hidrofóbica, segmento que é de quatro a nove resíduos de aminoácidos de comprimento e um segmento hidrofílico enriquecido com glicina. Estes domínios fornecem resistência à tração da fibra de seda, enquanto a matriz rica em glicina é responsável pela elasticidade. A pesquisa mostra o alto desempenho da seda de arrasto se deve provavelmente devido à conformação de folha β de domínios poli-Ala, incorporados como pequenos cristalitos dentro da fibra (BOGUSH et al., 2009).

Os estudos possibilitaram mostrar que as moléculas de *spidroin*, em tamanho real, estão prontas para se auto-organizar em fibrilas. Foi constatado também que o peptídeo intermediário de *spidroin 1* exibe o máximo alongamento relativo, ademais, formam espontaneamente nanofibrilas em soluções aquosas. Foi avaliado o processo de formação de fibras, sendo que após o processamento, as fibras sintéticas mantiveram a elasticidade de 5% a 15%, comparável aos valores típicos conhecidos para as fibras nativas, exibindo resistência a tração relativa (BOGUSH et al., 2009).

Foram estudadas também as sequências de genes artificiais nesse processo computacional e modelagem matemática. Porém, outros autores sugerem implicações que terminais N e C hidrofílicos são necessários para as nanofibras e a formação de micelas. A formação de nanofibras aparentemente indica a capacidade das proteínas de se automontar, e essas foram observadas nas soluções de análogos de *spidroin* recombinante (BOGUSH et al., 2009).

Análise estrutural 3D

A análise nano estrutural 3D da *spidroin 1* recombinante *scaffolds*, mostrou que os andaimes a base de seda possuem resultados promissores para a regeneração de tecidos. Esse estudo avaliou o comportamento *in vivo* e *in vitro*, nos quais foram fabricados a partir de diferentes fontes: a proteína recombinante rS1/9. Esse recombinante possui a capacidade de transição estrutural para a folha beta e formação natural de nano e microsferas. Acredita-se que a alta capacidade de regeneração seja devido as estruturas porosas únicas, formadas quando há a produção dos andaimes. Os microporos são de suma importância para integração tecidual e características como: tamanho, densidade e interconectividade, estes estão interligados para distribuição uniforme e intercrescimento do tecido *in vivo*. Os mesmos facilitam trocas gasosas, incremento de nutrientes, ademais, promovem a remoção dos resíduos metabólicos (EFIMOV et al., 2014).

Aspectos como tamanho, grau de porosidade do material, relação entre a área de superfície dos poros e a ocupação espacial na micro e nanoescala tem impacto direto para tarefas de medicina regenerativa. Em especial, a homogeneidade da distribuição celular na matriz e eficácia na reconstituição *in vivo*. A desenvoltura das matrizes de biodegradação após administração subcutânea e implantação é observada na biodegradação do material, acompanhada de neovascularização e neoinervação, além da proliferação celular eucariótica (ЕФИМОВ & АГАПОВ, 2014).

A partir da análise 3D é possível afirmar que percolação e permeabilidade em nanoescala devem afetar diretamente na proliferação de células *in vivo* e distribuição de fibroblastos. Houve também maior número de macrófagos, células multinucleadas e de osteoclastos no osso, sendo assim, contribuem para o microambiente do tecido, melhorando sua aplicabilidade (EFIMOV et al., 2014). É buscado atualmente andaimes para reparação de tecidos que possuam várias propriedades, como o suporte de ligação celular, a ausência de toxicidade, sem que haja resposta imunológica, propriedades mecânicas semelhantes os tecidos enxertados e biodegradabilidade. O mais recorrente é a busca por processos que restaurem as propriedades da matriz extracelular natural (LEAL-EGAÑA & SCHEIBEL, 2012).

Avaliação do análogo rS1/9 implantado subcutaneamente em camundongos

O análogo de *Nephila clavipes*, *spidroin 1* (rS1/9) foi utilizado em uma pesquisa para validar suas possíveis aplicações na bioengenharia, nos quais foram estudados *scaffolds* porosos. Neste estudo foi demonstrado a aplicabilidade desse análogo usado como substrato para proliferação celular, havendo assim o crescimento de 3T3 e fibroblastos. Os testes foram feitos em camundongos Balb que toleraram bem o contato subcutâneo com o análogo implantado. A duração foi de 2 meses, e nesse período os andaimes possibilitaram o desenvolvimento de tecido conjuntivo, vasos e fibras nervosas (MOISENOVICH et al., 2011).

Os resultados das pesquisas comprovaram que houve a crescimento celular tanto em biopolímero, quanto na superfície de vidro. Foi testada também a adesão e proliferação, na qual, houve a quantificação de células no 1º, 3º e 14º dia, onde se observou a profundidade e uniformidade, sendo que o número de células aumentou 11 vezes e a profundidade ultrapassou 300 µm (MOISENOVICH et al., 2011).

Os rS1/9 implantados subcutaneamente nos tecidos de camundongos não mostraram sinais patológicos graves. Após 8 semanas os andaimes foram completamente envelopados pela camada sensibilizada, além do aumento evidente do tecido. Em consonância, houve firmamento do tecido invadido, juntamente com os andaimes e isso pôde comprovar as propriedades adesivas na superfície *in vivo*. Houve também aumento da vascularização e crescimento de fibras nervosas no implante. Esse tipo de material detém características físico-químicas peculiaridades, além de possuir subformas moleculares e agregados (MOISENOVICH et al., 2011).

Ensaio de adesão em tecidos

Outro ramo que almeja os andaimes de *spidroin* é a engenharia de tecidos cardíacos, que busca como principais características a capacidade mecânica, elástica e ambiente eletrofisiológico propício para as células cardíacas. Sua utilização mostrou sucesso na concepção dos implantes de osso, tendão e cartilagem. Objetivado a provar que além do desenvolvimento e crescimento há uma possível ajuda na sinalização elétrica, que age na contração, sendo assim, auxilia no bombeamento do sangue. Os testes foram realizados em cardiomiócitos de ratos neonatos isolados, que aderiram bem as malhas de fibras por eletrofiação, na qual deu forma a uma rede celular bem sucedida. A principal função do coração é bombear o sangue através da contração coordenada de fibras musculares, sendo que após a análise dos resultados ambas as contrações de preparação da excitação foram validadas nos experimentos, exibindo atividade contrátil espontânea (TEPLENIN et al., 2015).

Foi possível avaliar os ensaios de adesão e análise de imunocoloração, além disso, a habilidade do cardiomiócitos para formar um sincício cardíaco funcional e a de propagação da excitação. Dando as respostas a algumas indagações, possibilitando a comprovação que as células cardíacas se ligam ao substrato de *spidroin*, se desenvolvendo em suas camadas confluentes, compondo um sincício cardíaco e totalmente funcional (TEPLENIN et al., 2015).

O pulso de excitação propaga através do tecido em desenvolvimento, controlando o funcionamento celular *in vivo*. Após a análise, foi possível constatar que os *spidroins* recombinantes possuem potencial para produção fibras e substratos de malhas, sendo que tais substratos são adequados para a fixação de cardiomiócitos e crescimento sem revestimento adicional (TEPLENIN et al., 2015).

DISCUSSÃO

A proteína geneticamente modificada possui todas as propriedades e capacidades da seda natural, sendo estas: a desdovlutura para transição estrutural, formação da folha beta, nanofibrilas e microesferas, ademais, compõem as fibras rígidas após a fiação. Algumas das propriedades mecânicas pertencentes a esse biopolímero estão associados a transição estrutural de loops para a conformação de folha beta e etanol utilizado na sua preparação, possibilitando esse tipo de transição (MOISENOVICH et al., 2011).

Por possuir grande estabilidade a uma faixa de temperaturas, deter solubilidade com compostos orgânicos, poder de automontagem conformacional, os séculos de aplicações fornecem evidências de sua biocompatibilidade (MOISENOVICH et al., 2012). Possui também boas propriedades físicas, como: resitência e elasticidade, além de biodegradação lenta. A modificação genética de proteínas da seda parece ser uma excelente maneira de alcançar funcional semelhanças com compostos naturais (LEAL-EGAÑA & SCHEIBEL, 2012).

Após investigar as características mecânicas e estruturais, os estudos expostos mostraram que os *scaffolds* possuem eficiência para eucariótica proliferação celular, além disso, avaliou-se sua resposta *in vivo* através de implantes. Foram feitos testes mecânicos para mostrar a tração e força de extensão proporcionada pelos andaimes (MOISENOVICH et al., 2011).

Algumas de suas peculiaridades são comprovadas por um estudo de investigação de nano e microestruturas de biomateriais, através da análise de nanotomografia de sondagem, que trouxe consigo dados quantitativos de micro e nanoestruturas porosas das matrizes e permeabilidade dos macroporos. Esses fatores estão correlacionados com a eficiência da regeneração tecidual ao ser implantados *in vivo*, detendo aspectos morfológicos, físico-químicos e biológicas características promissoras (ЕФИМОВ & АГАПОВ, 2014). Os testes compararam o análogo com teste de controle, sendo que os andaimes são pré-requisitos para avaliação a longo prazo, fazendo uma interconexão entre as células e provocando algumas migrações. Os microporos contidos contribuem para a adesão celular, formando um ambiente adequado para a multiplicação das células (MOISENOVICH et al., 2011).

Os parâmetros comprovam a capacidade porosa e um alto grau de permeabilidade para líquidos, incluindo produtos metabólicos e substâncias celulares *in vitro* e *in vivo* (ЕФИМОВ & АГАПОВ, 2014). O *spidroin 1* contém um elemento poli (Ala) aminoácidos, que torna a proteína hidrofóbica e hidrofílica e é exatamente essa característica que proporciona sua tamanha solubilidade (SOKOLOVA et al., 2010). A formação de nano poros nas paredes das matrizes de *spidroin rS1/9* tem fator crucial na alta eficiência neovascular (ЕФИМОВ & АГАПОВ, 2014).

A capacidade de adesão é um fator crucial, visto que, diminui potenciais riscos biológicos, como apoptose ou ativação de oncogêneses, essa adesão se faz evidente na interconexão célula-matriz. Para interação célula-biomaterial são necessários 3 fatores primordiais, dentre eles: presença de motivos específicos pelas intrigas celulares gerando aderências focais, interações inespecíficas entre células e material e interações morfológicas entre células e superfície (LEAL-EGAÑA & SCHEIBEL, 2012).

Quando há ausência de domínios específicos, a superfície positiva tem um papel fundamental na ligação entre as células, a adesão também depende do grau de molhabilidade, que é determinado pelo equilíbrio entre forças adesivas e coesivas. Outrossim, a topologia dos andaimes auxilia na adesão através da influência na morfologia, polaridade e organização do citoesqueleto (LEAL-EGAÑA & SCHEIBEL, 2012).

Ao ser administrado nos hospedeiros houve considerável tolerância, sem sinais de inflamação, e outras anomalias não foram identificadas. Comparado a outro recombinante, o *scaffold rS1/9* apresentou maior eficiência no desenvolvimento do tecido conjuntivo. O mesmo estudo avaliou a sua utilização em vasos sanguíneos e fibras nervosas que intensificou a vascularização e crescimento dos nervos. Ademais, foi avaliado seu uso na regeneração de tecido ósseo, sendo que após 4 semanas os defeitos apresentaram melhor recuperação em relação ao controle vazio (MOISENOVICH et al., 2012).

O *scaffolds*, composto recombinante a base de seda é um dos análogos mais promissores *in vivo* para a regeneração de tecidos, pois contém poros nos andaimes que detém aplicabilidade na integração tecidual. Essa característica faz com que haja uma conformação uniforme de células, além disso, facilita o fluxo de nutrientes e gases ativos. Os estudos mostram que a proteína recombinante rS1/9 (análogo da *spidroin 1*) revelou boa biocompatibilidade e tolerância quando aplicado nas células de animais (MOISENOVICH et al., 2012).

A maioria das pesquisas mostram uma resposta tecidual mínima, no entanto, um estudo indica que possíveis reações inflamatórias sejam devido a proteína sericina, nesse caso, seu uso em andaimes deve ser evitado. Essa boa compatibilidade imunológica pode ser explicada devido à baixa adesão de macrófagos, limitando a resposta imune (LEAL-EGAÑA & SCHEIBEL, 2012). Alterando a estrutura primária das proteínas ou as condições de processamento é possível projetar materiais e matrizes com estrutura quaternária bem definida, podendo ser moldada nas aplicações biomédicas e engenharia de tecidos (BOGUSH et al., 2009).

CONCLUSÃO

Em conclusão, os estudos mostram que o recombinante rS1/9, análogo da proteína *spidroin 1* de seda da aranha (*Nephila Chavipes*) tem grande potencial para ser utilizado na regeneração tecidual, suas propriedades peculiares fazem seu diferencial dentre os biomateriais. Estudos ainda mais aprofundados devem ser feitos, com o intuito de concretizar e expor sua vasta aplicabilidade nos diferentes tecidos e outras possíveis aplicações, além disso, avaliar seu uso a longo prazo.

REFERÊNCIAS

BAČÁKOVÁ, L.; FILOVA, E.; RYPACEK, F.; ŠVORCIK, V.; STARÝ, V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. **Physiological Research**, v. 53, n. Suppl 1, p. S35-S45, 2004.

BOGUSH, V.G.; SOKOLOVA, O.S.; DAVYDOVA, L.I.; KLINOV, D.V.; SIDORUK, K.V. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 17, 2009.

EFIMOV, A.E.; MOISENOVICH, M.M.; BOGUSH, V.G.; AGAPOV, I.I. 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography. **RSC Advances**, v. 4, n. 105, p. 60943-60947, 2014.

ЕФИМОВ, А. Е.; АГАПОВ, И. И. Исследование нано-и микроструктуры биоматериалов для регенеративной медицины методом сканирующей зондовой нанотомографии. **Вестник трансплантологии и искусственных органов**, v. 16, n. 3, p. 109-116, 2014.

LEAL-EGAÑA, A.; SCHEIBEL, T. Interactions of cells with silk surfaces. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 29, p. 14330-14336, 2012.

MOISENOVICH, M.M.; PUSTOVALOVA O.L.; YU ARHIPOVA, A.; VASILJEVA, T.V.; SOKOLOVA, O.S.; BOGUSH, V.G.; AGAPOV, I.I. In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 96, n. 1, p. 125-131, 2011.

MOISENOVICH, M.M.; PUSTOVALOVA, O.; SHACKELFORD, J.; VASILJEVA, T.V.; DRUZHININA, T.V.; KAMENCHUK, Y.A.; KIRPICHNIKOV, M.P. Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds. **Biomaterials**, v. 33, n. 15, p. 3887-3898, 2012.

SEHNAL, F.; SUTHERLAND, T. Silks produced by insect labial glands. **Prion**, v. 2, n. 4, p. 145-153, 2008.

SOKOLOVA, O. S.; BOGUSH, V.G.; DAVYDONA, L.I.; POLEVOVA, S.V.; ANTONOV, S.A.; NERETINA, T.V.; KIRPICHNIKOV, M.P. The formation of a quaternary structure by recombinant analogs of spider silk proteins. **Molecular biology**, v. 44, n. 1, p. 150-157, 2010.

TEPLENIN, A.; KRASHENINNIKOVA, A.; AGLADZE, N.; SIDORUK, K.; AGAPOVA, O.; AGAPOV, I.; AGLADZE, K. Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spidroin fiber meshes. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121155, 2015.